

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞANLIURFA İLİNDE GÜLLERDE (*Rosa spp.*)'DE ERİK NEKROTİK  
HALKALI LEKE VİRÜSÜ (PNRSV)'NÜN ELISA VE RT-PCR  
YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI**

**Sezer GÜRAN**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2007**

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞANLIURFA İLİNDE GÜLLERDE (*Rosa spp.*)'DE ERİK NEKROTİK  
HALKALI LEKE VİRÜSÜ (PNRSV)'NÜN ELISA VE RT-PCR  
YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI**

**Sezer GÜRAN**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2007**

Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR danışmanlığında, Sezer GÜRAN'ın hazırladığı “Şanlıurfa İlinde Güllerde (*Rosa* spp.) Erik Nekrotik Halkalı Leke Virüsü (PNRSV)'nün ELISA ve RT-PCR Yöntemleriyle Saptanması” konulu bu çalışma 02/02/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Üye : Doç. Dr. Bekir BÜKÜN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU

**Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım**

**Prof. Dr. İbrahim BOLAT**  
**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.**  
**Proje No: 687**

**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.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	7
3.1. Materyal.....	7
3.1.1. Örneklerin alındığı yerler.....	7
3.1.2. DAS-ELISA çalışmalarında kullanılan materyal.....	7
3.1.3. PCR çalışmalarında kullanılan materyal.....	7
3.1.4. Agaroz jel elektroforez çalışmalarında kullanılan materyal.....	8
3.2. Yöntem.....	8
3.2.1. Örneklerin toplanması.....	8
3.2.2. ELISA testi.....	8
3.2.2.1. ELISA testinin uygulanması.....	8
3.2.3. Moleküler test çalışmaları.....	9
3.2.3.1. Bitki total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu.....	9
3.2.3.2. Rivers transkriptaz polimeraz chain reaksiyon (RT-PCR).....	10
3.2.3.3. Komplemanter DNA (cDNA)'nın sentezi.....	10
3.2.3.4. PCR reaksiyonu.....	11
3.2.4. RT-PCR ürünlerinin analizi.....	11
3.2.4.1. Agaroz jelin (%1.2'lik) hazırlanması.....	11
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	13
4.1. Toplanan Örneklerde Belirlenen Simptomlar.....	13
4.2. ELISA Test Sonuçları.....	15
4.3. RT-PCR Yöntemi Sonuçları.....	16
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	19
5.1. Sonuçlar.....	19
5.2. Öneriler.....	19
KAYNAKLAR.....	21
ÖZGEÇMİŞ.....	25
EKLER.....	26
EK 1.....	27
EK 2.....	29
ÖZET.....	30
SUMMARY.....	31

## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

### ŞANLIURFA İLİNDE GÜLLERDE (*Rosa spp.*) ERİK NEKROTİK HALKALI LEKE VİRÜSÜ (PNRSV)'NÜN ELISA VE RT-PCR YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI

Sezer GÜRAN

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Yıl: 2007, Sayfa: 31

Araştırma Şanlıurfa il ve ilçelerinde güllerde Erik Necrotic Ring Spot Virüs'ünü saptamak için yapılmıştır. Virüs hastalığının belirtilerini gösteren 19 örnekle resmi parklardan Mayıs 2005 döneminde toplanmıştır. Toplanan örneklerin %21.05'i ELISA yöntemiyle, %31.57'si ise RT-PCR yöntemiyle pozitif olarak belirlenmiştir. Güllerde hastalık ilk kez bölgede bu çalışmayla saptanmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** PNRSV, ELISA, RT-PCR, Gül, Virüs, Şanlıurfa

**ABSTRACT**

**Master Thesis**

**THE DETERMINATION OF PRUNUS NECROTIC RING SPOT VIRUSE BY ELISA AND  
RT-PCR METHODS ON ROSE (*Rosa spp.*) IN ŞANLIURFA**

**Sezer GÜRAN**

**Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Protection**

**Supervisor: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR  
Year: 2007, Page: 31**

This study was carried out to detect PNRSV on rose in Şanlıurfa province and its districts in 2005. Sampling was made in May. Samples were collected from public gardens. 19 samples expressing virus diseases were tested for PNRSV by ELISA and RT-PCR. The diseases incidence, as percentage of total samples for PNRSV, was found 21.05% by ELISA and 31.57 % by RT-PCR. PNRSV was determined as a new virus on rose in this region.

**KEY WORDS:** PNRSV, ELISA, RT-PCR, Rose, Virus, Şanlıurfa

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR'e, RT-PCR yönteminin uygulanması aşamasında yardımcı olan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Saadettin Baloğlu ve Dr. B. Kemal ÇAĞLAR'a, tezimin çeşitli aşamalarında yardımcı olan HR.Ü. Bitki Koruma Bölüm Başkanı Prof. Dr. Abuzer YÜCEL'e, Doç. Dr. Bekir BÜKÜN'e, Yrd. Doç. Dr. Levent ÜNLÜ'ye ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Ayrıca tezin maddi olarak desteklenmesini sağlayan HÜBAK'a da teşekkür ederim.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 4.1. Gül bitkilerinin yapraklarında sararma ve klorotik lekeler.....	13
Şekil 4.2. Gül bitkisinin yapraklarında benekleşme.....	14
Şekil 4.3. Gül bitkisinin yapraklarında yaprak alanında küçülme.....	14
Şekil 4.4. Gül bitkisinin yapraklarında yaprak alanında küçülme ve boğum aralarında kısıalma.....	15
Şekil 4.5. PNRSV ile infekteli izolatlar ŞM1 (b), ŞM2 (c) ve ŞM3 (d). DNA Marker 1 kb (a) ve PCR Marker 100 bp (e).....	17
Şekil 4.6. PNRSV izolatları ile BoM (b), BrM (c) ve ŞM4 (d). DNA Marker 1 kb (a) ve PCR Marker 100 bp (e).....	17



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 3.1. PNRSV virüsüne ait genetik materyalin PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları.....	11
Çizelge 4.1. Şanlıurfa Merkez ve diğer ilçelerden alınan örneklerden elde edilen ELISA testi sonuçları.....	16
Çizelge 4.2. Şanlıurfa Merkez ve diğer ilçelerden alınan örneklerden elde edilen RT-PCR testi sonuçları.....	16

## 1. GİRİŞ

Kesme çiçek yetiştiriciliğinin dünyadaki tarihsel gelişimi süs bitkileri sektörünün gelişimiyle büyük ölçüde paralellik göstermiştir. Bu faaliyet alanı, ticari anlamda 20. yy'ın başlarından itibaren önem kazanmaya başlamış ve özellikle II. Dünya Savaşından sonra birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülke için önemli bir ticari konuma gelmiştir (Karagüzel ve ark., 2001).

Kesme çiçekçilik, sağladığı ihracat geliri ve istihdam ile ülkemiz için önemli bir sektör konumundadır. Ülkemizde; 10.365 da'lık alanda kesme çiçek üretimi yapılmaktadır. Kesme çiçek üretimimizin % 52'sini karanfil, % 17'sini gül, % 10'unu krizantem, %4'ünü şebboy, % 3'ünü gerbera, %2'sini glayöl oluşturmaktadır. Kültürü karanfilden sonra en fazla yapılan ve birim alandan yüksek gelir sağlan gül bitkisi ülkemizde; açıkta ve sera alanlarında olmak üzere 500 dekarlık bir alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır (Altıntaş, 2004).

Gül (*Rosa* spp.), sert ve yumuşak çekirdekli meyvelerinde içinde bulunduğu Rosaceae (Gülgiller) familyasına dahil bir bitkidir. Rosaceae familyası içerisinde yer alan türlerde birçok virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni bulunmaktadır. Gerek Dünyada ve gerekse Türkiye'de bu hastalık etmenleri ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır.

Gül bitkisinde verimi ve kaliteyi etkileyen en önemli faktörlerden biri gül hastalıklarıdır. Güllerde birçok fungal, viral ve bakteriyel etmen hastalık yapmaktadır (Horst, 1989).

