

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Nevzat BİRİŞİK

**YUMUŞAK ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA GÖVDE
ZARARLANMALARINA NEDEN OLAN VİRAL ETMENLERİN
BİYOLOJİK, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YUMUŞAK ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA GÖVDE
ZARARLANMALARINA NEDEN OLAN VİRAL ETMENLERİN
BİYOLOJİK, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Nevzat BİRİŞİK

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez 30 / 06 / 2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği
İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
DANIŞMAN

İmza.....
Prof. Dr.Semih ERKAN
ÜYE

İmza.....
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
ÜYE

İmza.....
Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
ÜYE

İmza.....
Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK
Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: TÜBİTAK-TOVAG 1060303

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.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**YUMUŞAK ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA GÖVDE
ZARARLANMALARINA NEDEN OLAN VİRAL ETMENLERİN
BİYOLOJİK, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Nevzat BİRİŞİK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Yıl : 2009 Sayfa: 158

Jüri : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Semih ERKAN
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Bu çalışma Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerinde bulunan elma, armut ve ayva alanlarında 2006-2009 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmanın amacı; yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı Elma Gövde Çukurlaşma (*Apple stem grooving capillovirus*: ASGV) ve Elma Gövde Yivleşme (*Apple stem pitting foveavirus*: ASPV) virüs hastalıklarının saptanması, elde edilen izolatların karakterizasyonu ve bazı elma çeşitlerinin bu hastalıklara karşı reaksiyonlarının belirlenmesidir. Sürvey çalışmaları sonucunda 134 bahçeden alınan 619 elma, armut ve ayva örneğinin %18,41 oranında bu hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu ELISA testi ile belirlenmiştir. Hastalık etmenlerinin bulunma oranı sırasıyla ASPV % 10,34, ASGV %5,49 ve ASPV+ASGV % 2,58, konukçu türlerin enfeksiyon oranları ise armut % 19,35, elma %18,33 ve ayva %17,39 şeklinde tespit edilmiştir. Bu hastalık etmenlerinin varlığı moleküler ve biyolojik yöntemlerle doğrulanmıştır. Sürvey alanlarında yapılan makroskobik gözlemler sonucunda bu hastalıkların konukçuları üzerinde bazı belirtiler meydana getirdiği ve özellikle ASPV'nin ayva ve armut üzerinde ekonomik zarara neden olduğu tespit edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin konukçularına göre farklı biyolojik karakterlere sahip oldukları, karışık enfeksiyon halinde buldukları durumlarda daha tahripkar seyrettikleri, fakat moleküler düzeyde izolatlar arasında büyük bir fark olmadığı belirlenmiştir. Çeşit reaksiyon denemesi çalışmalarında, bu hastalık etmenlerinin bazı ticari elma çeşitlerinin gövde çapında ve odun dokusu kuru ağırlığında azalmaya, dal açılarında ise genişlemeye neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu etmenlerin bazı ticari elma çeşitlerinde floem nekrozu ve dallarda şişkinlik şeklinde belirtilere de yol açtığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ASPV, ASGV, elma, armut, ayva.

ABSTRACT

PhD THESIS

DETERMINATION AND CHARACTERIZATION OF VIRUSES ARE HARMFUL TO STEM TISSUE OF POME FRUIT TREES BY BIOLOGICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES

Nevzat BİRİŞİK

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Year : 2009 Pages: 158

Jury : Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Prof. Dr. Semih ERKAN
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
Asist. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

This study was carry out in Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde and Osmaniye provinces between years of 2006 and 2009. The aim of the study was determination and characterization of *Apple Stem Grooving Capillovirus* (ASGV) and *Apple Stem Pitting Foveavirus* (ASPV) on pome fruits and evaluation of the reactions of some commertial cultivars to the diseases. During the survey, 619 samples were collected from 134 orchards and, 18,41 % of the samples were founded as ASPV, ASGV or ASPV+ASGV infected by ELISA test. The incidence of the diseases were determined as 10,34 % ASPV, 5,49 %ASGV and 2,58 % ASPV+ASGV. The infection rate of the species were determined as 19,35, 18,33 and 17,39 % in pear, apple and in quince, respectively. The presence of these diseases was confirmed also by molecular and biological means. By the macroskobik observation of the diseases in survey area the study showed that, diseases are inducing some symptoms on the host plant especialy ASPV was resulting economical damage on quince and pear. ASPV and ASGV were determined that can have different biological activity on their host plants according their origin's. Impact of the diseases agents were very valuable in case of being mixed infection on the indicator plants. However, no any significant differences have been observed between isolates by the molecular characterisation. Moreover, the diseases were founded that they can reduce the trunk diameter and dryweight of the woody tissues, and increase the angle of the branches on some commertial cultivars. The floem necrosis and stem grooving symptoms on some susceptible commertial cultivars were observed in the reaction assay due to the ASPV and ASGV infections.

Key words: ASPV, ASGV, apple, pear, quince.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde yol göstericiliği ve deneyimiyle bana her konuda destek olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU'na çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca yumuşak çekirdekli meyve virüsleri konusunda yurt dışındaki çalışmalarında bana danışmanlık yapan, bu konuda bilgi ve tecrübe edinmemde çok büyük katkıları olan sayın Dr. Arben MYRTA'ya bu vesileyle minnetarlığımı ifade etmek istiyorum. Proje çalışmalarının planlanmasında ve sonuçların değerlendirilmesi aşamasında yetiştiricilikle ilgili yaptığı öneri ve katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ali KÜDEN'e teşekkür ediyorum.

Proje çalışmalarının yürütüldüğü Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsünün çok kıymetli yönetici ve çalışanlarına, bütün çalışmalarında bana verdikleri maddi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsünün çok kıymetli Müdür Yrd. Uzm. Suat KAYMAK ve Uzm. Mesut İŞÇİ'ye yardımlarından ve ilgilerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde verdikleri finansmandan dolayı en büyük pay sahiplerinden biri olan TÜBİTAK'ın çok değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkür ediyor saygılarımı sunuyorum.

Doktoramın en başından beri bana verdiği moral, destek ve gösterdiği sabrın yanında, bilim anlayışına ve çalışma disiplinime yaptığı çok kıymetli katkılarından dolayı sevgili eşim Dr. Günay BİRİŞİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVII
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Yumuşak Çekirdekli Meyvelerde Virüs Hastalıkları.....	6
2.2. Türkiye’de Yumuşak Çekirdekli Meyve Virüs Hastalıkları	8
2.3. Elmalarda Gövde Zararlanmalarına Neden Olan Virüs Hastalıkları..	9
2.3.1. Elma Gövde Yivleşme Virüsü (Apple Stem Pitting <i>Foveavirus</i> : ASPV).....	12
2.3.1.1. ASPV’nin Tespiti ve Özellikleri.....	12
2.3.1.2. ASPV’nin Konukçuları ve Yayılışı..	13
2.3.1.3. Hastalık Belirtileri.....	14
2.3.1.4. Hastalığın Ekonomik Önemi.....	16
2.3.1.5. Hastalığın Teşhisi ve Mücadelesi.....	16
2.3.2. Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (Apple Stem Grooving Capillovirus: ASGV).....	18
2.3.2.1. ASGV’nin Tespiti ve Özellikleri	18
2.3.2.2. ASGV’nin Konukçuları ve Yayılışı.....	19
2.3.2.3. Hastalık Belirtileri.....	20
2.3.2.4. Hastalığın Ekonomik Önemi.....	22
2.3.2.5. Hastalığın Teşhisi ve Mücadelesi.....	23
3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Metot.....	28

