Ç. Ü.
Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
Tarımsal Araştırmalar Gn. Md.
Adana Zirai Mücadele Arşt. Ens. Md.

VII. TÜRKİYE FİTOPATOLOJİ KONGRESİ

BİLDİRİLER

26 - 29 EYLÜL 1995
ADANA

MARUL İRİ DAMAR VİRUSUNUN MEKANİKSEL İNOKULASYONLA TAŞINMASI VE TEST BİTKİLERİ İLE İLİŞKİLERİ

Serap AÇIKGÖZ* Erkol DEMİRCİ * M.Timur DÖKEN **

* Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 25240 Erzurum
** Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Aydın

ÖZET

Marul iri damar virüs (LBVV)'unun çeşitli test bitkilerine mekaniksel olarak taşınmasındaki başarı, inokulum kaynağının -20 °C'de bir gün tutulup çözündürülmeden ezildikten sonra sodyum disülfit, DIECA ve charcoal içeren fosfat tampon solüsyonda homojenize edilmesine bağlı olduğu ortaya konmuştur. LBVV'unun lokal lezyon konukçusu olduğu bilinen *Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quinoa* yanında lokal lezyon ve/veya sistemik simptom sergileyen *Datura stramonium* , *Lycopersicum esculentum* , *Nicotiana tabacum* (Havana, Samsun NN, Samsun type, White Burley, Xanthi), *Nicotiana glutinosa* , *Physalis floridana* ve *Vigna sinensis* test bitkilerinin virüsun konukçu çevresi için yeni kayıt olduğu bu çalışma ile saptanmıştır. Ayrıca virüsun çoğaltım konukçusu olarak bilinen *C. quinoa* yanında sistemik simptom sergileyen *N. tabacum* White Burley'nin de çoğaltım konukçusu olduğu ve her iki çoğaltım konukçusunda etmenin -20 °C'de uzun süre saklanabileceği saptanmıştır.

SUMMARY

Mechanical Transmission of Lettuce Big-vein Virus (LBVV) and its Relations with Test Plants

The success in mechanical transmission of lettuce big-vein virus (LBVV) to various test plants was found to be depending upon the homogenizing of the inoculum source within a phosphate buffer containing sodium disulphite, DIECA and charcoal after being squashed without thawing the source of inoculum which kept at -20 °C for one day. *Datura stramonium, Lycopersicum esculentum, Nicotiana tabacum* (Havana, Samsun NN, Samsun type, White Burley, Xanthi), *Nicotiana glutinosa, Physalis floridana* and *Vigna sinensis* which exhibited local and/or sistemic symptoms were included as new records to the host range of the virus which was known to be producing local lesions on test plants *Chenopodium amaranticolor* and *Chenopodium quinoa*. Further more it was determined that *N. tabacum* White Burley was the propagative host plant of the virus besides the known *C. quinoa* and in both hosts the causal agent could be preserved at -20 °C for a long period without inactivation.

GİRİŞ

İri damar virüs hastalığı marul yaprak damarlarında renk açılması, bandlaşma şeklinde ortaya çıkmakta ve zayıf baş bağlamaya neden olmaktadır (Smith, 1972). Dünyanın çeşitli bölgelerinde var olduğu bildirilen (Tomlinson ve Smith, 1958; Van Hoof, 1959; Huijberts ve ark., 1990; Döken ve ark., 1993) marul iri damar hastalığının topraktan kaynaklandığı ve etmeninin virüs olabileceği ilk olarak Kaliforniya'da (USA) yapılan bir

* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiş TBAG-1120 nolu projenin bir bölümüdür

çalışmada ileri sürülmüştür (Jagger ve Chandler, 1934). Yaygın olarak *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. ile taşındığı bildirilen (Campbell ve Grogan, 1963; Tomlinson ve Garrett, 1964) marul iri damar Virüs (LBVV)'unun aynı zamanda aşı ile de taşındığı saptanmıştır (Campbell ve ark., 1961). Uzun yıllar LBVV'u, enfekteli marul bitkilerinden elde edilen bitki özsuyu ile test bitkilerine taşınamamıştır. (Thompson ve ark., 1944; Campbell ve Grogan, 1963; Tomlinson ve Garrett, 1964; Iwaki ve ark., 1978; Westerlund ve ark., 1978). Huijberts ve ark. (1990), kara hindiba sarı mozaik virüsu (DYMV)'nun taşınmasında kullanılan özel bir fosfat tampon solüsyonunu (Bos ve ark., 1983) kullanarak LBVV'unun mekaniksel inokulasyonla test bitkilerine taşınabileceğini saptamışlardır.

