

Molecular Characterization of Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) and Grapevine Rupestris Stem Pitting-Associated Virus (GRSPaV) Vineyards in the Kırşehir

Yusuf Bayan (Corresponding author)

Ahi Evran University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 40200 Kırşehir, Turkey
yusufbayan@gmail.com

Melih Yılar

Ahi Evran University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 40200 Kırşehir, Turkey

Abstract

This study, was conducted to investigate the presence of Grapevine fanleaf virus (GFLV) and Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) which causes significant loss of yield and quality in vineyard areas. 49 specimens of 16 vineyards were collected from Kırşehir provinces and districts. Viral RNAs isolated from the samples were tested with viruse-specific primer sequences in a two-step RT-PCR test. RT-PCR analysis revealed that 49 samples collected were not infected with GRSPaV. The collected 49 samples, 5 were only found to be contaminated with GFLV. GFLV, was quite high in samples from Kaman (20.0 %), followed by Akcakent (10.0 %), Akpınar (8.3 %) and center (0.0 %). As a result, it was determined that GFLV is more common than GRSPaV in cases collected from Kırşehir provinces.

Keywords: GFLV, GRSPaV, RT-PCR, Kırşehir.

Kırşehir İli Bağ Alanlarında Asma Kısa Boğum Virüs (GFLV) ve Asma Gövde Çukurlaşma ile İlişkili Virüs (GRSPaV)'ün Moleküler Karakterisyonu

Özet

Bu çalışma, bağ alanlarında önemli verim ve kalite kaybına neden olan Asma gövde çukurlaşma virüsü (Grapevine rupestris stem pitting-associated virus, GRSPaV) ve Asma kısa boğum virüsü (Grapevine fanleaf virus, GFLV)' nün varlığının araştırılması amacıyla yürütülmüştür. Kırşehir il ve ilçelerinden 16 bağ alanında toplam 49 örnek toplanmıştır. Örneklerden izole edilen viral RNA'lar, iki aşamalı RT-PCR testinde virüse spesifik primer dizinleriyle testlenmiştir. Yapılan RT-PCR analizi sonucunda toplanan 49 örnekte GRSPaV'ü ile enfekteli olmadığı belirlenmiştir. Toplanan 49 örnekte 5 tanesinde ise GFLV ile bulaşık olduğu moleküler olarak belirlenmiştir. GFLV'ün enfeksiyonunun Kaman ilçesinden alınan örneklerde en yüksek bulunurken (%20), bunu sırasıyla Akcakent (%10), Akpınar (%8,3) ve Merkez (%0) izlemiştir. Sonuç olarak Kırşehir il ve ilçelerinden toplanan örneklerde GFLV'ün GRSPaV'ünden daha yaygın olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: GFLV, GRSPaV, RT-PCR, Kırşehir.

*Bu çalışma, International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOP 2017 Cappadocia / Turkey) da sunulmuş ve özet olarak basılmıştır.

1. Giriş

Ekonomik olarak büyük öneme sahip asma, ılıman iklimli yerlerde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Ancak yetiştiriciliği sınırlayan önemli biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerden en önemli faktör biyotik bir etmen olan virüslerdir. Virüsler ekonomik olarak ürününde verim ve kalitesinde, asma ömründe büyük zararlara neden olmaktadır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Serolojik, biyolojik ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerle Türkiye’de bağcılığın önemli olduğu birçok alanda “Sertifikaasyon” listesindeki virüslerin bazıları rapor edilmiştir. Ancak ülkemizdeki genetik çeşitlilikleri bilinmediğinden, izolat-spesifik serolojik ve moleküler tanılamaya yönelik eksiklikler bulunmaktadır. Virüslerin bir kısmı (GRSPaV, GVA, GLRaV-1, -2, -3, -5; -4, -6, -7, 9) Türkiye’de birçok yerde rapor edilmiştir (Köklü ve ark., 1998; Akbaş ve ark., 2007; Kaya ve ark., 2012; Buzkan ve ark., 2015). Ancak Kırşehir ilinde bağ alanlarında bu güne kadar kapsamlı bir çalışma yapılmamış, ancak Akbaş ve ark., (2007) yılında yaptıkları bir çalışmada Kırşehir ilinden 35 örnek toplamışlar, 4 örnekte sadece GLRaV-1 virüsü belirlemişlerdir.