Birçok bitkide hastalık etmeni olan virüslerden Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV), Apple Mosaic Virus (ApMV), Arabis Mosaic Virus (ArMV), Strawberry Latent Ringspot Virus (SLRVS) güllerde hastalık yapmaktadır (Fulton, 1952; İkin ve Forst, 1976; Cooper, 1979; Thomas, 1980; 1981; 1982; Fletcher, 1984; Simith ve ark., 1988).

Martelli (1992), Alfamovirus, Bromovirus ve Cucumovirus ile PNRSV’inde içinde bulunduğu Ilarvirus genusunun Bromoviridae familyası içinde olduğunu bildirmektedir.

PNRSV’nin içinde bulunduğu Ilarvirus genusunu temsil eden üye Tobacco Streak Virus (TSV)’tür. Grubun ismi “ isometric labile ringspot” kelimelerinden gelmektedir. İlk kez 1930 yılında bildirilen PNRSV’nin partikülleri isometric ve basiliform yapısındadır. PNRSV’nin genomu tek sarmallı (ss: single-stranded) RNA’dan ibaret olup, partikülleri zarfsız, 25-35 nm çapında ve 70 nm uzunluğundadır (Ong, 1987).

PNRSV’nin konukçu dizisi *Rosa* cinsleri, *Prunus*, *Malus* ve *Humulus lupulus* doğal konukçularıdır (Nemeth, 1986). Ekonomik açıdan en önemli konukçuları arasında gül (*Rosa* spp.), *Prunus* cinslerine ait kiraz (*Prunus avium*), vişne (*P. cerasus*), erik (*P. domestica*), badem (*P. dulcis*), şeftali (*P. persica*) ve şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) bulunmaktadır. PNRSV birçok ırka sahiptir ve bunların bazıları meyve ağaçlarında ciddi problemlere neden olmaktadır (Nyland ve ark., 1976; Fulton, 1981).

Virüs konukçusu olan bitkilerde; kloroz, nekroz, yaprak deformasyonu ve gelişme geriliğine yol açmaktadır. Klorozların; çizgi, halka, bant, leke yada mozaik görünümünde olabilecekleri rapor edilmiştir. Gözler, yapraklar ve dalların nekrotik görüntü verebileceği ve epinasti, kırışıklık, enation gibi görüntülerinde hastalık belirtilerleri arasında yer aldığı saptanmıştır. Ayrıca, nekrozların genellikle şiddetli bir enfeksiyonu takiben gelişmenin ilk evrelerinde gözlemlendiği ve yapraklarda dahil olmak üzere dal ve sürgünleri etkilediği belirtilmiştir (Bock, 1967; Dunez, 1988; Mink, 1992; Nyland ve ark., 1976).

Güllerde “gül mozayik” hastalığına sebep olan PNRSV çiçek üretiminde % 40’a varan azalmalara neden olmaktadır. Bunun yanında çiçeklerde deformasyonlara, renk kırılmalarına, çiçeklerin yaş ve kuru ağırlıklarında azalmalara ve geç çiçeklenmelere neden olmaktadır (Thomas, 1980). Gül bitkisinde verim azalması özellikle yağlık gül üretiminde önem kazanırken, goncaların küçülmesi, bitkinin zayıflaması ve renk kırılması ile yapraklardaki anormal renklenmeler şeklinde yapıların oluşması kesme gül yetiştiriciliğinde pazar değerinin düşmesine sebebiyet verdiği için ekonomik kayıp olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gül mozaik virüsü hem PNRSV hem de ApMV tarafından oluşturulmaktadır. Karakteristik semptomları arasında yapraklarda klorotik halkalar ve çizgiler; gelişmede gerileme görülür. Bunun yanında PNRSV, ApMV'den daha yaygın olarak görülür. PNRSV genellikle güllerde çiçeklenmeyi geciktirir. Çiçek büyüklüğünün ve sayısının azalmasına ve deforme olmuş çiçeklerin oranının artmasına neden olur (Bjarnason ve ark., 1985).

Yüksek virüs konsantrasyonunda, inhibitörlerden dolayı diğer yöntemlerin uygulanmadığı zamanlarda ELISA yönteminden faydalanmak mümkündür. Serolojik bir kitle testi olan ELISA'nın güvenilirliği ve kullanımı birtakım sınırlamalara bağlıdır. Özellikle odunsu bitkilerde, virüsün homojen olmayan dağılımından ve mevsime bağlı yüksek hava sıcaklıklarından dolayı ELISA yöntemiyle testlenmesinden dolayı virüsün saptanmasında birtakım güçlükler çıkabilmektedir (Clark ve Adams, 1977; Torrance, 1981). Bundan dolayı daha duyarlı ve güvenilir teknik olarak bilinen ve özellikle de mevsime bağlı farklı virüs konsantrasyonlarından nispeten daha az etkilenen, bitkilerde düşük virüs konsantrasyonlarında dahi kolayca teşhis edilebilen PCR yöntemiyle ELISA da karşılaşılabilecek birçok sorun ortadan kalkmıştır.

PCR; DNA'nın çoğaltımı (amplifikasyon) anlayışını esas almaktadır. Bu yöntem Karry Mullis tarafından ortaya atılmış ve daha sonra Cetus Corporation'daki bir grup tarafından geliştirilmiştir. Böylece moleküler biyolojide yeni bir dönemin başlamasına olanak sağlayarak, insanlardaki viral patojenler başta olmak üzere birçok bitki patojeninin saptanmasında rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (Mullis ve ark., 1986; Mullis ve Faloona, 1987).

Virüs hastalıklarına karşı henüz herhangi bir kimyasal mücadele bulunmamaktadır. Bundan dolayı bazı kültürel önlemler ve virüsten ari veya dayanıklı üretim materyali kullanmak en önemli mücadele yolu olarak görülmektedir. Bitki virüslerini tanımak, ırklarını ve konukçu dizilerini belirlemek ve hızlı tanı yöntemleri ile etmeni tanımlamak kontrol açısından önem arz etmektedir. Çalışma, Şanlıurfa ilinde gül bitkilerinde PNRSV virüs hastalığının var olup olmadığını ve yaygınlığının hangi oranda olduğunu saptamak amacı ile yapılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Virüsün ELISA ile tanımlanması çok kolay ve yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Ancak odunsu bitkilerde, virüsün homojen olmayan dağılımından ve mevsime bağlı yüksek hava sıcaklıklarından dolayı ELISA yöntemiyle testlenmesinden dolayı virüsün saptanmasında birtakım güçlükler çıkabilmektedir (Torrance, 1981).

Son yıllarda biyoteknolojik yöntemler alanındaki gelişmeler ile virüs hastalıklarının tanısının daha kısa zamanda, kolay, kesin ve güvenilir bir biçimde yapılmasına olanak sağlamıştır. Duyarlı ve daha güvenilir teşhis tekniği olarak bilinen PCR'in kullanılmasıyla birlikte ELISA testinde karşılaşılan sorunlar ortadan kalkmıştır (Saade, 1999).

Ülkemizde ve Dünyada güllerde ve güller ile aynı familya içerisinde bulunan türlerde görülen PNRSV'nin serolojik ve biyoteknolojik yöntemlerle belirlenmesine yönelik yapılan bir çok sürvey çalışmaları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Ülkemizde Ege Bölgesi seralarının bazılarında güllerde gözlenen mozayik belirtilerine dayanılarak güllerde virüs enfeksiyonu olduğu kanısına varılmış ancak başka bir çalışma yapılmamıştır (Türkoğlu ve Fidan, 1982).

Ülkemizde güllerde yapılan serolojik çalışmalar ile PNRSV'nin Samsun, Isparta ve Ankara'dan toplanan örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir (Erdiller ve ark., 1995).

PNRSV serolojik olarak Malatya ilindeki güllerde, bazı şeftali, kiraz ve vişnelerde saptanmıştır (Baloğlu ve ark., 1999; Sipahioğlu ve ark., 1999; Sipahioğlu, 2000).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen güllere de % 7.27 oranında (220 örnekte 16 infekteli) PNRSV mevcuttur (Sipahioğlu ve ark., 2001). Saptanan enfeksiyon oranının oldukça düşük olduğu ve ithal edilen üretim materyalinin kontrolü ile yurtiçinde gül fidanı üretiminde simptom gösteren şüpheli bitkilerin kullanılmaması gereği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir.