Mekaniksel inokulasyonla taşınabileceği son zamanlarda saptanan LBVV 'unun konukçu test bitkilerine mekaniksel inokulasyonla taşınmasında en uygun yöntemi bularak, test bitkileri ile virüs arasındaki ilişkilerin saptanması bu çalışmanın amaçlarını oluşturmaktadır.

MATERYAL VE METOT

LBVV'u ile doğal enfekteli marul köklerinden elde edilen zoospor süspansiyonu ile sağlıklı marul köklerinin inokulasyonu sonucu elde edilen simptomlu marul bitkilerinin yaprak ve kökleri -20 ^{o}C'de 1 veya 30 gün bekletildikten sonra inokulum kaynağı olarak kullanılmışlardır. Virüsun mekaniksel inokulasyonla taşınmasında en uygun yöntemi saptamak için enfekteli dokuların homojenizasyonunda üç farklı tampon solüsyon kullanılmıştır; I. tampon: 0.01 M fosfat tamponu, pH 7.2 (Noordam, 1973), II. tampon: Sodyum disülfit ($Na_2S_2O_5$, 2.5 g/l), sodyum diethildithiokarbomat (DIECA, 5 g/l) ve aktive edilmiş charcoal (Norit, 70 g/l) içeren 0.03 M fosfat tamponu, pH 7.0 (Huijberts ve ark., 1990), III. tampon: 0.01 M DIECA içeren fosfat tamponu, pH 7.7 (Campbell ve Grogan, 1963). Enfekteli yaprak ve kökler ayrı ayrı -20 ^{o}C'de tutulan havan ve havan eli kullanılarak çözündürülmeksizin ezilip, kendi hacmi kadar 4 ^{o}C'de tutulan üç ayrı tampon solüsyonda homojenize edildikten sonra karborandum ile tozlanmış sağlıklı test bitkilerinin (Tablo 2) ayrı ayrı olmak üzere kök ve yapraklarına tülbent bez parçası ile sürülerek inokulasyonlar yapılmış ve takiben bitkiler musluk suyunda yıkanmıştır. Kökleri inokule edilen bitkiler derhal toprağa geri şaşırtılıp yaprakları inokuleli bitkilerle beraber 18-20 ^{o}C'de 16 saat 20.000 lux ışık ile aydınlatılan bitki büyütme kabinlerine yerleştirilerek oluşturacakları simptomlar yönünden izlenmeye alınmışlardır. Yukarıda belirtilen uygulamalar ile yapılan mekaniksel inokulasyonlar sonucu lokal lezyon gösteren,aynı zamanda virüs için iyi bir inokulum kaynağı ve çoğaltım konukçusu olduğu bildirilen *Chenopodium quinoa* (Huijberts ve ark., 1990) yanında sistemik simptom sergileyen *Nicotiana tabacum* White Burley bitkilerinin yaprakları hasad edilip -20 ^{o}C'de depolandıktan sonra mekaniksel inokulasyonda en iyi sonucu veren II. tampon solüsyon kullanılarak marul dahil test bitkilerinin yapraklarına yukarıda anlatıldığı şekilde inokulasyonlar yapılmıştır. Bunun sonucunda *C. quinoa* yanında sistemik simptom sergileyen *N. tabacum* White Burley'nin de LBVV'u için çoğaltım konukçusu olma durumu incelenmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