Asma gövde çukurlaşma-ilişkili virüsü, dünyadaki bağ alanlarında çok yaygın görülen bir virüsdür. GRSPaV, *Vitis rupestris* St. George indikatör bitkisine aşılandığında aşı noktasından yukarıya doğru oluk ve çöküntü çizgileri oluşturmaktadır. Enfekteli *V. vinifera* kültürlerinin gelişiminde yavaşlama meydana gelmektedir. Bu etmen salkım tanelerinde olgunlaşmayı geciktirmekte, ürün kayıplarına ve ürünündeki şeker içeriğinin azalmasına sebep olmaktadır (Goheen, 1989; Meng ve ark., 1999; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

Asma yapraklarındaki deformasyonlar, yeni gelişen bağ alanlarında asmada cüce kalma, yapraklarda karakteristik damar bantlaşması, beneklenme, sonucunda zayıf gelişme asmanın meyve kalitesini ve yaşam süresini azaltma gibi semptomlara Asma kısa boğum virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) sebep almasının yanında bağ alanlarında %80’e varan verim kayıplarına neden olmaktadır (Andret-Link ark., 2004; Martelli ve Savino, 1991). GFLV virüsü tüm dünyadaki bağ alanlarında yaygın olarak görülmekte olup tüm *Vitis* türlerinde zarar oluşturmaktadır (Martelli ve Savino, 1991; Martelli ve ark., 2000). GFLV’nin doğal konukçu çeşidi *Vitis* türleri ile sınırlıdır. GFLV asmadan asmaya taşınması doğal koşullar altında Longidoride nematodu olan *Xiphinema index* taşıyıcı vektörü ile gerçekleşir (Martelli ve ark., 2000). Virüsün uzun mesafelere yayılması enfekteli üretim materyalleri ile olur (Martelli ve Savino, 1991). GFLV ülkemizde bir çok araştırmacı tarafından serolojik ve biyolojik indeksleme yolu ile belirlenmiştir (Özaslan ve ark., 1991; Akbaş ve Erdiller., 1993). Ancak moleküler olarak bu virus hastalığı hakkında detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile Kırşehir il ve ilçelerinde bağ alanlarında moleküler olarak GRSPaV ve GFLV’nün bulunma durumu araştırılacaktır. Ayrıca bu virüslerden hangisinin bölgede daha yaygın olarak bulunduğu ortaya konacaktır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmanın araştırma materyallerini Kırşehir İl ve İlçeleri bağ alanlarından toplanan asma yaprak örnekleri oluşturmuştur. Virüsün belirlenmesi amacıyla, survey çalışmaları 2016 yılında yapılmıştır. Örnek toplanan bağ alanlarına bakıldığında genel görünüm olarak Kamanda bağ alanlarının diğer ilçelere göre daha bakımlı ve düzenli bir bağcılığın yapıldığı gözlemlenmiştir. Kırşehir İl ve İlçelerinden 16 bağ alanından alınan 49 adet örnek toplanmıştır. Örneklerin ilçelere göre dağılımı Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Kırşehir-merkez ve ilçelerinden toplanan örnek sayıları

Lokasyonlar	Bağ sayısı	Toplanan örnek sayısı
Kırşehir-Merkez	4	12
Akçakent	3	10
Akpınar	4	12
Kaman	5	15
Toplam	16	49

Toplanan 49 örnek soğuk termostat ile laboratuara getirilmiş ve toplam nükleik asit izolasyonu yapıncaya kadar -80° de muhafaza edilmiştir.

2.2. Total RNA Ekstraksiyonu

Toplanan örneklerden toplam nükleik asit izolasyonu Thermo scientific firmasından elde edilen genejet plant RNA purification mini kiti(K0801) ile RNA ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon için ufak parçalara ayrılmış 100 mg yaprak dokusu lysis tüpleri içerisine konulmuş ve üzerlerine 500 µl lysis buffer eklenerek homojenize edilmiştir. Daha sonra oluşan solüsyon karıştırılarak 5 dakika (dk) 56 °C 'de inkübasyona bırakıldı. Sonra 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üzerinde kalan sıvı kısımdan 400µl alınarak temiz tüpe aktarıldı. Üzerine 250 µl %96 etil alkol ilave edildi pipetle yardımıyla iyice karıştırıldı. Daha sonra toplama tüpüne aktarılarak 11000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra sıvı kısım atıldı kolanda kalan kısım üzerine 700 µl Wash Buffer WB 1 ilave edilerek 11000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım tekrar atıldı kolanda kalan kısım üzerine 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilerek 11000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve bu işlem tekrarlandı. Tüpte kalan kısım üzerine nekleazsız 50 µl su ilave edildi ve 1 dk santrifüj yapıldı sıvı kısım alınarak -20 °C 'de kullanıncaya kadar muhafaza edildi.