PNRSV gül bitkisine ilave olarak sert çekirdekli meyve ağaçlarında büyük sorunlara yol açmaktadır. PNRSV'nin infekteli olan polenlerle erik, kiraz ve vişne plantasyonlarında ağaçtan ağaca taşınabildiği ELISA ile kanıtlanmıştır (Gilmer ve Way, 1961; Cameron ve ark., 1973).

Digiario ve ark. (1992), ELISA testini kullanarak PNRSV'nin infekteli badem ve tohumlarındaki lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada PNRSV'nin badem polenlerinin hem intergumentleri içinde ve dışında ve hem de ovulde bulunduğunu saptamışlardır. Testlenen çöğürlerde PNRSV'nin % 4.5-11.5 oranında enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Dİ Terlizzi ve ark. (1992), Güney İtalya'da gerçekleştirdikleri kayısı, erik ve şeftali ağaçlarından aldıkları örnekler ile yaptıkları ELISA ve biyolojik indeksleme yöntemiyle testledikleri kayısılarda % 39, eriklerde, % 46 ve şeftalide % 54 oranında PNRSV enfeksiyonu belirlemişlerdir.

Azeri (1994), ELISA yöntemi kullanarak Balıkesir, Çanakkale, İzmir, Manisa ve Aydın'da farklı *Prunus* türlerinden topladığı örnekleri testlemesi sonucunda PNRSV ve diğer birçok viral etmenlerle *Prunus* türlerinin bulaşık olduğunu saptamıştır.

Yıldızgördü ve Hurigil (1996), Ülkemizde; Doğu Anadolu, Ege ve Marmara ile Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Ilarvirus grubu içerisinde yer alan virüslerle ilgili olarak yaptıkları çalışmalarda ELISA ve biyolojik indeksleme çalışmaları ile PNRSV'nin varlığını saptamıştır.

Gazel (1997), ELISA ve biyolojik indeksleme yöntemlerini kullanarak Hatay yöresindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı virüs hastalıklarını tespit etmek amacıyla yaptığı bir çalışmada; testlenen örneklerde PNRSV'nin % 18.4 oranında olduğunu saptamıştır.

Kahramanmaraş ve çevresinde yetiştirilen sert çekirdekli meyve ağaçlarından alınan örneklerin ELISA ile testlenmesi sonucunda % 6.45 oranında PDV, % 0.04 oranında da PNRSV enfeksiyonu saptanmıştır (Arıkan, 2002).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen sert çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı mevcut PNRSV virüsünün biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve tanımlanması üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmalarda sert çekirdekli

meyve izolatlarından farklı olarak gül izolatları da materyal olarak kullanılmıştır (Koç, 2003).

Güllerde zararlı olan PNRSV ülkemizde sert çekirdeklielerde de yaygın olarak bulunmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı farklı bölgelerdeki fidanlıklar ve meyve bahçelerinden alınan erik, kayısı, kiraz, şeftali ve nektarinden 486 bitki materyalinde PNRSV'nin bulunma yoğunluğu araştırılmıştır. Bu materyallerdeki mevcut virüsleri saptamak için tüm örnekler DAS-ELISA testi ile RT-PCR tekniği uygulanmış, RT-PCR ile 51 örnek PNRSV ile bulaşık bulunurken DAS-ELISA testi ile sadece 31 örnek bulaşık bulunmuştur (Ulubaş ve Ertunç, 2004).

**3. MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Materyal****3.1.1. Örneklerin alındığı yerler**

Araştırma materyalini oluşturan hastalıklı bitki örnekleri, Şanlıurfa Merkez (ŞM), Birecik Merkez (BrM) ve Bozova Merkez (BoM) ilçelerinde gül bitkilerinin bulunduğu park ve bahçelerden alınmıştır.

**3.1.2. DAS-ELISA çalışmalarında kullanılan materyal**

Serolojik çalışmada kullanılan PNRSV antiserum kiti LOEWE (Amstgericht München HRB 84575, Almanya) firmasından temin edilmiştir. ELISA testinde Fosfat Tamponu Salin (PBS), Yıkama Tamponu, Kaplama Tamponu, Substrat Tamponu, Örnek Tamponu ve Konjugat Tampon Çözeltileri (EK 1), Alkalın Fosfataz Enzimi Substrat olarak p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Company, ST, Lois, M.O. 63178 USA) ve 8 x 12'lik U şekline sahip mikroplyetler kullanılmıştır.

**3.1.3. PCR çalışmalarında kullanılan materyal**

RT-PCR işleminde; total RNA çalışmaları sonunda elde edilen nükleik asit ekstraktları kullanılmıştır.

Hedeflenen nükleik asit parçalarının çoğaltılması amacıyla yapılan RT-PCR çalışması; Taq polimeraz (Termostabil DNA polymerase enzyme, 5U/µl, Fermentas, EP0401), dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 25 mM, Promega), reaksiyon tampon çözeltisi, MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> buffer, PNRSV'ye spesifik forward (5'GAG CTC TGG TCC CACT CA GG-3') ve reverse (5'-TCACTCTAGATCTCAAGCAG-3') primerler (10 mM), Moloney Murine Leukaemia Virusten oluşan reverse transcriptase (MMLV-RT, 200U/µl, Fermentas, EP0441) enzimi ve reverse transcriptase tamponu, RNase inhibitor enzimi (40U/µl Fermentas, EO0311), DNA markerları 1 kb (Promega; G571A) ve 100 bp (Fermantas; SM0623), ependorf tüpleri ve Techno Genius marka thermocycler cihazı kullanılarak yapılmıştır.



### **3.1.4. Agaroz jel elektroforez çalışmalarında kullanılan materyaller**

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, total nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR işlemleri sonunda elde edilen nükleik asit ürünleri kontrol edilmiştir.

Bu amaçla yapılan agaroz jel elektroforez işleminde; agaroz, mikrodalga fırın, BIORAD marka Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı ve güç kaynağı ile UVP Ultraviolet Transilluminator marka UV ışık kaynağı kullanılmıştır.

## **3.2.Yöntem**

### **3.2.1. Örneklerin toplanması**

Virüs hastalığının belirtilerini gösteren (yapraklarda klorotik lekeler, buruşukluk, benekleşme, mozaik, yaprak alanında küçülme ve boğum aralarında kısılma) örnekler gül bitkisi bulunan park ve bahçelerden Mayıs 2005 tarihinde Şanlıurfa ve ilçelerinden tesadüfi olarak toplanmıştır.

### **3.2.2. ELISA testi**

ELISA testi Clark ve Adams (1977)'e göre ELISA kitinin alındığı firmanın önerdiği şekilde uygulanmıştır.

#### **3.2.2.1. ELISA testinin uygulanması**

ELISA testinde sağlıklı gül bitkileri ve örnek tamponu olmak üzere iki farklı negatif kontrol kullanılmış ve testlenecek her bir örnek iki tekerrürlü olarak pleytin çukurlarına yerleştirilmiştir.

-Kaplama tamponu ile 1:200 oranında sulandırılmış  $\delta$ -globulinden, ELISA pleytinin her bir çukuruna 200 $\mu$ l konularak ve pleyt üzeri kapatılarak +37 °C'de 4 saat inkube edilmiştir.

-İnkubasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üçer dakika süreyle üç defa yıkanmıştır. Her yıkama işleminden sonra pleyt ters çevrilerek, havada sallanmış ve 5-6 katlı havlu peçete üzerine vurularak kuruması sağlanmıştır.

-Örnek tamponu ile 1:20 oranında ekstrakte edildikten sonra, testlenecek her bir örnek, alt alta gelecek şekilde her çift çukura 200µl ilave edilmiş ve sonra +6 °C’de bir gece inkube edilmiştir.