LBVV ile enfekteli marul yaprak ve kökleri -20 ^{o}C'de 30 gün bekletilip üç ayrı tampon solüsyonda homojenize edildikten sonra yapılan mekaniksel inokulasyonlardan hiç

bir sonuç alınamamıştır. Buna karşın -20 °C'de 1 gün tutulan marul yaprak ve kökleri ile yapılan mekaniksel inokulasyonlarda II. ve III. tampon solüsyonların kullanılması halinde test bitkilerinin büyük çoğunluğunda çeşitli simptomlar gözlenirken, I. tampon solüsyonu ile yapılanlarda herhangi bir simptom oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 1). Maruldan test bitkilerinin köklerine yapılan inokulasyonlarda II. tampon solüsyonun kullanılması halinde yaprak ve kökün, III. tampon solüsyonu ile yapılan uygulamada ise sadece yaprağın inokulum kaynağı olarak kullanılması sonucu test bitkilerinin bir kısmı sistemik simptom sergilemiştir. II. ve III. tampon solüsyonlar kullanılarak marul yaprak ve kökünden test bitkilerinin yapraklarına yapılan inokulasyonlarda ise test bitkilerinde lokal lezyon ve/veya sistemik simptom gözlenmiştir. Ayrıca inokulum kaynağı olarak marul yaprağının ve homojenizatör olarak II. tampon solüsyonun kullanılması halinde test bitkilerinde oluşan simptomların (Çizelge 2) diğerlerine göre daha çarpıcı olduğu saptanmıştır. Nitekim, bu kombinasyonda test bitkilerinde oluşan sistemik simptomların daha tahripkar, lokal lezyon sayılarının ise daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 1. Marul iri damar virüsu ile enfekteli marul yaprak ve kökleri -20 °C'de 1 gün tutulduktan sonra farklı tampon solüsyonlar kullanılarak test bitkilerine yapılan mekaniksel inokulasyonlardan elde edilen sonuçlar.

Tampon solüsyon	İnokulum kaynağı	İnokulasyonun yapıldığı bitki aksamı*	
		Yaprak	Kök
I. tampon	Yaprak	-	-
	Kök	-	-
II. tampon	Yaprak	++	+
	Kök	++	+
III. tampon	Yaprak	++	+
	Kök	++	-

* -: taşınma olmadı, +: sistemik simptom, ++: lokal lezyon ve/veya sistemik simptom.

LBVV ile mekaniksel olarak inokule edilen *C. quinoa* 'nın lokal lezyon ve N. tabacum White Burley'nin sistemik simptom sergileyen yapraklarından II. tampon solüsyon kullanılarak Tablo 2'de verilen test bitkilerinin yapraklarına yapılan mekaniksel inokulasyonlar sonucunda oluşan simptomlar virüs konsantrasyonunun bu iki test bitkisinde yükseldiğini göstermektedir. Örneğin her iki test bitkisinden yapılan inokulasyonlar sonucu *C amaranticolor* yapraklarında oluşan lokal lezyon sayılarının (180-250 adet LL/yaprak) marul yaprağından yapılan inokulasyonlara (2-4 adet LL/yaprak) göre mukayese edilemeyecek kadar çok fazla olduğu ve yine *C. quino* a yapraklarındaki lokal lezyonların ise iri ve belirli bir sınıra sahip olmadığı için tüm yaprağın sararması

şeklinde ortaya çıktığı saptanmıştır. Ancak bu iki test bitkisinden marula yapılan geri inokulasyonlardan sonuç alınamamıştır. Ayrıca bu iki test bitkisinin enfekteli yapraklarının -20 °C'de uzun süre (30 günden fazla) depolanmasını takiben her üç tampon solüsyonun kullanılması ile yapılan mekaniksel inokulasyonlarda test bitkilerinin simptom oluşturduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Marul iri damar virüsunun çeşitli test bitkilerinde sergilediği simptomlar.