3.2.1. Sürvey Yapılacak Alanların Belirlenmesi.....	28
3.2.2. Sürvey Alanındaki Bahçelerden Örneklerin Alınması.....	29
3.2.3. DAS-ELISA Çalışmaları.....	30
3.2.4. Sürvey Alanlarında Makroskobik Gözlemler.....	31
3.2.5. Mekanik İnokulasyon.....	32
3.2.6. Odunsu İndikatör Bitkilere Aşılama.....	33
3.2.7. Enfekteli Bitki Dokularından Nükleik Asit İzolasyonu.....	36
3.2.8. Revers Transkripsiyon: RT.....	38
3.2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu: PCR.....	38
3.2.10.RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) Çalışmaları.. ..	40
3.2.11. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	42
3.2.12. Çeşit Reaksiyon Denemeleri.....	43
3.2.12.1. Çeşit Reaksiyon Deneme Planı.....	44
3.2.12.2. Gövde Çapının ve Ağaç Boyunun Belirlenmesi.....	46
3.2.12.3. Dal sayılarının ve Dal Uzunluklarının Belirlenmesi.....	46
3.2.12.4. Dal Açılarının Ölçülmesi.....	46
3.2.12.5. Yaprak Dokusu Kuru Ağırlığının Belirlenmesi.....	47
3.2.12.6. Odun Dokusu Kuru Ağırlığının Belirlenmesi.....	47
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	48
4.1. ASPV ve ASGV Virüs Hastalıklarının Saptanmasına Yönelik Sürvey ve Teşhis Çalışmaları.....	48
4.1.1. Sürvey Çalışmaları.....	48
4.1.2. Teşhis Çalışmaları	51
4.1.3. Sürvey ve Teşhis Çalışmalarının İller Bazındaki Sonuçları... ..	59
4.2. ELISA Testinin Optimizasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	63
4.2.1. Farklı DAS-ELISA Metotlarının Karşılaştırılması.....	63
4.2.2. ASPV ve ASGV'nin ELISA İle Teşhisi İçin En Uygun Örnekleme Zamanının Tespiti.....	65

4.2.3.ELISA Çalışmalarında Kullanılacak En Uygun Bitki Dokusunun Tespiti.....	68
4.2.4.ELISA Teşhis Çalışmalarında Kullanılacak Örneklerin Muhafazası.....	72
4.2.5.Dormant Dokuların Forse Edilerek ELISA Testlerinde Kullanılması.....	75
4.3. Sürvey Alanlarında Yapılan Makroskobik Gözlemler.....	76
4.3.1. ASPV İle İlgili Makroskobik Gözlemler.....	76
4.3.1.1.ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Görülen Meyve Belirtileri.....	77
4.3.1.2. ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Görülen Yaprak Belirtileri.....	81
4.3.1.3. ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Gözlenen Gövde ve Diğer Belirtiler.....	85
4.3.2.ASGV İle İlgili Makroskobik Gözlemler.....	87
4.4. ASPV ve ASGV Virüs Hastalıklarının Karakterizasyonu.....	90
4.4.1. Biyolojik Karakterizasyon.....	90
4.4.1.1. Hastalık Etmenlerinin Otsu indikatörlere Mekanik Olarak Taşınması.....	90
4.4.1.2. Hastalık Etmenlerinin Değişik Odunsu indikatörlere Aşılması.....	96
4.4.2. ASPV ve ASGV Hastalık Etmenlerinin Moleküler Karakterizasyonu.....	100
4.4.2.1. ASPV için Yapılan RT-PCR Çalışmaları.....	100
4.4.2.2. ASGV için Yapılan RT-PCR Çalışmaları.....	102
4.4.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfizim) Çalışmaları.....	103
4.5. Bazı Elma Çeşitlerinin ASPV ve ASGV Hastalık Etmenlerine Karşı Reaksiyonlarının Ölçülmesi.....	107
4.5.1. Morfolojik Karakterlerle İlgili Sonuçlar.....	108

4.5.2. Fiziksel Karakterlerle İlgili Sonuçlar.....	117
4.5.3. Çeşit Reaksiyon Denemesinde Yapılan Makroskobik Gözlemler.....	121
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	126
KAYNAKLAR.....	131
ÖZGEÇMİŞ.....	145
EKLER.....	146

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Dünyada önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelere ait 2007 üretim miktarları.....	2
Çizelge 1.2.	Dünyada ve Türkiyede yumuşak çekirdekli meyve ticaretine ait 2006 yılı verileri.....	3
Çizelge 1.3.	Çalışmanın yürütüldüğü illerde yumuşak çekirdekli meyve türlerine ait 2008 yılı verileri	3
Çizelge 2.1.	Yumuşak çekirdekli meyvelerde görülen önemli virüsler ve taşınma yolları	6
Çizelge 2.2.	ASGV ve ASPV'nin neden olduğu hastalıklar ve taşınma yolları.	11
Çizelge 2.3.	ASGV'nin tespit edilmiş başlıca ırkları.....	20
Çizelge 3.1.	Sürvey çalışmalarında örnek alınan iller, türler ve bahçe sayıları	28
Çizelge 3.2.	Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan otsu test bitkileri	33
Çizelge 3.3.	Odunsu bitkilere indeksleme çalışmasında kullanılan indikatör bitkiler	34
Çizelge 3.4.	RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerler	40
Çizelge 3.5.	RFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon enzimleri.....	41
Çizelge 3.6.	Çeşit reaksiyon deneme planı.	44
Çizelge 4.1.	Sürvey çalışmalarında örneklenen iller, türler ve alınan örneklerin yıllara göre dağılımı.	49
Çizelge 4.2.	Sürveylerde alınan örneklerin illere ve türlere göre DAS-ELISA sonuçları.....	52
Çizelge 4.3.	Sürvey çalışmaları ve DAS-ELISA sonuçlarının türlere göre dağılımı.....	52
Çizelge 4.4.	ADANA iline ait sürvey ve ELISA teşhis sonuçları.....	60
Çizelge 4.5.	KAHRAMANMARAŞ iline ait sürvey ve ELISA teşhis sonuçları.....	60

Çizelge 4.6.	NİĞDE iline ait sürvey ve ELISA teşhis sonuçları.....	61
Çizelge 4.7.	MERSİN iline ait sürvey ve ELISA teşhis sonuçları.....	62
Çizelge 4.8.	OSMANİYE iline ait sürvey ve ELISA teşhis sonuçları.....	62
Çizelge 4.9.	ASPV'nin teşhisinde farklı ELISA yöntemlerinin kullanılması.....	64
Çizelge 4.10.	Farklı ELISA yöntemlerinin denenmesinde elde edilen OD değerleri.....	64
Çizelge 4.11.	Farklı örnekleme zamanlarının tespiti amacıyla örnek alma tarihleri ve ELISA sonuçları.....	66
Çizelge 4.12.	ASPV'nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.....	69
Çizelge 4.13.	ASGV'nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.....	70
Çizelge 4.14.	ASPV örneklerinin muhafaza koşulları üzerine yapılan test sonuçları.....	72
Çizelge 4.15.	ASGV örneklerinin muhafaza koşulları üzerine yapılan test sonuçları.....	73
Çizelge 4.16.	Forse edilen örneklerle yapılan ELISA çalışmaları.....	75
Çizelge 4.17.	Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan virüs izolatları....	90
Çizelge 4.18.	Odunsu indikatörlere mekanik inokulasyon çalışmaları.....	91
Çizelge 4.19.	Virüs izolatlarının otsu indikatör bitkilerde neden olduğu belirtiler.....	92
Çizelge 4.20.	Biyolojik indeksleme değerlendirme tablosu.....	97
Çizelge 4.21.	Çeşit reaksiyon denemesinde elde edilen verilerin ortalaması.	108
Çizelge 4.22.	Gövde çapı için varyans analiz tablosu.....	109
Çizelge 4.23.	Gövde çapı için yapılan Duncan testi.....	109
Çizelge 4.24.	Ağaç boyu ölçümlerine ait varyans analiz tablosu.....	111
Çizelge 4.25.	Dal sayısı ölçümlerine ait varyans analiz tablosu.....	112
Çizelge 4.26.	Toplam dal uzunluğuna ait varyans analiz tablosu.	113
Çizelge 4.27.	Ortalama dal uzunluğuna ait varyans analiz tablosu.....	114