2.3. Tersine Transkripsiyon (Reverse Transcription, RT) Tamamlayıcı DNA (cDNA, complementary DNA) sentezi

TNA izolasyonu yapılan örnekler PCR aşamasından önce aşağıdaki adımlarla tamamlayıcı tersine transkripsiyon ile cDNA sentez aşaması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda 7 µl RNA, 2 µl Random Primer (Thermo Scientific, ABD) (0.5 µg/µl) ile karıştırılarak dH₂O ile 13 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 95 °C'de 5 dak tutulup, hemen ardından buz dolu kaplarda 3 dak şok soğutma yapılmıştır. Soğuk ortamdan alınan örnekler üzerine oda sıcaklığında içinde 0.8 µl 200 U/µl *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific, ABD), 10 µl 5X RT buffer, 2.5 µl 10 mM dNTP eklenmiştir. Reaksiyon 42 °C'de 90 dak bekletilmiş ve ardından 70 °C'de 10 dak ile sonlandırılmıştır. PCR çalışmasında kullanılan primer çifti virüs genomunun ORF1 Helikaz bölgesinden hazırlanmıştır.

2.4. Polimeaz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR reaksiyonu 25 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Karışıma, 3 µl cDNA, 2,5 µl 10X PCR thermal reaction Buffer 1,70 µl 25 mM MgCl₂ 2 µl 10 mM dNTP, 1,5 µl virüs spesifik homolog ve heterolog primerler ve 0,15 µl 5 U/µl *Taq* DNA polimeraz (Thermo scientific, ABD) eklenmiştir. PCR koşulları, RSP13-RSP14 çifti için 94 °C'de 5 dakika ile başlangıç, 35 döngünün her biri için 94 °C'de 10 saniye, 52 °C'de 10 sn 72 °C'de 60 sn şeklinde kullanılmıştır. Final uzatma 72 °C'de 10 dakika olarak belirlenmiştir (Terlizzi ve ark., 2011). GFLV için ise 94 °C'de 4 dakika ile başlangıç, 35 döngünün her biri için 94 °C'de 30saniye, 50 °C'de 60 sn 72 °C'de 60 sn şeklinde kullanılmıştır. Final uzatma 72 °C'de 10 dakika olarak belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Kırşehir İl ve İlçelerinden 49 adet bağ sürgün örneği toplanmıştır. Toplan tüm örneklerin toplam nükleik izolasyonu yapılmış ve daha sonra bu nükleik asitlerden viral komplementer cDNA sentezi yapılmıştır. Yapılan cDNA'alar kullanılarak virüse özgü primer çiftleri ile iki aşamalı RT-PCR yapılarak örneklerdeki virüsün araştırılması yapılmıştır.

Yapılan RT –PCR analizi sonucunda kırşehir ilçelerinde toplam 5 tane örneğin GFLV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Bu 5 örnek Akpınarda 1, Akçakente 1 Kamanda 3 tane pozitif olarak belirlenmiştir. Merkezde ise pozitif örnek bulunamamıştır. GFLV'nin ilçe bazında yaygınlığına bakıldığında en yaygın görülen ilçenin Kaman olduğu onu sırasıyla Akçakent, Akpınar ve Merkezin izlediği görülmektedir(Çizelge 2).

Çizelge 2. Kırşehir il ve ilçelerinde toplanan örnek sayıları ve virüslerin bulunma yüzdeleri

	İlçeler	Bağ sayısı	Örnek Alınan Lokasyon	GRSPaV enfekteli Örnek / Toplam örnek	GFLV enfekteli Örnek / Toplam örnek	GFLV'ün bulunma oranı (%)
KIRŞEHİR	Merkez	4	Yenice Mahallesi	12/0	12/0	0
			Golhisar			
	Akpınar	3	Deveci	12/0	12/1	%8,3
			Pekmezci			
	Akçakent	4	Tepefakılı	10/0	10/1	%10
			Hamzabey			
	Kaman	5	Nazım bey	15/0	15/3	%20
Lokman Avşar çiftliği						
		16	49/0	49/5	%10,2	