Test bitkileri	Gözlenen simptom*
Chenopodium amaranticolor	KLL
Chenopodium quinoa	KLL
Cucumis sativus	-
Datura stramonium	NLL
Gomphrena globosa	-
Lycopersicum esculentum	SS
Nicotiana tabacum Havana	NLL, SS
Samsun NN	NLL
Samsun type	SS
White Burley	SS
Xanthi NLL,	SS
Nicotiana glutinosa NLL,	SS
Physalis floridana	SS
Vigna sinensis	SS

*KLL: klorotik lokal lezyon, NLL: nekrotik lokal lezyon, SS: sistemik simptom, simptom gözlenmedi.

LBVV 'unun marul bitki özsuyunda stabil olmaması ve düşük konsantrasyonda bulunması (Huijberts ve ark., 1990) uzun yıllar boyunca uygulanan birçok mekaniksel inokulasyon yönteminin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmuştur. LBVV'u ile enfekteli maruldan elde edilen bitki özsuyuna stabilizasyonu sağlamak için çeşitli madde ve tamponların ilavesi (Thompson ve ark., 1944; Campbell ve Grogan, 1963; Tomlinson ve Garrett, 1964; Westerlund ve ark., 1978), Olpidium zoosporlarından fenol ekstraklarının kullanılması (Campbell ve Grogan, 1964), konukçu bitkilerin karanlık peryodda bırakılıp enfekteli dokuyu 2 °C'de homojenize etmek (Iwaki ve ark., 1978) gibi uygulamalar virüsun mekaniksel inokulasyonla taşınması için yeterli olmamıştır. Başarılı mekaniksel inokulasyon için enfekteli marul dokularının sodyum disülfit, DIECA ve charcoal içeren özel tampon solüsyonlar içerisinde çözündürülmeden homojenize edilmesi yanında tampon solüsyonun 4 °C'de, havan, havan eli ve enfekteli dokunun -20 °C'de 1 gün bekletilmesi gerekmektedir. Nitekim Campbell ve Grogan (1963), III. tampon solüsyonu kullanarak yaptıkları mekaniksel inokulasyondan sonuç alamazken, yukarıda belirtilen koşullar yerine getirilerek bu çalışmada Huijberts ve ark. 1990'nın belirttiği gibi III. tampon solüsyonun kullanılması durumunda da maruldan test bitkilerine Virüsun taşınabileceği saptanmıştır. Huijberts ve ark. (1990)'nın sonuçlarına paralel olarak II. tampon solüsyonun kullanılması halinde test bitkilerinde oluşan simptomların daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

Doolittle ve Thompson (1945)'ın enfekteli marul köklerinden elde ettiği bitki özsuyu ile yaptıkları taşımayı Allen (1948), olaya vektör zoosporlarının aktivitesinin yol açtığını ileri sürerek gerçek bir özsuyu taşıması olarak kabul etmemiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre, marul yapraklarının inokulum kaynağı olarak kullanılması halinde test bitkilerinde oluşan simptomların, marul köklerinin kullanıldığı inokulasyonlara göre daha çarpıcı olduğu saptanmıştır. Nitekim, LBVV'unun kök ekstraklarına göre yaprak ekstraklarındaki antiserum ile ELISA değerlerinin daha yüksek olması (Vetten ve ark., 1987) bulgularımızı desteklemektedir. Bütün bu nedenlerden dolayı LBVV'unun bitki özsuyu ile taşınmasında inokulum kaynağı olarak -20 °C'de 1 gün tutulan marul yapraklarının ve tampon solüsyon olarak da II. tampon solüsyonun kullanılmasının en başarılı sonucu verdiği ortaya çıkmaktadır.