Çizelge 4.28.	Dal açısı için varyans analiz tablosu.....	114
Çizelge 4.29.	Dal açısına virüslerin etkisinin farkı için yapılan Duncan testi.....	114
Çizelge 4.30.	Çeşitlerin dal açısı için yapılan Duncan testi sonuçları.....	116
Çizelge 4.31.	Yaprak kuru ağırlığı varyans analiz tablosu.	117
Çizelge 4.32.	Odun dokusu kuru ağırlığı için varyans analiz tablosu.....	118
Çizelge 4.33.	Odun kuru ağırlığında virüsler için yapılan Duncan testi.....	118
Çizelge 4.34.	Çeşitlerde odun dokusu kuru ağırlığında oluşan değişikliklerin Duncan testine göre değerlendirilmesi.....	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1.	ASPV hastalık etmeninin elektron mikroskop görüntüsü.....	13
Şekil 2.2.	ASPV'nin genom yapısını gösteren model çizim	13
Şekil 2.3.	ASPV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu yivler	15
Şekil 2.4.	ASPV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu yivler ve kabuktaki karşılığı.....	15
Şekil 2.5.	ASPV'nin Spy 227 üzerinde meydana getirdiği epinasty.....	15
Şekil 2.6.	ASPV'nin Hardy armut çeşidinde neden olduğu nekrotik yaprak lekeleri.....	15
Şekil 2.7.	ASGV hastalık etmeninin elektron mikroskop görüntüsü	19
Şekil 2.8.	ASGV'nin genom yapısını gösteren model çizim.....	19
Şekil 2.9.	ASGV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu çukurlar.....	21
Şekil 2.10.	ASGV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu dal şişkinliği ve nekrozlar	21
Şekil 2.11.	Virginia Crab elma çeşidinde aşı noktasında meydana gelen nekroz.....	21
Şekil 2.12.	ASGV enfeksiyonu sonucu <i>Malus sieboldii</i> 'de görülen aşı noktası nekrozu.....	21
Şekil 3.1.	Mekanik inokulasyon çalışmalarının yapıldığı iklim odasından bir görüntü.....	33
Şekil 3.2.	Odunsu indikatörler üzerinde yapılan biyolojik karakterizasyon çalışmasından bir görüntü.	35
Şekil 3.3.	Çeşit reaksiyon denemesinden bir görünüm.....	45
Şekil 4.1	Sürvey çalışmalarının yürütüldüğü iller.	48
Şekil 4.2.	Sürvey çalışmalarında örneklenen bahçelerin türlere göre % dağılımı.....	50
Şekil 4.3.	Sürvey çalışmalarında örneklenen bahçelerin meyve türlerine göre % dağılımı.....	50
Şekil 4.4.	Sürvey kapsamında alınan örneklerin illere göre sayıları ve	

	%’de dağılım oranları.	50
Şekil 4.5.	Sürvey çalışmaları esnasında alınan örneklerin türlere ve illere göre dağılımı.....	51
Şekil 4.6.	Bütün örneklerdeki ELISA sonuçlarının dağılımı.....	53
Şekil 4.7.	Enfekteli örneklerdeki ASPV, ASGV ve ASPV+ASGV oranları.....	53
Şekil 4.8.	Toplanan ELMA örneklerindeki DAS-ELISA sonuçlarının dağılımı.....	54
Şekil 4.9.	Enfekteli ELMA örneklerindeki ASPV, ASGV ASPV+ASGV oranları.....	54
Şekil 4.10.	Toplanan ARMUT örneklerindeki DAS-ELISA sonuçlarının dağılımı.....	54
Şekil 4.11.	Enfekteli ARMUT örneklerindeki ASPV, ASGV ASPV+ASGV oranları.....	54
Şekil 4.12.	AYVA örneklerindeki ELISA sonuçlarının dağılımı.....	55
Şekil 4.13.	Enfekteli AYVA örneklerindeki ASPV, ASGV ASPV+ASGV oranları.....	55
Şekil 4.14.	ELISA sonuçlarına göre sürvey alanındaki yumuşak çekirdekli meyve türlerinin % enfeksiyon oranları ve genel ortalama.....	56
Şekil 4.15.	Türler bazında enfekteli örneklerdeki hastalık oranları.....	57
Şekil 4.16.	İller bazında DAS-ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.17.	ASPV ve ASGV’nin ELISA ile teşhisi için en uygun örnek alma zamanı.	67
Şekil 4.18.	ASPV’nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.....	70
Şekil 4.19.	ASGV’nin teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi için yapılan ELISA test sonuçları.	71
Şekil 4.20.	ASPV için örnek muhafaza koşullarının saptanması.	73
Şekil 4.21.	ASGV için örnek muhafaza koşullarının saptanması.....	74

Şekil 4.22.	Elma meyvelerinde şekil bozuklukları; küçük ve değişik noktalarda içe çökük meyve.....	78
Şekil 4.23.	Armut meyvelerinde stonypit (çukurlaşma ve taşlaşma) belirtileri.	78
Şekil 4.24.	İlkbaharda ayva meyvesinde görülen şekil bozukluğu (malformation).	79
Şekil 4.25.	Sonbaharda ayva meyvesinde görülen ilerlemiş malformation.	79
Şekil 4.26.	Malformation belirtisi gösteren ayva meyvesinin çekirdek evi kenarında ve meyve dokusunda zamk oluşumu.	80
Şekil 4.27.	Malformation belirtisi gösteren ayva meyvesinin kabuğu altında zamk oluşumu.	80
Şekil 4.28.	ACLSV ve ApMV negatif elma yaprağında nisan ayında görülen lekeler.....	81
Şekil 4.29.	Elma yaprağında ana damar boyunca görülen renk açılması ve doku çökmesi.	82
Şekil 4.30.	Armut yapraklarında erken ilkbaharda görülen yan damarlar üzerinde gelişen sarı renkli lekeler.....	82
Şekil 4.31.	Armut yaprak ana damarının arkadan bakıldığında yassılaştı ve sağlıklı yaprağa göre daha küçük kalmış görüntüsü.....	83
Şekil 4.32.	Ayva yapraklarında mozaik ve epinasty (yaprak ucundan geriye bükülme) belirtisi.	83
Şekil 4.33.	ASPV ile ACLSV karışık enfeksiyonu sonucu mozaik belirtileri gösteren ve küçük kalmış ayva yaprağı.	84
Şekil 4.34.	ACLSV+ASPV karışık enfeksiyonu sonucu ayva yapraklarında görülen sistemik mozaik simptomlar.	84
Şekil 4.35.	ASPV ve ASGV ile enfekteli 21 yaşındaki yarı bodur elma ağacı.	85
Şekil 4.36.	ASPV ile enfekteli olduğu belirlenen ve 2 yıl boyunca gözlenen 11 yaşlı ayva ağacında görülen gövde bükülmesi ve konkaviteler.	86