-İnkubasyondan sonra pleyt daha önceden belirlendiği gibi çukurlar arası karışma olmayacak şekilde dikkatli olarak yıkanmıştır.

-Konjugat tamponu ile 1:200 oranında sulandırılmış konjugattan her bir çukura 200µl konulmuş ve pleyt 30°C’de 4 saat inkubasyona bırakılmıştır. Sonra pleyt daha önce belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

-Substrat tamponunda taze olarak hazırlanan substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200 µl konulmuş ve 30-120 dakika oda sıcaklığında inkube edilmiştir.

-İnkubasyon süresi sonunda, gerekli olduğu zaman reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 50 µl 3 M NaOH ilave edilmiştir.

-Sonuçların değerlendirilmesi,

a) Sarı renk oluşumu

b) ORGANON TEKNIKA Microwell System Reader 230 S okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

Çukurlardaki sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca sağlıklı örneğin iki katı veya daha fazlası absorbans değerine sahip örnekler hastalıkla bulaşık olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.3. Moleküler test çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Bitki total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu**

PNRSV ile infekteli olduğu ELISA yöntemiyle belirlenen ve belirlenmeyen gül bitkisinden alınan semptomlu yapraklar kullanılarak yapılan total RNA ekstraksiyonu çalışmaları Astruc ve ark. (1996)’nın bildirdiği yöntemle göre aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- 1- Örnekler, steril bir havan içersinde ekstraksiyon tampon çözeltisi (Ek 2) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak ezilmiş ve bitki özsuyu steril tülbentten süzülmüştür. Elde edilen bitki öz suyundan 1 ml alınarak ependorf tüpleri

- içerisine konulmuş ve 3 dk. 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sıvı faz atılmış, çökelti alınmıştır.
- 2- Oluşan çökelti fazının üzerine %20'lik SDS çözeltisinden 50 µl ilave edilerek vorteks yapılmış ve tüpler sıcak su banyosunda 65 °C'de 30 dk İnkübe edilmiştir.
  - 3- Tüplerin içersine 250 µl potasium acetate (5M) ilave edilerek, 20 dk buz içerisinde bekletilmiş ve daha sonra 15 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
  - 4- Üstte kalan 1000 µl'lik sıvı kısım iki tüpe bölünmüş, bunların 500 µl'si 20 °C'de saklanmış, 500 µl'si de yeni hazırlanan ependorf tüplerine konulmuş ve üzerine 500 µl % 100'lük ethanol ilave edilerek 1 ml'ye tamamlanıp vorteks edilmiştir.
  - 5- Tüplere 3 M'lık 50 µl sodium acetate ilave edilip tekrar karıştırıldıktan sonra, -20 °C'de bir gece bekletilmiş ve 14.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek sıvı kısım ortamdaki uzaklaştırılmıştır. İçerisinde çökelti bulunan ependorf tüpleri bir filtre kağıdı üzerine ters çevirilip 5-10 dk kurutulmuş ve çökelti, üzerine 1 ml ethanol (% 70) ilave edilerek yıkanmıştır.
  - 6- RNA'ların çöktürülmesi amacıyla 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra, tüp içerisindeki ethanol uzaklaştırılmış ve ependorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurulanmıştır.
  - 7- Total RNA'ları içeren çökelti 50 µl RNase içermeyen distile su ile sulandırılmış ve preparat 15 µl ve 35 µl'lik olmak üzere ikiye bölünerek ependorf tüpleri içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
  - 8- Elde edilen preparasyonlar total RNA'ların varlığının ortaya konulması amacıyla agaroz jel elektroforez işlemi yapılarak kontrol edilmiştir.

### **3.2.3.2. Revers transkriptaz polymerase chain reaction (RT-PCR)**

RT-PCR çalışmaları Spiegel ve ark., (1999) ve Koç (2003)'un kullandığı yöntemlere göre yürütülmüştür.

### **3.2.3.3. Komplemanter DNA (cDNA)'nın sentezi**

2 µl RNA, 1 µl Primer 2 (Reverse) ve 12 µl H<sub>2</sub>O PCR tüpü içerisinde 94 °C de 4' termocycle bekletildikten sonra tüpler hemen buz üzerine konulmuştur. Daha sonra

bu tüpler içerisine RT karışımı ( 1 µl dNTPs, 5 µl RT Buffer, 0.1 µl RT, 0.3 µl RNase, 3.6 µl H<sub>2</sub>O) ilave edilmiş ve 42 °C de 1 saat bekletilerek viral RNA dan cDNA sentezlenmiştir.

### 3.2.3.4. PCR reaksiyonu

cDNA dan 3 µl alınarak 1 µl dNTs, 2.5 µl MgCl<sub>2</sub> free buffer, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl Pr1, 1 µl Pr2, 0.2 µl Taq ve 14.8 µl H<sub>2</sub>O içeren PCR mix içerisine ilave edilerek tüpler daha önceden programlanmış olan Termocycle aletine yerleştirilmiş ve program çalıştırılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. PNRSV virüsüne ait genetik materyalin PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklı aralıkları

	PCR öncesi	PCR			PCR sonrası
Döngü sayısı	1X	40X			1X
Sıcaklık	94°C	94°C	54°C	72°C	72°C
Zaman	2 dak.	30sn	1 dak	1 dak.	10 dak.

PCR çoğaltımından sonra elde edilen PCR ürünleri, elektroforeze uygulanıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

### 3.2.4. RT-PCR ürünlerinin analizi

#### 3.2.4.1. Agaroz jelin (% 1.2'lik) hazırlanması

RT-PCR işlemi sonunda, PNRSV'nin çoğaltılan nükleik asit materyali bromofenol blue ile boyanıp %1'lik agaroz jel elektroforez yöntemine tabi tutulmuştur. Gallitelli ve Minafra (1994)'ya göre uygulanan yöntemde:

360 mg agaroz 30 ml 1xTAE tampon çözeltisi (4.84 gr Tris, 2 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, 1.142 ml Glucial Asetic Acid/1 lt) içerisine konularak, agaroz eriyinceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmış ve son hacim tekrar 30 ml'ye ayarlanmıştır.

Karışım bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra; jel, hazırlanan kısma boşaltılarak tarak takılmıştır.

Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çekilmiş ve bu kısım elektroforez tankına yerleştirilerek, jeli 1-2 mm geçecek kadar 0.5 x TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

Örnekler; 15 µl örnek ve 4 µl 6x loading buffer olacak şekilde hazırlandıktan sonra jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. İlk kuyuya marker (1µl marker, 1 µl loading buffer, 4 µl saf su) konulmuştur.

Loading buffer içindeki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına 40 V elektrik akımı verilmiştir.

Jel, elektroforez işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk 30 µl (10 mg/ml saf su) ethidium bromid/100 ml saf su çözeltisinde çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 5 dk saf su içerisinde tutulmuştur.

Yıkanan jel, UV Transilluminatör üzerine konularak, UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Toplanan Örneklerde Belirlenen Semptomlar

Şanlıurfa ve ilçelerindeki gül yetiştirilen alanlardan özellikle merkez parklardan virüsün semptomlarının görülmeye başlandığı Mayıs 2005 tarihinde Merkez ilçeden üç yerde, diğer ilçelerde ise birer yerde örnekleme yapılmıştır. Örnekleme yapılan yerlerde semptomatolojik olarak 19 örnek toplanmıştır.