Tüm il ve ilçelerden toplanan 49 örnekten 5 tanesi GFLV ile enfekteli olduğu RT-PCR ile belirlenmiş ve moleküler tanılaması yapılmıştır. İl genelinde virüsün yaygınlığı ise %10.02 olarak belirlenmiştir. GFLV ülkemizde bir çok araştırmacı tarafından serolojik ve biyolojik indeksleme yolu ile belirlenmiştir (Özaslan ve ark., 1991; Akbaş ve Erdiller., 1993). Ancak moleküler olarak Kırşehir’de ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışma kapsamında toplanan 49 örnek GRSPaV’in RPS-13 ve RPS-14 primer çifti ile taranmış ancak herhangi bir enfekteli örnek yapılan RT-PCR sonucunda belirlenmemiştir. Bu virüsün belirlenmesi için daha çok sayıda örnekle çalışılmalı yada geniş kapsamlı diğer illerde örnekler toplanmalıdır. Ayrıca bu çalışma örnek sayımızın sınırlı olmasından yada virüsün gezilen bağ alanlarında olamamasından dolayı da virüsle enfekteli örnek saptanamamış olabilir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda İlde bağcılık yapan çiftçiler şunlara dikkat etmelidir. Bağ alanlarında virüslerin yayılmasındaki en büyük etken bulaşık materyal kullanımudur. Yeni tesis edilecek bağ alanlarında virüsten ara sertifikalı materyal kullanılmalıdır. Son yıllarda bağcılığın geliştiği ülkemizde bölgeler arasındaki fidan transferi ve yurt dışından resmi ya da gayri resmi yollarla getirilen fidanların virüsle enfekteli olup olmadığı testlenmelidir. Ülkemizde bağcılığın daha da gelişmesi için sertifikalı ve virüsten arı materyal kullanılarak gerek verim artışı gerekse uzun ömürlü bağcılığın yapılmasına büyük katkı sağlayacaktır.

4. Sonuç

Sonuç olarak bağ alanlarında önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan GRSPaV ve GFLV’ün Kırşehir il ve İlçelerinden toplanan 49 adet örnekte bulunma durumları araştırılmış. Yapılan RT-PCR analizi sonucunda GRSPaV’ün toplanan 49 örnekte bulunmadığı belirlenmiş. Kırşehir İl ve İlçelerinde toplanan 49 örneklerden 5 tanesinin GFLV ile enfekteli olduğu moleküler olarak saptanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası **ZRT.A3.16.006**.

Kaynaklar

Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E., 2006. Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-Like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. Options Méditerranéennes, ser.B 55 pp.

- Köklü, G., Digiario, M., Savino, V. 1998. A survey of grapevine viruses in Turkish Thrace. *Phytopathologia Mediterranea*. 37: 140-142.
- Akbaş, B, Kunter, B., İlhan, D. 2007: Occurrence and Distribution of Grapevine Leafroll-associated Viruses 1, 2, 3 and 7 in Turkey. *Journal of Phytopathology*. 155: 122–124.
- Kaya, A., Erilmez, S., Paylan, I.C. and Erkan, S., 2012. First Report of Grapevine Leafroll-associated Virus 4 in Vineyards of Turkey. *Plant Disease*, 96, 8, 230.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A., Ben-Dov, Y. 2010. First Report of the Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus-5* in Turkish Vineyards. *Journal of Phytopathology*. 158: 448–449.
- Goheen, A.C., 1989. Virus Diseases and Grapevine Selection. *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 67-72.
- Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P. L. Gonsalves, D., 1999. Rupestris Stem Pitting-Associated Virus-1 is Consistently Detected in Rupestris Stem Pitting-Infected Grapevines. *Eur J Plant Pathol* 105, 191–199.
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V. and Fuchs, M. 2004. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, 320, 12–22.
- Martelli, G.P. and Savino, V. 1991. Fanleaf degeneration. In: *Compendium of Grape Diseases* (Pearson, R.C. and Goheen, A., eds), pp. 48–49. St. Paul, MN: APS Press.
- Martinelli, L., Costa, D., Poletti, V., Festi, S., Buzkan, N., Minafra, A., Saldarelli, P., Martelli, G.P. and Perl, A. (2000) Genetic transformation of tobacco and grapevine for resistance to viruses related to rugose wood disease complex. *Acta Hort*. 528, 321–327
- Özaslan, M., Baloğlu, S., Yılmaz, M.A. 1991. Kahramanmaraş Bölgesinde lokal olarak yetiştirilen üzüm çeşitlerinde virüs hastalıkları VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, Türkiye. Fitopatoloji Derneği. 401-406.
- Akbaş, B , Erdiller, G., 1993. Researches on grapevine virüs diseases and determination of them incidences in Ankara, Türkiye. *Journal of Turkish Phytopath. Soc* Vol: 22(2-3) 47-54
- Terlizzi, F., Ratti C., Filippini G., Pisi A., Credi R., 2011. Detection and Molecular Characterization of Italian Grapevine Rupestris Stem Pitting-Associated Virus Isolates. *Plant Pathology*, 59, 48–58.