Şekil 4.37.	ASPV enfekteli 11 yaşlı ayva ağacı gövdesinde görülen bükülme ve diz oluşumu.	86
Şekil 4.38.	ASGV enfekteli armut ağacı yaprağında Oak leaf pattern (Meşe yaprağı simptomsu)	88
Şekil 4.39.	Armutlarda gözlenen aşı uyuşmazlığı belirtisi.....	88
Şekil 4.40.	Tayvan'da <i>Pyrus Pyrifolia</i> armut türü üzerinde rapor edilen ASGV belirtileri.	89
Şekil 4.41.	Karakterizasyon amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarından bir görüntü.....	93
Şekil 4.42.	<i>Phaseolus vulgaris</i> bitkisinde ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen damar açılması.	93
Şekil 4.43.	ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu <i>Phaseolus vulgaris</i> 'te küçülme, epinasty ve discoloration (renksizleşme) belirtisi....	93
Şekil 4.44.	İO-50 ASPV+ASGV izolatının <i>P. vulgaris</i> 'te oluşturduğu yaprak mozaikleri ve nekrozlar.	93
Şekil 4.45.	ÇÜ 19 ASPV/elma izolatının <i>Cucumis sativus</i> üzerinde oluşturduğu damar açılması simptomsu.	93
Şekil 4.46.	İO-50 ASPV+ASGV izolatının <i>Nicotiana Benthamiana</i> 'da oluşturduğu damar açılması ve nekrozlar.	94
Şekil 4.47.	İO-50 ASPV+ASGV izolatının <i>Chenopodium quinoa</i> üzerinde meydana getirdiği epinasty belirtisi.	94
Şekil 4.48.	ASPV enfeksiyonu sonucu <i>Phaseolus vulgaris</i> bitkisinde meydana gelen epinasty belirtisi.	94
Şekil 4.49.	ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu <i>Phaseolus vulgaris</i> bitkisinde oluşan yaprak deformasyonu, epinasty ve doku çökmesi.....	94
Şekil 4.50.	İO-50 ASPV+ASGV izolatının <i>Nicotiana occidentalis</i> 'te meydana getirdiği lokal yaprak nekrozu.	95
Şekil 4.51.	ASGV enfeksiyonu sonucunda Virginia crab üzerinde görülen aşı noktası şişkinliği.....	98

Şekil 4.52.	ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu <i>Virgina crab</i> üzerinde görülen aşı noktası nekrozu.	98
Şekil 4.53.	<i>Malus platycarpa</i> üzerinde gelişen aşı noktası nekrozu.	98
Şekil 4.54.	ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen floem nekrozu.	99
Şekil 4.55.	ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen sürgün ölümü.	99
Şekil 4.56.	ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen epinasty.	99
Şekil 4.57.	ASPV enfeksiyonu sonucu <i>M. platycarpa</i> üzerinde meydana gelen hafif epinasty.	99
Şekil 4.58.	Lord lamborne üzerinde meydana gelen açığı genişlemesi ve floem nekrozu.	99
Şekil 4.59.	Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan Gravenstein Rellstab çeşidinden bir görünüm.	99
Şekil 4.60.	ASP-C ve ASP-A primerleri ile elde edilen 264 bp'lik DNA bandına ait Agaroze jel elektroforez görüntüsü.	101
Şekil 4.61.	ASGV-2/ASGV-U 499 bp. ve ASGV/4F ve ASGV/4R 574 bp. primer çiftleri kullanılarak yapılan Multiplex RT-PCR sonucu elde edilmiş ASGV jell profilleri.	102
Şekil 4.62.	ASGV-2/ASGV-U 499 bp. primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonucu elde edilmiş ASGV jell profilleri.	103
Şekil 4.63.	ASGV-2/ASGV-U 499 bp. RT-PCR ürününün HindIII ile kesilmiş DNA profilleri.	104
Şekil 4.64.	ASGV/4F ve ASGV/4R 574 bp'lik RT-PCR ürününün Hind II ile kesilmiş DNA profilleri.	105
Şekil 4.65.	Çeşit reaksiyon denemesinde virüslerin gövde çapına etkileri. .	110
Şekil 4.66.	ASPV ve ASGV'nin çeşitler üzerindeki dal açısına etkisi.	115
Şekil 4.67.	Çeşit reaksiyon denemesinde virüslerin odun dokusu kuru ağırlığına olan etkisi.	118

Şekil 4.68.	ASPV ve ASGV'nin elma çeşitlerinin odun dokusu kuru ağırlığı üzerindeki etkisi.....	120
Şekil 7.69.	Granny Smith çeşidine ait 10 nolu ağaçta ASPV enfeksiyonu sonucu meydana gelen sürgün nekrozu.....	121
Şekil 4.70.	Starking çeşidine ait 4 nolu ağaçta ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen sürgün şişkinliği (stem grooving) belirtisi.....	122
Şekil 4.71.	Summer Red çeşidinde dal açılması.	122
Şekil 4.72.	Çeşit reaksiyon denemesindeki sağlıklı Summer Red kontrol bitkisinin dal açısı.	123

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP	Alkaline phospatase
Ap	Apple Proliferation
ApMV	Apple Mosaic Virus
ACLSV	Apple Chlorotic Leaf Spot Virus
ASGV	Apple Stem Grooving Virus
ASPV	Apple Stem Pitting Virus
bp	Base pair (Baz çifti)
BRNV	Black Raspberry Necrosis Virus
BSA	Bovine serum albumin
°C	Santigrat derece
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cm	Santimetre
CP	Coat protein
CRLV	Cherry Rasp Leaf Virus
CTLV	Citrus Tatter Leaf Virus
cvs.	Cultivars (Çeşit)
da	Dekar (1000 m ²)
DAS-ELISA	Double antibody sandwich ELISA
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DIBA	Dot Immuno Binding Assay
dk	Dakika
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	Double stranded ribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPPO	European Plant Protection Organization
ETOH	Ethanol (Ethyl alcohol)
FAO	Food and Agricultural Organization of the United Nations

h	Hour (Saat)
HCl	Hidroklorikasit
IC	Immuno capture
ICTV	International Commitee on Taxonomy of Viruses
IgG	Immunoglobulin G
ISHS	International Society for Horticultural Science
kb	Kilo base
L	Litre
LiCl	Lithium chloride
M	Molar
MAb	Monoclonal antibody
MgSO₄	Magnesium sulphate
ml	Mililitre
mM	Milimol
mm	Milimetre
MW	Molecular weight
N	Normal
NaCl	Sodium Klorür
nm	Nanometre (10^{-9} m = Metrenin milyarda biri))
OD	Optical Density
OHF	Old Home x Fermingdale (Armut anacı)
OLP	Oak leaf pattern
ON	Over Night (Bir gece)
ORFs	Open reading frames
ort.	Ortalama
örn	Örnek
PAbs	Polyclonal antibody
PBNLS	Pear Black Necrotik Leaf Spot
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene Glycol

pH	Çözeltinin asitlik bazlık seviyesi (p ower of H ydrogen)
PVP	Polyvinylpirrilodone
ppm	Part per million (milyonda bir oran)
PVY	Pear Vein Yellowing
QFDV	Quince Fruit Deformation Virus
RBDV	Raspberry Bushy Dwarf Virus
RFLP	Resrtriction Fragment Lenght Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute (Dakikada dönme sayısı)
RT	Reverse Transcription
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SH	Standart hata
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSCP	Single-Strend Confirmation Polymorphism
STG	Shoot-tip grafting:
TAS-ELISA	Triple antibody sandwich ELISA
ToRSV	Tomato Ring Spot Virus
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Ünite
UV	Ultra violet (Ultra viyole ışık)
V	Volt
Y.Ç.M	Yumuşak Çekirdekli Meyve
\$	ABD doları
µg	Mikro gram (10^{-6} g= gramın milyonda biri)
µl	Mikro litre (10^{-6} L=Litrenin milyonda biri)

1.GİRİŞ

Meyvecilik, insan beslenmesindeki yeri ve ticari değerinden dolayı bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli tarımsal faaliyetlerden biridir. Yumuşak çekirdekli meyveler (Y.Ç.M) grubuna giren elma, armut ve ayva; dünyada ılıman iklime sahip bütün bölgelerde yetiştirilebilmektedir. Ülkemizde ise bu meyve türleri aşırı sıcak ve aşırı soğuk iklim koşullarına sahip olan bölgeler dışında her yerde yetiştirilmektedir. Yumuşak çekirdekli meyve türlerinin dünyadaki yıllık üretimi 2007 yılı için yaklaşık 84.851.870 ton'dur (Çizelge 1.1). Bu üretimin % 86,49 gibi önemli bir miktarını Çizelgede yer alan 23 ülke gerçekleştirmektedir. Bu verilere göre; Türkiye, toplam 2.737.488 ton yumuşak çekirdekli meyve üretimiyle ayvada birinci, elmada beşinci, armutta ise yedinci sırada yer almakla birlikte genel ortalamada beşinci sıradadır (FAO, 2009).