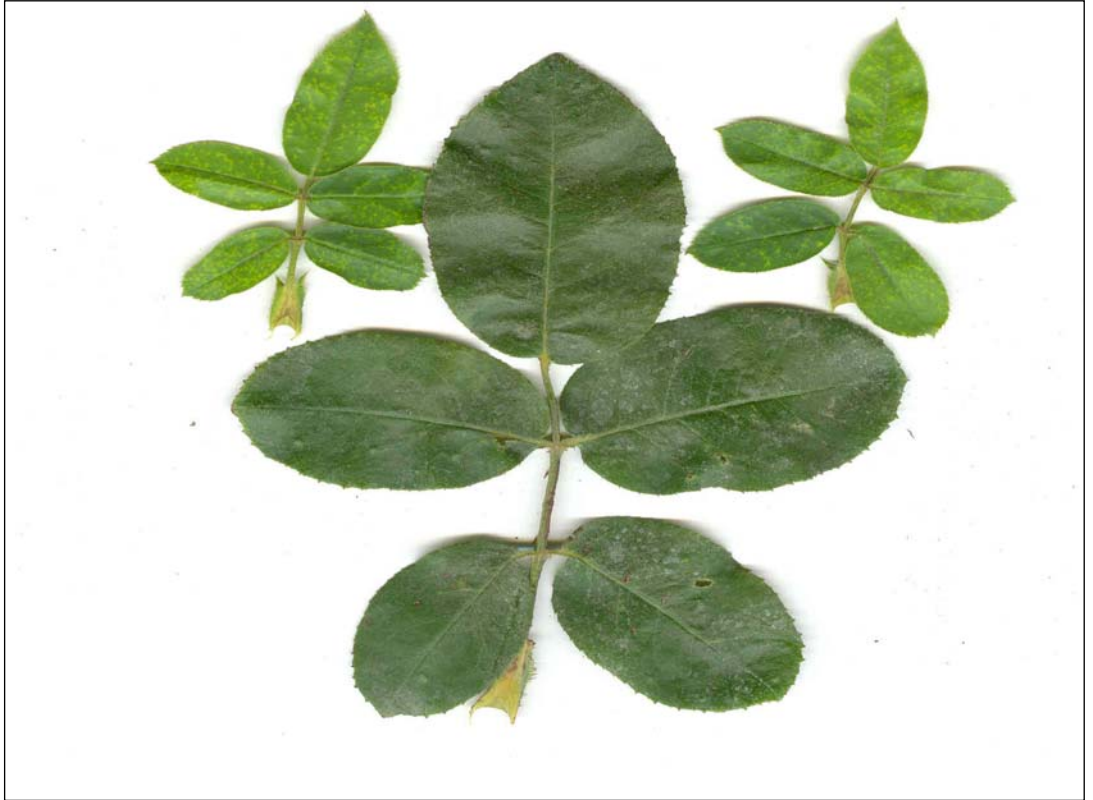
Örneklerin toplandığı Şanlıurfa Merkez, Birecik Merkez ve Bozova Merkez İlçelerinde gül bitkilerinin bulunduğu alanlardan Prunus Necrotic Ring Spot Virüsü'nün olabileceği farklı tipte semptomlara rastlanılmıştır. Bu semptomlar; yapraklarda sararma ve klorotik lekeler (Şekil 4.1), benekleşme (Şekil 4.2), yaprak alanında küçülme (Şekil 4.3) ve boğum aralarında kısalma biçimlerinde belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.1. Gül bitkisinin yapraklarında sararma ve klorotik lekeler



Şekil 4.2. Gül bitkisinin yapraklarında benekleşme



Şekil 4.3. Gül bitkisinin yapraklarında yaprak alanındaki küçülme



Şekil 4.4. Gül bitkisinin yapraklarında yaprak alanındaki küçülme ve boğum aralarında kısılma

#### 4.2. ELISA Testi Sonuçları

Toplanan 19 örneğin dördü tanesi pozitif olarak saptanmıştır. Şanlıurfa merkez ilçeden toplanan 11 örneğin üç tanesi, Bozova merkezinden toplanan beş örneğin bir tanesi PNRSV için pozitif olarak saptanmıştır. Birecik merkezinden toplanan üç örnekte ise PNRSV virüsü belirlenememiştir. Toplanan örneklerde bulaşıklık oranları Şanlıurfa merkezde %27.27, Bozova merkezinde %20.00 ve Birecik merkezinde ise tespit edilmemiştir. Toplanan örneklerde boğum aralarında kısılma, yapraklarda küçülme ve benekleşme biçiminde simptom gösteren örneklerin tümü ELISA testinde pozitif sonuç vermiştir.



### 4.3. RT-PCR Yöntemi Sonuçları

Toplanan 19 örneğin altı tanesi pozitif olarak saptanmıştır. Şanlıurfa merkez ilçeden toplanan 11 örneğin dört tanesi, Birecik merkezinden toplanan beş örneğin bir tanesi ve Bozova merkezinden toplanan üç örneğin bir tanesi PNRSV için pozitif olarak saptanmıştır.

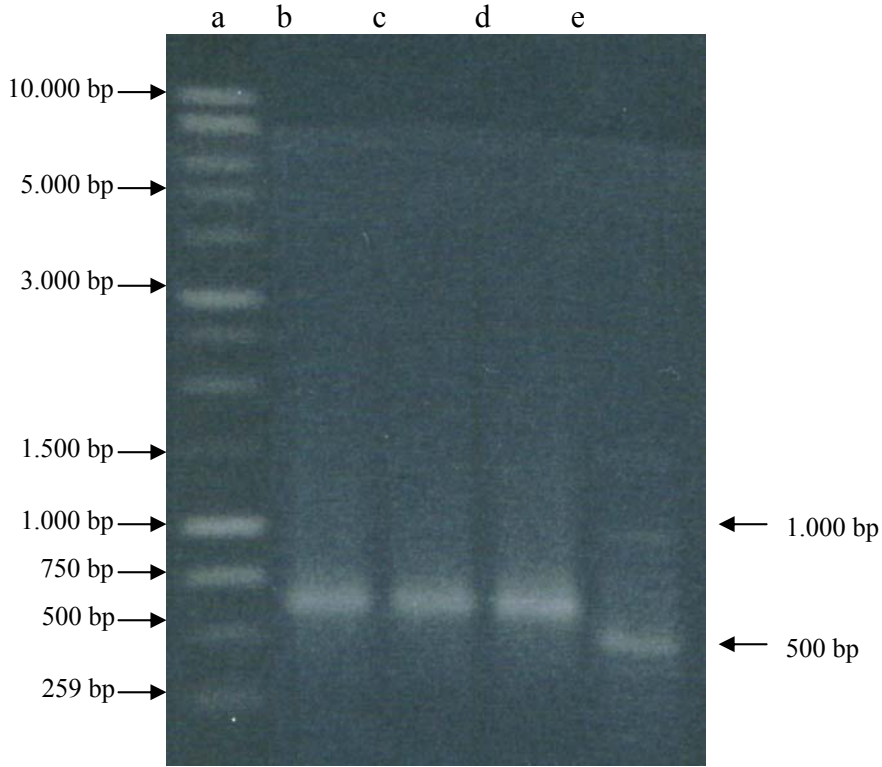
Çizelge 4.1. Şanlıurfa Merkez ve diğer ilçelerden alınan örneklerden elde edilen ELISA testi sonuçları

Örneğin Alındığı Yer	Testlenen Örnek sayısı	Hastalıklı Örnek Sayısı	Absorbans Değeri	Testlenen Örneklerin Bulaşıklık Oranı
Merkez	11	3	0.587-0.623	27.27
Birecik	5	1	0.392-0.409	20.00
Bozova	3	0	-	0.00
<b>Toplam</b>	<b>19</b>	<b>4</b>		<b>21.05</b>
<b>Pozitif Kontrol:</b>		2.54-2.87	<b>Negatif Kontrol:</b> 0.089-0.093	