LBVV 'unun çalışmada kullanılan test bitkilerinin (Çizelge 2) büyük çoğunluğunda lokal lezyon ve/veya sistemik simptom oluşturduğu saptanmıştır. Nitekim virüsun *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* 'da lokal lezyon oluşturduğu, ayrıca 'nın etmen için mükemmel bir inokulum kaynağı ve çoğaltım konukçusu olduğu bildirilmiştir (Huijberts ve ark., 1990). *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* ları Çizelge 2'de simptom sergileyen diğer test bitkileri LBVV' unun konukçu çevresi için yeni kayıttır. *C. quinoa* ve *N. tabacum* White Burley'nin simptomlu yapraklarının inokulum kaynağı olarak kullanılması durumunda *C. amaranticolor* yapraklarında lokal lezyon sayısındaki büyük artış LBVV ' unun bu test bitkilerinde konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Ayrıca bu iki test bitkisinin enfekteli yapraklarının -20 °C'de uzun süre depolanması sonucu etmenin inaktifleşmediği de saptanmıştır. Marul bitkisinden LBVV 'unun partikül pürifikasyonundaki başarısızlık da (Vetten ve ark., 1987), etmenin marul bitki özsuyunda stabil olmaması ve düşük konsantrasyonda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, virüs 30 gün -20 °C'de bekletilen enfekteli marul dokularından bitki özsuyu ile test bitkilerine taşınamamıştır. LBVV'unun partikül pürifikasyonu ve nükleik asit izolasyonunda virüsun stabil ve konsantrasyonunun yüksek olduğu *C. quinoa* ve *N. tabacum* White Burley bitkilerinin kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

Allen, M.W., 1948. Relation of soil fumigation, nematodes, and inoculation technique to big vein disease of lettuce. Phytopathology 38: 612-627.

Bos, L., N. Huijberts, H. Huttinga and D.Z. Maat, 1983. Further characterization of dandelion yellow mosaic Virüs from lettuce and dandelion. Neth. J. Pl. Path. 89: 207-222.

Campbell, R.N. and R.G. Grogan, 1963. Big-vein Virus of lettuce and its transmission by Olpidium brassicae. Phytopathology 53: 252-259.

Campbell, R.N. and R.G. Grogan, 1964. Acquisition and transmission of lettuce big-vein by *Olpidium brassicae*. Phytopathology 54: 681-689.

Campbell, R.N., R.G. Grogan and D.E. Purcifull, 1961. Graft transmission of big vein of lettuce. Virology 15: 82-85.

Doolittle, S.P. and R.C. Thompson, 1945. Artificial transmission of the Virüs of big-vein of lettuce. Phytopathology 35: 484.

Döken, M.T., S. Açıkgöz and E. Demirci, 1993. Big-vein disease of lettuce in Erzurum, Türkiye. J. Turk. Phytopath. 22: 41-43.

Huijberts, N., D.R. Blystad and L. Bos, 1990. Lettuce big-vein virus: mechanical transmission and relationships to tobacco stunt Virüs. Ann.Appl. Biol. 116: 463-475.

Iwaki, M., A. Nakano, H. Iemura and H. Tochihara, 1978. The occurrence of lettuce big vein disease and its soil transmission in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 44: 578-584.

Jagger, I.C. and N. Chandler, 1934. Big vein, a disease of lettuce. Phytopathology 24: 1253-1256.

Noordam, D., 1973. Identification of Plant Viruses. Methods and Experiments. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 207 p.

Smith, K.M., 1972. A textbook of Plant Virus Diseases. Academic Press. New york and London, 648 p.

Thompson, R.C., S.P. Doolittle and F.F. Smith, 1944. Investigations on the transmission of big vein of lettuce. Phytopathology 34: 900-904.

Tomlinson, J.A. and R.G. Garrett, 1964. Studies on the lettuce big-vein virus and its vector Olpidium brassicae (Wor.) Dang. Ann. appl. Biol. 54: 45-61.

Tomlinson, J.A. and B.R. Smith, 1958. Big vein disease of lettuce in Britain. Plant Pathol. 7: 19-22.

Van Hoof, H.A., 1959. Bobbelblad bij sla. Tijdschrift over Planteziekten 65: 24-26.

Vetten, H.J., D.E. Lesemann and J. Dalchow, 1987. Electron microscopical and serological detection of virüs-like particles associated with lettuce big-vein disease. Journal of Phytopathology 120: 53-59.

Westerlund, F.V., R.N. Campbell and R.G. Grogan, 1978. Effect of temperature on transmission, translocation, and persistence of the lettuce big-vein agent and big-vein symptom expression. Phytopathology 68: 921-926.