Yumuşak çekirdekli meyvelerin uluslararası yıllık ticari değeri Çizelge 1.2'de görüldüğü gibi yaklaşık 13 milyar dolar civarındadır (FAO, 2009). Türkiye, dünya yumuşak çekirdekli meyve üretiminin % 2,88'ini gerçekleştirdiği halde, ülkemizin bu ürünlerin ihracatındaki payı ise yalnızca % 0,18 gibi düşük bir oranda kalmaktadır. Bu durumun başlıca nedenleri ise; öncelikle üretimin daha çok iç pazara yönelik olması, dolayısıyla üretilen çeşitlerin büyük çoğunluğunun uluslararası piyasalarda talep görmeyen çeşitlerden oluşması ve üretim standartlarımızın (seyreltme, muhafaza, paketleme vb.) düşük olmasıdır. Çizelge 1.2.'de ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve ithalat miktarının, ihracat miktarının 1/3 oranında olduğu ve ithal edilen ürüne ödenen bedelin ihracat gelirinden fazla olduğu görülmektedir. Bu Çizelgeden ülkemizde ihracat ürünlerinin düşük fiyatla satıldığı fakat benzer ürünlerin çok daha pahalı olarak ithal edildiği anlaşılmaktadır.

Ülkemizdeki toplam meyve üretimi içerisinde yumuşak çekirdekli meyvelerin payı, Çizelge 1.3'te verilen bilgilere göre 2.909.141 ton ile % 18,81'dir (TÜİK, 2009). Bu çalışmanın yürütüldüğü Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerindeki yumuşak çekirdekli meyve türlerine ait dikiliş alanları, üretim miktarları ve toplam ağaç varlığı ise Çizelge 1.3'te verilmiştir. Bu Çizelgede görüldüğü üzere adı geçen illerdeki toplam yumuşak çekirdekli meyve üretimi yıllık

348.752 ton olup bu rakam ülke üretiminin % 11,98'ni oluşturmaktadır. Çalışma kapsamındaki illerin yumuşak çekirdekli meyve ağacı varlığı ise 7.601.727 olup, bu sayı ülkemizin yumuşak çekirdekli meyve ağacı varlığının % 12,10'una denk gelmektedir (TÜİK, 2009).

Çizelge 1.1. Dünyada önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelere ait 2007 yılı üretim miktarları (FAO, 2009).

Sıra	Ülkeler	Elma (ton)	Armut (ton)	Ayva (ton)	Toplam
1	Çin	27.507.000	12.625.000	90.000	40.222.000
2	ABD	4.237.730	799.180		5.036.910
3	İtalya	2.072.500	840.516	650	2.913.666
4	İran	2.660.000	166.000	39.000	2.865.000
5	Türkiye	2.266.437	349.420	121.631	2.737.488
6	Rusya	2.211.000	15.500	10.000	2.226.500
7	Hindistan	2.001.400	200.000		2.201.400
8	Fransa	1.800.000	221.000	3.600	2.024.600
9	Arjantin	1.300.000	520.000	27.000	1.847.000
10	Şili	1.390.000	220.000		1.610.000
11	İspanya	672.400	537.400	21.000	1.230.800
12	Japonya	850.000	325.000	300	1.175.300
13	Polonya	1.039.100	13.000		1.052.100
14	Güney Afrika	650.000	325.000	125	975.125
15	Güney Kore	400.000	425.000		825.000
16	Ukrayna	707.000	107.200	7600	821.800
17	Kuzey Kore	635.000	125.000		760.000
18	Avusturya	477.900	175.500		653.400
19	Hollanda	370.000	224.000		594.000
20	Belçika	330.000	218.000	550	548.550
21	Avustralya	221.000	150.000		371.000
22	Portekiz	198.200	170.000	2.600	370.000
23	Cezayir	181.000	141.000	5.000	327.000
	Dünya	64.255.520	20.105.683	490.667	84.851.870
	23 ülkenin toplam üretimi	Dünya üretimine oranı % 86,49			73.388.639

Çizelge 1.2. Dünyada ve Türkiye’de yumuşak çekirdekli meyve ticaretine ait 2006 yılı verileri (FAO, 2009).

Tür	Dünya Türkiye	Üretim (ton)	İhracat (ton)	İhracat değ. (1000 USD)	İthalat (ton)	İthalat değ. 1000.USD
Elma	Dünya	63.875.324	7.166.752	4.431.758	6.967.882	4.845.528
	Türkiye	2.002.033	8.586	3.024	5.644	4.975
Armut	Dünya	19.655.161	2.175.364	1.606.776	2.177.490	1.835.953
	Türkiye	317750	4.082	2.313	739	765
Ayva	Dünya	484.498	16.550	14.567	13.922	12.014
	Türkiye	106.214	4.615	3.812	48	54
Toplam	Dünya	84.014.983	9.358.666	6.053.101	9.159.294	6.693.495
	Türkiye	2.425.997	17.283	9.149	6.431	5.794
Oran		% 2,88	% 0,18	% 0,15	% 0,07	% 0,08

Çizelge 1.3. Çalışmanın yürütüldüğü illerde yumuşak çekirdekli meyve türlerine ait 2008 yılı verileri (TÜİK, 2009).

İL	Tür	Yetiştirme alanı (da)	Ağaç sayısı	Üretim (ton)
Adana	Elma	9.177	327.746	7.695
	Armut	1.780	67.765	1.719
	Ayva	130	4.075	148
	Toplam	11.087	399.586	9.562
Mersin	Elma	46.286	1.147.451	62.884
	Armut	2.935	150.994	4.998
	Ayva	405	30.267	1.274
	Toplam	49.626	1.328.712	69.156
Osmaniye	Elma	1.515	64.764	1.016
	Armut	340	15.355	250
	Ayva	44	1.400	63
	Toplam	1.899	81.519	1.329
Niğde	Elma	202.110	4.316.466	219.376
	Armut	5.340	117.735	4.752
	Ayva	140	4.464	93
	Toplam	207.590	4.438.665	224.221
Kahramanmaraş	Elma	42.636	1.211.230	41.607
	Armut	1.735	119.085	2.444
	Ayva	361	22.930	433
	Toplam	44.732	1.353.245	44.484
İLLER TOPLAMI	Elma	301.727	7.067.657	332.578
	Armut	12.130	470.934	14.163
	Ayva	1.080	63.136	2.011
	Toplam	314.937	7.601.727	348.752
	Ülkesel oranı	%17,09	%12,10	%11,98
TÜRKİYE	Elma	1.577.510	47.196.007	2.457.845
	Armut	210.579	11.890.772	356.281
	Ayva	54.598	3.732.133	95.015
	Toplam	1.842.687	62.818.912	2.909.141
	Toplam meyve	28.651.043	771.639.594	15.465.265
Y.Ç.M.oranı	%6,43	%8,14	%18,81	

Türkiye dünyanın önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelerinden olmakla birlikte, bu meyve grubuna giren elma, armut ve ayvanın anavatanlarından bir olarak da bilinmektedir. Bu nedenle Türkiye yumuşak çekirdekli meyveler grubunda yetiştiricilik ve gen kaynakları açısından ayrıcalıklı bir konuma sahiptir (Ülkümen, 1938: Özbek, 1978). Özellikle yeni çeşit geliştirmede ve hastalıklara dayanıklı çeşit ıslahında Anadolu önemli bir gen kaynağı olarak görülmektedir.