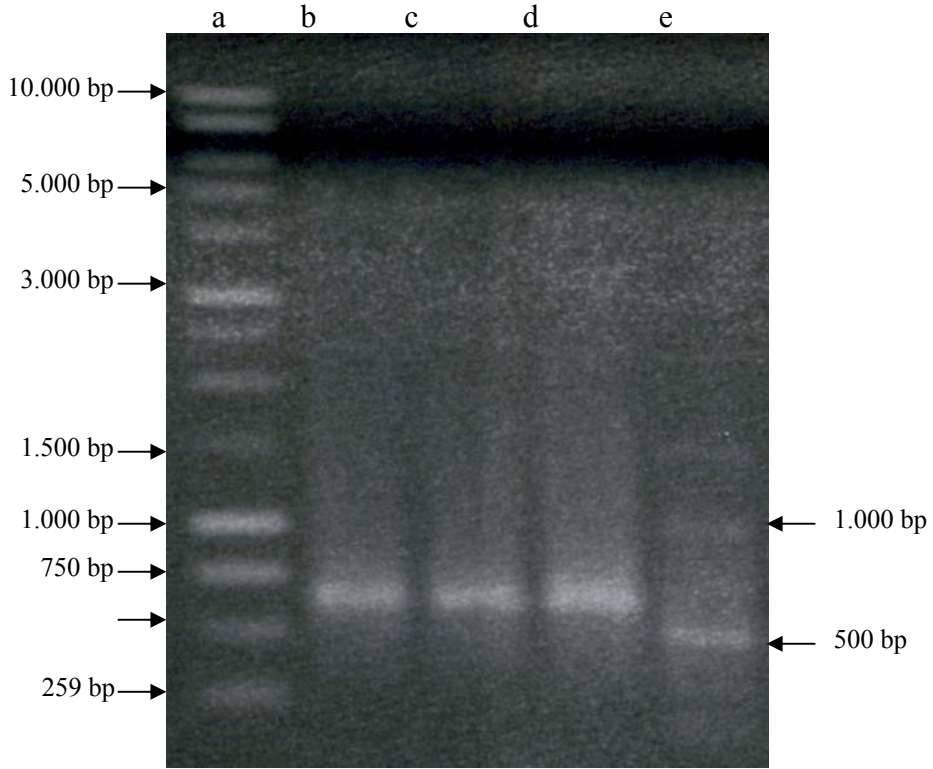
Toplanan örneklerde RT-PCR yöntemi ile bulaşıklık oranları ise Şanlıurfa merkezde %36.36, Bozova merkezinde %20.00 ve Birecik merkezinde ise %33.33 olarak tespit edilmiştir. RT-PCR yöntemi ile yapılan çalışmada toplanan 19 örnekten 6 tanesinde kullanılan primerler yaklaşık 605-612 bp'lik bir büyüklük oluşturmuştur (Şekil 4.5; Şekil 4.6).

Çizelge 4.2. Şanlıurfa Merkez ve diğer ilçelerden alınan örneklerden elde edilen RT-PCR testi sonuçları

Örneğin Alındığı Yer	Testlenen Örnek sayısı	ELISA (+)	RT-PCR (+)	Testlenen Örneklerin Bulaşıklık Oranı
Merkez	11	3	4	36.36
Birecik	5	1	1	20.00
Bozova	3	0	1	33.33
<b>Toplam</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>31.57</b>



Şekil 4.5. PNRSV ile infekteli izolatlar ŞM1 (b), ŞM2 (c) ve ŞM3 (d). DNA Marker 1 kb (a) ve PCR Marker 100 bp (e).



Şekil 4.6. PNRS izolatları ile BoM (b), BrM (c) ve ŞM4 (d). DNA Marker 1 kb (a) ve PCR Marker 100 bp (e).

Toplanan 19 örnekte ELISA yöntemi ile dört örnek pozitif olarak belirlenirken RT-PCR yönteminde dört örneğe ilave olarak yapraklarda sararma ve klorotik lekeler gösteren iki örnek daha pozitif olarak saptanmıştır. Bu nedenle toplanan örneklerdeki bulaşıklık oranı RT-PCR yönteminde (%31.57) ELISA yöntemine göre (%21.05) daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Güllerde yapılan çalışmalarda ELISA yöntemi ile PNRSV ile bulaşıklık oranı %1-23.3 arasında değişmektedir (Moury ve ark., 2001; Rakhshandehro ve ark., 2006). Araştırmada ise bulaşıklık ELISA yöntemi ile toplam örnekte %21.05 olarak belirlenmiştir. Bu oran daha önce yapılan çalışmalarda saptanan bulaşıklık oranları içerisinde yer almaktadır. Ancak RT-PCR yöntemi ile bu oran % 31.57 olarak saptanmıştır. Bunun nedeni ise RT-PCR yönteminin ELISA yöntemine göre tanılamada daha duyarlı bir teknik olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim sert çekirdekli meyve ağaçlarında PNRSV virüsü ile yapılan çalışmalarda ELISA yöntemi ile negatif sonuç veren örnekler RT-PCR yöntemi ile pozitif sonuç vermiştir (Moury ve ark., 2001; Mekuria ve ark., 2003; Spiegel ve ark., 2004).

Simptomatolojik belirti gösteren 19 örneğin sadece altı tanesinde PNRSV'nin saptanmış olması toplanan örneklerde başka virüslerinde bulunabileceğini göstermektedir. Nitekim güllerde PNRSV'ne ilave olarak Apple Mosaic Virus (ApMV), Tobacco Streak Virus (TSV), Arabis Mosaic Virus (ArMV), Strawberry Latent Ringspot Virus (TRSV) ve Tomato Ringspot Virus (TomRSV) rapor edilmiştir (Moury ve ark., 2001; Szyndel ve ark., 2006).

PNRSV gül bitkilerinde ELISA ve RT-PCR çalışmalarıyla bölgede ilk kez belirlenmiştir. PNRSV primerlerinin oluşturduğu nükleotid büyüklüğü (605-612) aynı primerlerle çalışılan farklı çalışmalarda elde edilen büyüklüklere yakın olarak bulunmuştur. Ancak bölgede güllerden elde edilen PNRSV izolatlarının dünyada saptanan diğer izolatlarla farklılıklarının veya benzerliklerinin ortaya koyulabilmesi için serolojik (Moury ve ark., 2001) ve moleküler düzeyde (Spiegel ve ark., 2004) daha detaylı çalışmaların yapılması zorunluluk arz etmektedir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Şanlıurfa ili ve ilçelerinden Mayıs ayı içerisinde PNRSV hastalığının belirtilerini gösteren 19 örnek toplanmıştır. Örnekler hastalığın bölgede bulunup bulunmadığını kontrol etmek için ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle incelenmiştir.

Toplanan 19 örneğin dört tanesi ELISA yöntemiyle hastalıkla bulaşık olarak tespit edilmiştir. Pozitif olarak bulunan dört örnekte benekleşme, yaprak ayasında küçülme ve boğum aralarında küçülme biçimlerinde belirtiler belirlenmiştir.

Toplanan 19 örneğin altı tanesi RT-PCR yöntemiyle hastalıkla bulaşık olarak tespit edilmiştir. Pozitif olarak bulunan dört örneğe ilave olarak iki örnekte ise klorotik lekeler biçiminde belirtiler gözlenmiştir.

RT-PCR analizinde hastalıkla beklenen örneklerde 605-612 nükleotit uzunluğu arasında değişen büyüklükler saptanmıştır. Bölgede yapılan bu çalışmayla hastalık güllerde ilk olarak belirlenmiştir.

### 5.2. Öneriler

Güneydoğu Anadolu Projesi alanı içerisinde yer alan Şanlıurfa ilinde sera alanları, jeotermal enerji kaynaklarının bulunması nedeni ile artmakta ve seralarda tek ürün sebze yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ancak yakın bir gelecekte bu seralarda katma değerinin yüksek olması nedeniyle gül bitkisinin de aralarında bulunduğu kesme çiçek yetiştiriciliğinin yapılması planlanmaktadır. Bölgeye getirilen gül fidanlarının tümü dışarıdan getirilmekte ve zaman zaman bu fidanlar virüs hastalıkları ile bulaşık olmaktadır. Çalışmada bölgedeki parklardan toplanan ve virüs hastalığının belirtilerini gösteren örneklerde güllerin önemli bir hastalığı olan PNRSV bulunmuştur.