Tüm bitkilerde olduğu gibi yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlılardan dolayı önemli ürün kayıpları meydana gelmektedir. Bu hastalık etmenlerinden virüsler de yumuşak çekirdekli meyvelerde çok sayıda hastalığa neden olup farklı düzeylerde kalite ve kantite kayıplarına yol açmaktadır. Bu güne kadar yapılan çalışmalar sonucunda elma, armut ve ayvada az veya çok önemli, 14 tanesi latent olmak üzere toplam 39 virüs hastalığının varlığı tespit edilmiştir (Ogawa ve English, 1991).

Bu hastalık etmenlerinden özellikle konukçuları üzerinde belirti oluşturan veya yumuşak çekirdekli meyveler dışında da konukçuları olan Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*-ApMV) ve Elma yaprak klorotik leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot* -ACLSV) gibi etmenlerle ilgili yurt dışında ve ülkemizde çok sayıda bilimsel araştırma çalışması yürütülmüştür. Fakat konukçuları üzerinde çok belirgin belirtiler oluşturmadığından dolayı latent olarak kabul edilen Elma Gövde Yivleşme (*Apple Stem Pitting Virus*: ASPV) ve Elma Gövde Çukurlaşma (*Apple Stem Grooving Virus*: ASGV) adlı virüs hastalıklarıyla ilgili araştırma çalışmaları oldukça yetersizdir. Özellikle ülkemizde bu hastalık etmenlerinin varlığı, yaygınlığı, belirtileri, konukçu bitkilerin bu hastalıklara duyarlılığı ve bu hastalıkların neden olduğu tahmini ekonomik kayıplar hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu hastalık etmenlerinden özellikle ASGV'nin turunçgiller, kayısı, kiraz, kivi ve zambak gibi geniş bir konukçu dizisine sahip olması hastalığın ülkemiz için önemini daha da artırmaktadır. Örneğin turunçgillerde önemli bir virüs hastalığı olan Citrus Tatter Leaf Virus (CTLV) ASGV'nin bir ırkıdır. Diğer yandan ASPV ise özellikle bazı yumuşak çekirdekli meyve çeşitlerinde meyve bozukluklarına yol açtığından ekonomik olarak daha önemli kabul edilmekte olup, bu hastalıkla ilgili çok sayıda araştırma yürütülmektedir. Ülkemizde son yıllarda artan bodur

meyvecilik ve yazlık elma yetiştiriciliği nedeniyle yurt dışından çok sayıda meyve fidanı ithal edilmektedir. Meyveciliğe artan bu ilgiden dolayı yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin daha ılıman iklim bölgelerine kayarak bu hastalık etmenlerine konukçuluk edecek turunçgiller gibi diğer bitki türleriyle aynı ekolojilerde yetiştirilmesi bu hastalık etmenlerini daha da önemli hale getirmiştir. Ayrıca ülkemizde son yıllarda tesis edilen elma bahçelerinin büyük çoğunluğu bu hastalıklara duyarlı olan M (Malling) ve MM (Malling- Merton) anaçları üzerine aşılı fidanlarla kurulmuştur. Söz konusu bu anaçların çoğunluğu yurt dışından gelmekte olup adı geçen hastalık etmenleriyle enfekteli olma ihtimali bulunmaktadır. Bu durum çalışma konusu olan hastalık etmenlerinin bölgemizdeki ve ülkemizdeki önemini daha da artırmıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın yürütülmesindeki bir diğer önemli gerekçe de bu hastalıklara duyarlı olabilecek anaç-çeşit kombinasyonlarının dikiminin ülkemizde giderek artması ihtimalidir.

Bu tez çalışması 2006 ve 2009 yılları arasında Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye illerinde yürütülmüştür. Bu çalışmayla;

- ✓ ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin yukarıda adı geçen illerde bulunan elma, armut ve ayva alanlarındaki varlığının ve dağılımının ortaya konması,
- ✓ Bu hastalık etmenlerinin teşhis metotlarının geliştirilmesi ve optimizasyonu,
- ✓ Hastalık etmenlerinin doğa koşullarında meydana getirdiği makroskobik belirtilerin tespit edilerek ortaya konması,
- ✓ Elde edilecek ASPV ve ASGV izolatlarının aralarındaki biyolojik ve moleküler farkların ortaya konması amacıyla karakterizasyon çalışmalarının yapılması ve,
- ✓ Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin bu hastalık etmenlerine karşı vereceği reaksiyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Yumuşak Çekirdekli Meyvelerde Virüs Hastalıkları**

Diğer bitkilerde olduğu gibi yumuşak çekirdekli meyvelerde de üretim miktarını ve kalitesini sınırlayan, ürün kayıplarına neden olan birçok önemli hastalık ve zararlı vardır. Bu hastalıklar içerisinde, değişik taşınma yollarıyla yayılıp bulaşan ve henüz kimyasal mücadelesi mümkün olmayan virüs ve virüs benzeri hastalıklar ayrı bir önem taşımaktadır.

Posnette, (1989)'un bildirdiğine göre yumuşak çekirdekli meyvelerde virüs hastalıklarının varlığı ilk kez 1825 yılında ApMV'nin aşıyla taşınmasıyla rapor edilmiş, fakat uzun yıllar bu konuda kayda değer bir çalışma yapılmamıştır. Sert çekirdekli meyvelerde zararlı virüs hastalıklarına dair 1951 yılında bir kitap yayınlanmış olmasına rağmen yumuşak çekirdekli meyve virüsleri konusunda ancak 1976 yılında bir el kitabı yayınlanabilmiştir. Bu tarihten sonra yapılan araştırma çalışmaları sonunda dünyada yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı bütün bölgelerde virüs hastalıklarından dolayı ciddi verim ve kalite kayıplarının meydana geldiği ortaya konmuştur. Bugüne kadar yumuşak çekirdekli meyvelerde 39 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir. Bu virüs hastalıklarından önemli olanları Çizelge 2.1'de verilmiştir (Nemeth, 1986).

Çizelge 2.1. Yumuşak çekirdekli meyvelerde görülen önemli virüsler ve taşınma yolları

Hastalık ismi	Hastalık etmeni	Akronim	Taşınması
Elma mozaik	Apple mosaic <i>Ilarvirus</i>	ApMV	Aşı, M. inokulasyon
Elma klorotik yaprak lekesi	Apple chlorotik leaf spot <i>Trichovirus</i>	ACLSV	Aşı, M. inokulasyon
Elma gövde yivleşme	Apple stem pitting <i>Foveavirus</i>	ASPV	Aşı, M. inokulasyon
Elma gövde çukurlaşma	Apple stem grooving <i>Capillovirus</i>	ASGV	Aşı, M. inokulasyon
Kiraz törpülenmiş yaprak	Cherry rasp leaf <i>nepovirus</i>	CRLV	Aşı, Nematod
Elma topworking hastalığı	Tomato ring spot <i>nepovirus</i>	ToRSV	Aşı, Nematod

Çizelgede yer alan hastalık etmenlerinden Cherry rasp leaf *nepovirus* (CRLV) ve Tomato ring spot *nepovirus* (ToRSV) dışında kalanların dünyada yumuşak çekirdekli meyvelerin yetiştirildiği bütün alanlarda bulunduğu varsayılmaktadır. Fakat CLRV ve ToRSV hastalık etmenleri Kuzey Amerika'da bulunmakta ve nematodlarla taşınmaktadır (Desvignes ve ark, 1999). Bu hastalık etmenlerinin elma dışında çok sayıda odunsu ve otsu konukçusu bulunmaktadır ve her iki hastalık etmeni hem EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) bölgesinde hem de ülkemizde rapor edilmediğinden bu hastalıklar EPPO'nun A1 listesinde ve ülkemiz karantina yönetmeliğinin EK-1 A listesinde yer almaktadır.