Bu nedenle:

1. Bölgeye dışarıdan getirilen fidanlar PNRSV ile bulaşık olmamalıdır.
2. Gül fidanları sertifikalı olmalıdır.

3. Gül fidanı üreticileri, ürettikleri gül çeşitlerinin anaç ve kalemlerinin PNRSV ile bulaşık olup olmadığını ELISA ve RT-PCR yöntemiyle mutlaka test ettirmelidirler.
4. Bölgeye getirilen gül fidanlarının maksimum hassasiyet için mutlaka RT-PCR ile kontrol edilmeli veya kontrol edilmiş olmalıdır.
5. Bölgede gül fidanı üretimine başlandığında, üretim materyallerinin viral hastalıklar açısından kontrolü üretim yerinde serolojik ve moleküler düzeyde mutlaka yapılmalıdır.
6. Bölgedeki diğer gül virüsleri tesbit edilmelidir.
7. Özellikle bölge için önemli bir gül çeşidi olan Halfeti gülünde virüsün bulunup bulunmadığı araştırılmalıdır.
8. Bölgede güllerde PNRSV saptandığından dolayı, virüsün esas konukçuları olan sert çekirdekli meyve ağaçlarında sert çekirdekli meyve fidan ve anaçlarının sertifikalı ve bilinen hastalıklardan ari olmasına dikkat edilmelidir.

## KAYNAKLAR

- ALTINTAŞ, G. B., 2004. İzmir Ticaret ve Sanayi Odası Araştırma ve Meslekleri Geliştirme Müdürlüğü Bülteni Nisan 2004/2 .
- ARIKAN, T. E., 2002. Kahramanmaraş Yöresindeki Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının ELISA Yöntemi ile Tanısı. Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 30s.
- ASTRUC, N., MARCOS, J. F., MACQUARIE, G., CANDRESSE, G. T. And VICENT P., 1996. Studies on The Diagnosis of Hop Stunt Viroid in Fruit Trees: Identification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organic Solandts. European Journal of Plant Pathology, 102: 837-846.
- AZERİ, T., 1994. Detection of Virus Diseases of Stone Fruits in Aegean Region of Türkiye. 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union-Kuşadası, Aydın- Türkiye, pp. 511-513.
- BALOĞLU, S., SİPAHİOĞLU, H. M., ÇIĞŞAR, İ., YILMAZ, M. A., 1999. Malatya ve Civarında Kayısı Meyvelerinde Zararlı Olan Kireçlenme Belirtilerinin Nedeninin ve Ağaçlarda Mevcut Virus Hastalıklarının Saptanması ve Bu Hastalıklar İçin Çözüm Yollarının Belirlenmesi, TÜBİTAK-TOGTAG-TARP 2109 Nolu Proje II. Gelişme Raporu (Yayınlanmamış), Adana. Ankara
- BJARNASON, E. N., HANGER, B. C., MORAN, J. R., COOPER, J. A., 1985. Production of Prunus Necrotic Ringspot Virus-Free Roses by Heat Treatment and Tissue Culture. New Zealand Journal of Agricultural Research. 28: 151-156.
- BOCK, K.R., 1967. Strains of Prunus Necrotic Ringspot Virus in Hop (*Humulus lupulus* L.). Ann. Appl. Biol. 59: 437-446.
- CAMERON, H. R., MILBRATH, J.A. and TATE, L. A., 1973. Pollen Transmission of Prunus Necrotic Ringspot Virus in Prune and Sour Cherry Orchards. Pl. Dis. Repr. 57: 241-243.
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N., 1977. Characteristic of Microplate Method of Enzym Liked Immunosorbent Assay for The Detection of Plant Viruses, Journal of Gen. Virol., 34: 475-483.
- COOPER, J. I., 1979. Virus Diseases of Trees and Shrubs. Print in GB by Com. News Aberystwyth. 74 p.
- DIGIARO, M., SAVINO, V., DI TERLIZZI, B., and MARTELLI, G.P., 1992. The Relationship of Ilarviruses to Almond Mosaic. Adv. Hort. Sci., 6 (4); 161-166.
- DI TERLIZZI, B., MUROLO, O., SAVINO, V., AND DIGIARO, M., 1992. Viruses of Peach, Plum and Apricot in Apulia. Acta Horticulture, 309: 367-372.
- DUNEZ, J., 1988. Stuation of Virus and Virus Like Diseases of Stone Fruits in the Mediterranean and Near East Region. In: Fruit Crop Sanitation in the Mediterranean and Near East Region, pp. 227-276.

- ERDİLLER, G., ELİBÜYÜK, İ. Ö., ve AKBAŞ, B., 1995. Güllerde Görülen Virüs Hastalıkları. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-29 Eylül Adana s. 286-289.
- FLETCHER, J. T., 1984. Diseases of Greenhouse Plants. Longman Group Limited 351p.
- FULTON, R. W., 1952. Mechanical transmission and properties of rose mosaic virus. Phyt. 42: 413-416.
- FULTON, R. W., 1981. Iarviruses. In Hanbook of plant virus infections and comparative diagnosis. (Yazarlar: E. Kurastak, 377-413. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electrophoresis. Course on Plant Virus Diagnosis, 89-114. Adana, Turkey.
- GAZEL, M. H., 1997. Hatay Bölgesi Prunus Türlerindeki Virüs Hastalıklarının ELISA ve Biyolojik Yöntemlerle Tanımlanması. M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antakya.
- GILMER, R. M. and WAY, R. D., 1961. Pollen Transmission of Necrotic Ringspot and Prune Dwarf Viruses in Cherry. Tidsskr. Planteavl., 65: 111-117.
- HORST, K. R., 1989. Compendium of Rose Diseases. APS Press 50p. No: 5.
- IKIN, R. and FORST, R. R., 1976. Viruses diseases of roses. II. Strawberry latent ringspot virus. Phyt. Z. 87: 205-223.
- KARAGÜZEL, O., AKKAYA, F., TURKAY, C., GÜRSAN, K., ÖZÇELİK, A., ERKEN, K., and ÇELİKEL, F. G., 2001. Bitkisel Üretim Özel İhtisas Komisyonu Süs Bitkileri Alt Komisyon Raporu, Sekizinci Beş yıllık Kalkınma Planı, Yayın No: DPT: 2645-ÖİK: 653, Ankara.
- KOÇ, G., 2003. Doğu Akdeniz Bölgesinde Mevcut Prunus Nekrotik Ringspot Virüsünün (PNRSV) Saptanması ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, No: 2207, Adana, s. 97
- MARTELLI, G. P., 1992. Classification and Nomenclature of Plant Viruses: State of Art. Plant Diseases, 76: 436-442.
- MEKURIA, G., RAMESH, S. A., ALBERTS, E., BERTOZZI, T., WIRTHENSOHN, M., COLLINS, G., and SEDGLEY, M., 2003. Comporation of ELISA and RT-PCT for the Detection of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Prune dwarf virus* in almond. Journal of Virological Methods, 114: 65-69.
- MINK, G. I., 1992. Prunus Necrotic Ringspot Virus. In: Plant Diseases of International Importance, Vol II. Pp: 335-356. Edited by J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay. New York: Pretice Hall.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, SAIKI, S., HORN, G., and ERLICH, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro* : The polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor. Symp. Quant Biol. 51:263-273.
- MULLIS, K. B., AND FALOONA, F. A., 1987. Specific Synthesis of DNA *In Vitro* Via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction. Methods Enzymol, 155:335-350
- MOURY, B., CARDIN, L., ONESTO, J.-P., CANDRESSE, T., and POUPET, A., 2001. Survey of Prunus Necrotic Ring Spot Virus in Rose and its variability in rose and *Prunus* spp. Phytopathology, 91:84-91.

- NEMENTH, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Ricettsia Diseases of Fruit Trees. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands and Academi Kiado, Hungary. Dr. W. Junk Publishes p.841.
- NYLAND, G., GILMER, R. M. and MOORE, J. D., 1976. Prunus Ringspot Group. Pages: 104-132. In: Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. U.S. Dep. Agric. Handbook: 437.
- ONG, C. A., 1987. Separation and Characterization of Nucleoprotein Components of Prunus Necrotic Ringspot Virus Isolates. PhD Thesis. Washington State University, Pullman.
- RAKHSHANDEHRO, F., ZADEH, H. R. Z., MODARRESI, A., and HAJMANSOOR, S., 2006. Occurrence of Prunus Necrotic Ringspot Virus and Arabis Mosaic Virus on Rose in Iran. Plant Diseases, 90(7): 975.
- SAADE, M., 1999. Simultaneous detection of ilarviruses affecting stone fruit by molecular approaches. Master of Sciences (Collection master of Science). n. 183 Istituto agronomico mediterraneo di Bari, Italy
- SİPAHİOĞLU, H. M., MYRTA, A., ABOU-GHANEM, N., DI TERLIZZI, B. and SAVINO, V., 1999. Sanitary Status of Stone Fruit Trees in East Anatolia (Turkey) with Particular Reference to Apricot. EPPO Bulletin, 29 (4): 439-442.
- SİPAHİOĞLU, H. M., 2000. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Sert Çekirdekli Meyvelerde Prunus Necrotic Ringspot ve Apple Chlorotic Leaf Spot Virüslerinin Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Tanımlanması ve Özelliklerinin Saptanması. Doktora Tezi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, No: 585, Adana , 77s.
- SİPAHİOĞLU, H. M., BALOĞLU, S., ve ÇAĞLAR, B. K., 2001. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Güllerde Zararlı olan PNRSV ve ApMV Virüslerinin Saptanması ve Tanımlanması. Fitopatoloji Kongresi Bildiri ve Posterleri kitabı, 3-8 Eylül Tekirdağ, 45:572-577.
- SMITH, I. M., DUNEZ, J., PHILLIPS, D. H., LELLIOT, R. A. and ARCHER, S. A., 1988. European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications 583p. England.
- SPIEGEL, S., TAM, Y., MASLENIN, L., KOLBER, M., NEMETH, M., ROSNER, A. 1999. Typing *Prunus necrotic ringspot virus* Isolates by Serology and Restriction Endonuclease Analysis of PCR Products. Annals of Applied Biology, 135 (1): 395-400.
- SPIEGEL, S., HOLLAND, D., TAM, Y., BAR-YAAAKOV, I., and ROSNER, A., 2004. *Prunus necrotic ring spot virus* Isolates in Stone Fruit Germplasm Accession and Cultivars in Israel. Ann. Appl. Biol. 144: 229-236.
- SZYNDDEL, M. S., PADUCH-CICHAL, E., SALA-REJCZAK, K., 2006. Viruses causing diseases on roses. Ochrona Roslin, 51(2): 34-37.
- THOMAS, B. J., 1980. The Detection by Serological Methods of Viruses Infecting The Rose. Ann. App. Biol., 94: 91-101.



- THOMAS, B. J., 1981. Studies on Rose Mosaic Diseases in Field-Grown Roses Produced in the United Kingdom. *Ann. Appl. Biol.*, 98: 419-429.
- THOMAS, B. J., 1982. The Effect of Prunus Necrotic Ringspot Virus on Field-Grown Roses. *Ann. Appl. Biol.*, 100: 129-134.
- TORRANCE, L., 1981. Use of Forced Buds to Extend the Period of Serological Testing in Survey Fruit Tree Viruses. *Plant Pathology*, 30: 213-216.
- TÜRKOĞLU, T., ve FİDAN, Ü., 1982. Ege Bölgesinde Ticari Amaçla Yetiştirilen Bazı Önemli Süs Bitkilerinde Saptanan Virüs Hastalıkları Üzerinde Araştırmalar. III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 12-15 Ekim, Adana, s. 288-296.
- ULUBAŞ, Ç. and ERTUNÇ, F., 2004. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of Prunus necrotic ringspot virus Isolates Occuring in Turkey. *J. Phytopathology*, 152: 498-502.
- YILDIZGÖRDÜ, K.Ç. and HURİGİL, M., 1996. Virus Diseases of Peach Trees in Hatay Province. *The Journal Turkish Phytopathology*, 25(1-2): 65-69.

## **ÖZGEÇMİŞ**

28.08.1979 tarihinde Diyarbakır'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Diyarbakır'da tamamladı. 1997 yılında Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünü kazandı. 2001 yılında aynı fakülteden mezun oldu. 2003-2004 eğitim öğretim güz yarıyılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. Diyarbakır Tarım İl Müdürlüğü'nde görev yapmaktadır.

## **EKLER**

EK 1. DAS-ELISA testinde kullanılan tampon çözeltiler

EK 2. Total RNA analizlerinde kullanılan solüsyonlar

## EK 1.

### DAS-ELISA testinde kullanılan tampon çözeltiler

#### 1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline) (PBS) pH 7.4

NaCl .....	8.0 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	2.9 gr
veya	
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	2.3 gr
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	1.44 gr
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Susuz) .....	1.15 gr
KCl .....	0.2 gr
NaN <sub>3</sub> .....	0.2 gr

Miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 NaOH veya 0.1 N HCL ile ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

#### 2.Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer), pH = 9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	1.59 gr
NaHCO <sub>3</sub> .....	2.93 gr
NaN <sub>3</sub> .....	0.2 gr

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

#### 3. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer)

Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu .....	1 litre
Tween-20 .....	0.5 ml

1 litre PBS tamponuna 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek tampon hazırlanmıştır. Kullanım süresince 4 °C'de saklanmıştır.

#### 4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

#### 5. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Congugate Buffer )

Örnek tamponu .....	1 litre
Ovalbumin (egg albumin) .....	2 gr

1 litre örnek tampon çözeltisi içersine %0.2 oranında ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

**6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrat Buffer) pH 9.8**

Diethanolamine ..... 9.7 ml

NaN<sub>3</sub> ..... 0.02 gr

9.7 ml Diethanolamine 80 ml saf su içine ilave edildikten sonra, 0.02 gr NaN<sub>3</sub> ilave edilmiş ve HCl ile pH'sı 9.8'e ayarlanarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH'sı kontrol edilmiştir.

## **EK 2.**

### **Total RNA analizlerinde kullanılan solüsyonlar**

**1. Ekstraksiyon bufferı** (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl.....2.4228 gr

ADTA.....3.7224 gr

NaCl.....5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml ye tamamlamıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

### **2. % 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)**

20 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

### **3. Potasium asetat (CH<sub>3</sub>COOK) (5M)**

49.075 gr potasium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

### **4. Sodium asetat CH<sub>3</sub>COONa (3M)**

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

### **5. % 70'lik Ethanol**

70 ml %99' luk ethanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70 lik ethanol hazırlanmıştır.

## ÖZET

Bu araştırma Şanlıurfa il ve ilçelerinde güllerde Erik Nekrotik Halkalı Leke Virüs (PNRSV)'ünü saptamak için yapılmıştır. Yapraklarda sararma, benekleşme ve klorotik lekeler, yaprak alanında küçülme ve boğum aralarında kısalma biçimlerinde simptomatolojik belirti gösteren 19 örnek toplanmıştır. Örnekler Şanlıurfa Merkez, Birecik Merkez ve Bozova Merkez'inde resmi parklardan ve bahçelerinden Mayıs 2005 döneminde toplanmıştır.

Toplanan 19 örneğin dört tanesi (%21.05) ELISA yöntemiyle Prunus Necrotic Ring Spot Virüsü ile bulaşık olarak tespit edilmiştir. Aynı örneklere RT-PCR yöntemi uygulandığında ise bu oran %31.57 olarak belirlenmiştir.

PNRSV'ne özgü primerler ile yapılan moleküler çalışmalarda ise agaroz jelde kullanılan primerlere özgü 605-612 arasında değişen bir büyüklük saptanmıştır. Hastalık ilk kez bölgede güllerde bu çalışmayla ortaya konmuştur.

## **SUMMARY**

This study was carried out to identify of Prunus Necrotic Ring Spot Virus on rose plants in Şanlıurfa province and districts in May 2005. Rose samples (19) were collected from public gardens in May. Samples were expressing chlorotic patches, mottling, decreasing of leaf lamina and shortening of internot on the foliage.

RT-PCR analysis of the samples revealed that six (%31.57) of 19 PNRSV plants were infected whereas infection was detected in only four samples (%21.05) by ELISA. The RT-PCR primers derived 605-612 nucleotid long fragments in the infected samples.

This is the first report that rose plants infected with PNRSV in this region.