Yumuşak çekirdekli meyve virüs hastalıklarından ASPV ve ASGV yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının gövde, dal ve sürgünlerinde doku yumuşaması veya dokuda içeriye doğru çökmeler şeklinde hastalık belirtileri oluşturarak önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Meyve ağaçlarında virüs hastalıklarının neden olduğu kayıpların ölçülmesi, uzun yıllar alan araştırma çalışmaları ve kompleks tahmin modelleri gerektirdiğinden oldukça zordur. Cembali ve ark. (2003), ABD de yaptıkları bir çalışma sonucunda virüslerden kaynaklanan ekonomik zararı tahmin etmek için ticari bahçelerde ve fidanlıklarda uygulanmak üzere iki farklı model geliştirmişlerdir. Bu modellerin uygulanması sonucunda elma yetiştiriciliğinde ACLSV+ASGV+ASPV enfeksiyonu sonucu Golden çeşidinde %30 oranında bir verim kaybı olduğu, fakat bu zarar oranının hastalık ve çeşitlere bağlı olarak % 67'ye kadar çıkabildiği hesap edilmiştir.

Virüs hastalıklarıyla mücadele oldukça zor olmasına rağmen mücadelenin en önemli aşamasını virüs hastalık etmenlerinin zamanında ve doğru olarak teşhis edilmesi oluşturmaktadır. Bu amaçla günümüzde yaygın şekilde biyolojik indeksleme, serolojik testler (örn. ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), elektron mikroskopi ve moleküler (örn: PCR-Polimerase Chain Reaction) teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen teknoloji ve moleküler bilimi sayesinde Mikroarray teknolojisi de bitki virolojisinde kullanılmaya başlanmıştır (Milne, 1993: Lenz ve ark. 2008).

2.2. Türkiye’de Yumuşak Çekirdekli Meyve Virüs Hastalıkları

Özkan ve Kurçman (1976), ülkemizde yumuşak çekirdekli meyvelerde virüs hastalıkları konusundaki ilk çalışmanın 1964 yılında Sahtiyancı tarafından yapıldığını ve bu çalışmada Orta Anadolu elma alanlarında “Green crinkle” ve “Star crack” hastalıklarının varlığının rapor edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar yalnızca bazı gözlemlere dayanmış olsa da faydalı bulunarak sonraki yıllarda (1966–1969) yine Orta Anadolu’da önemli elma alanları olarak kabul edilen Ankara, Afyon, Konya, Kayseri, Eskişehir, Kırşehir, Nevşehir ve Niğde illerinde elma bahçeleri gezilerek makroskobik gözlemler yapılmıştır. Bu gözlemler bütün fenolojik dönemleri kapsayacak şekilde yapılmış ve çalışma sonucunda ApMV, Green crinkle, Star crack, Apple proliferation (AP) Apple Dimple Fruit (ADF) hastalıklarına rastlandığı rapor edilmiştir (Özkan ve Kurçman, 1976). Bu çalışmalar sonucunda daha çok yaprak ve meyvelerde belirti gösteren hastalıklarla ilgili bazı veriler elde edilmiş, fakat herhangi bir hastalık oranı verilmemiştir. Söz konusu çalışmalarda latent kabul edilen hastalıkların varlığı vurgulanmakla beraber bu hastalıklarla ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Daha sonraki yıllarda; Çalı, (1992) yaptığı bir çalışmada Isparta ili elma alanlarında bazı viroid ve fitoplazma benzeri hastalık belirtilerini rapor etmiştir.

Ülkemizde 1990’lı yıllardan sonra yumuşak çekirdekli meyvelerde zarar yapan virüs hastalıkları konusunda bazı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen bu çalışmalar daha çok elma ile ilgili olmuştur. Bu çalışmalar 2000’li yıllara kadar oldukça sınırlı kalmış fakat bu tarihten sonra daha geniş alanlarda ve değişik konukçularda farklı hastalıklar araştırılmıştır.

Akbaş ve İlhan (2005), Orta Anadolu bölgesi elma alanlarında ApMV üzerine yaptıkları çalışmada hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan alınan örnekler üzerinde yapılan serojik testler sonucunda % 68,3 oranında enfeksiyon belirlemişlerdir. Orta Anadolu, Karadeniz ve Marmara bölgelerinde 2005 yılında Dursunoğlu ve Ertunç (2008), elma, armut ve ayva alanlarında yaptıkları survey çalışması sonucunda bu alanlarda ApMV’nin %29,75 oranında bulunduğunu serolojik testler neticesinde ortaya koymuşlardır. Bu çalışma her üç yumuşak çekirdekli meyve türünde geniş

alandaki yapılan ilk çalışmalardan biridir. Aynı yıl Yılmaz ve ark. (2005) tarafından Tokat ili elma alanlarında yapılan bir survey çalışmasında DAS-ELISA test sonuçlarına göre toplanan örneklerin % 6,9 oranında ApMV ile enfekteli olduğu bildirilmiştir. ApMV ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve alanları dışında fındık alanlarında da rapor edilmiştir. Bu farklı türlerdeki ApMV izolatları üzerinde yapılan RFLP çalışmaları sonucunda CP gen bölgesinde büyük oranda homoloji saptanmıştır (Sökmen, 2003).

Bir başka çalışmada Çağlayan ve ark. (2006) Türkiye'nin önemli elma yetiştiricilik alanlarından 174 örnek toplamış ve bu örneklerin 126 tanesinin ApMV, ACLSV, ASPV veya ASGV ile enfekteli olduğunu ve özellikle ACLSV /ASPV karışık enfeksiyon oranının %84 gibi oldukça yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Akbaş ve İlhan (2008), Ankara ili ayva alanlarında yaptıkları çalışmada ACLSV'nin varlığını serolojik testlerle ortaya koymuşlardır. Fakat, bu çalışmada alınan ayva örneklerinden hiçbirinde ASPV ve ApMV'ye rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Yumuşak çekirdekli meyvelerde zararlı virüs hastalıkları konusunda geniş kapsamlı çalışmalardan bir diğeri ise Birışık ve ark. (2008) tarafından 2002–2005 yılları arasında Akdeniz Bölgesi elma alanlarında yürütülmüştür. Bu çalışmada Adana, Antalya, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinden 413 elma örneğinde, serolojik, moleküler ve biyolojik testler yapılmış, alınan elma örneklerinin ApMV, ACLSV, ASPV ve ASGV ile enfekteli olduğu ve ASPV hariç ortalama enfeksiyon oranının ELISA sonuçlarına göre % 18,8 olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada biyolojik indeksleme sonuçlarına göre alınan örneklerde ASGV % 60,8 ASPV ise %54,5 oranında bulunmuştur.

2.3. Elmalarda Gövde Zararlanmalarına Neden Olan Virüs Hastalıkları

Dünyada elma yetiştiriciliğinin geliştiği ve yaygınlaştığı 1920'li yıllarda elma pamuklu biti, Avusturalya'da ve Yeni Zelandada da epidemiy yapmış ve dünyanın diğer elma yetiştiricisi ülkelerine de yayılarak sorun olmaya başlamıştır. Bu zararlıya karşı mücadelede başlangıçta Spy klon anaçları kullanılmış, fakat bu anaçların verimlerinin düşük olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, elma yetiştiriciliğinde verimi

arttırmak ve elma pamuklu bitiyle mücadele etmek için İngiltere East Malling Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsünde 1930'lu yıllarda anaç geliştirme programı yürütülmeye başlanmıştır. Bu program kapsamında Malling (M) ve Malling-Merton (MM) klon anaçları geliştirilmiş ve tüm dünyada kullanıma sunulmuştur. Bu anaçlar çok büyük oranda ASPV ve ASGV ile enfekteli olduğu halde bu virüs hastalıklarının latent olmasından dolayı enfeksiyon fark edilememiş ve sonraki yıllarda M ve MM anaçları ABD'li üreticiler tarafından kullanılıp üzerine Amerika kıtasının yerli çeşidi olan Virginia Crab aşılınca ASPV ve ASGV'ye duyarlı olan bu çeşitte şiddetli belirtiler ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu hastalık etmenleri ilk olarak ABD'de ancak 1960'lı yıllarda fark edilmiştir. Fakat bu süreçte enfekteli olan M ve MM klon anaçlarının dünyanın bir çok bölgesine yayıldığı çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Stouffer, 1989; Welsh ve Meer, 1989; Wood, 1996).

ASPV ve ASGV hastalık etmenleri konukçularında kolayca fark edilmeyi sağlayacak şekilde yapraklarda renk değişimi, şekil bozuklukları ve meyve lekeleri gibi belirtiler oluşturmadığından dolayı uzun yıllar bu hastalıkların varlığı ve önemi anlaşılamamıştır. Sözü edilen hastalıklar daha çok bazı duyarlı konukçular üzerinde gözle görülebilir belirtiler oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu hastalıkların teşhisinde uzun yıllar yalnızca biyolojik indeksleme yöntemi kullanılmıştır (Posnette, 1989). Genel olarak biyolojik indeksleme; hastalık etmenlerinin en tipik belirtileri gösterdikleri hassas konukçularına aşı veya mekanik inokulasyon yolu ile taşınarak, hastalık etmeninin varlığının tespit edildiği, tipik belirtilerin gözleendiği ve bu oluşan belirtilere göre teşhis yapıldığı bir yöntemdir (Di Terlizzi, 1998). Fakat virüs hastalıklarının teşhisinde meydana gelen ilerlemeler sonucunda latent kabul edilen bu hastalıkların modern metotlarla kolaylıkla teşhis edilebildiği ve önemli ekonomik kayıplara neden olduğu ortaya konmuştur (Menzel ve ark. 2003).

Bu iki etmenin yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında oluşturduğu hastalıklar ve bunlara ait taşınma özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Gövde belirtisi oluşturan bu virüs hastalıkları üretim materyali ile taşındığı gibi mekanik olarak otsu test bitkilerine ve aşı yoluyla odunsu indikatör bitkilere de taşınmaktadır. Bu etmenler indikatör bitkilerde yaprak kıvrılmaları, değişen şiddet ve tipte mozaik simptomları, odun dokusunda yumuşamalar, içeriye doğru iğne ucu şeklinde

girintiler, meyvelerde şekil bozuklukları ve yapraklarda besin elementi noksanlığı ile karıştırılan değişik görünümlere neden olmaktadır.

Çizelge 2.2. ASGV ve ASPV'nin neden olduğu hastalıklar ve taşınma yolları.

Hastalık etmeni	Akronim	Hastalık ismi	Taşınma
Apple Stem Grooving <i>Capillovirus:</i>	ASGV	Elma gövde çukurlaşma hastalığı Armut gövde çukurlaşma hastalığı Elma geriye ölümü Topworking hastalığı	Aşı gözü Mekanik inokulasyon Tohum
Apple Stem Pitting <i>Foveavirus:</i>	ASPV	Elma yivleşme hastalığı Elma cücelik virüsü Elma epinasti ve geriye ölümü Armut nekrotik leke hastalığı Armut kızıl lekeliçlik Armut gövde çukurlaşması Armut damar sararması Ayva cücelik hastalığı Ayva meyve Şekil bozukluğu Ayva düzgün halkalı lekeliçliği	Aşı gözü Mekanik inokulasyon

Çizelge 2.2'de verilen çalışma konusu hastalıklar EPPO bölgesi ülkelerinde ve ülkemizde karantina listelerinde yer almamaktadır. Fakat, bu hastalık etmenleri EPPO tarafından hazırlanan sertifikasyon protokollerinde de üretim materyalinden arındırılması gereken hastalık etmenleri olarak yer almaktadır. EPPO, önerdiği bu sertifikasyon uygulamaları yoluyla yeni bahçe tesis edilirken sertifikalı üretim materyali kullanımını teşvik etmek ve bu yolla ASPV ve ASGV hastalık etmenleriyle mücadele edilmesini amaçlanmaktadır. Bu protokollerde sertifikalı üretim materyali elde edilmesinin ilk aşaması olarak termoterapi uygulaması yer almaktadır. Termoterapi uygulaması tek başına yeterli olmadığından EPPO sertifikasyon protokolünde (pm4–27) doku kültürü ve termoterapi uygulamalarının kombine edilmesi önerilmektedir (EPPO, 2009). Fakat önerilen bu uygulamalarla %100 virüsten ari materyal elde etmek hedeflendiğinde yapılan uygulamalar sonucu aday bitkilerin % 40 ile 87'sinin öldüğü rapor edilmiştir (Funing, ve ark. 2003).

2.3.1. Elma Gövde Yivleşme Virüsü (Apple Stem Pitting *Foveavirus*: ASPV)**2.3.1.1. ASPV'nin Tespiti ve Özellikleri**

Bu hastalık ilk olarak ABD'de 1940'lı yıllarda belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda duyarlı bir çeşit olan Virginia Crab çeşidinin anaç olarak kullanılmaya başlanması sonucu bir çok ağacın kısa sürede ölmesiyle hastalık önem kazanmıştır. İlk zamanlar aşı uyumsuzluğu olarak düşünülen bu hastalık sonraki yıllarda aşılama ile diğer bitkilere taşınmış, böylece viral bir hastalık olduğu kanıtlanmıştır (Guengerich ve Millikan, 1956). Takip eden yıllarda ABD'de Spy 227 anacı üzerine aşılı elma ağaçlarında ölümler görülmüş ve yapılan çalışmalarla bu ölümlerin sebebinin de bir virüs olduğu anlaşılmıştır. Bu tarihte her iki hastalığın birbirinden bağımsız iki ayrı virüsten kaynakladığı düşünülmüştür (Guengerich ve Millikan, 1959). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla Kegler ve ark. (1976) Apple stem pitting, Spy 227 geriye ölümü ve armut damar sararması (Pear Vein Yellowing: PVY) hastalıklarının tek bir etmen olan ASPV tarafından meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Etmen virüs; herhangi bir vektör, tohum veya polenle taşınmadığı halde aşı ve mekanik inokulasyon ile taşınmaktadır. ASPV konukçu bitkilerden temas yoluyla bulaşmadığı halde etmen komşu bitkilere kök teması ve kök kaynaşması yoluyla bulaşabilmektedir (Nemeth 1986). Etmenle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda ASPV'nin ipliksi, 800 nm uzunluğunda ve 12–15 nm genişliğinde ssRNA genomik yapıya sahip bir virüs olduğu bilirlenmiştir (Koganezawa ve Yanase, 1990). Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda ise ASPV'nin *Foveavirus* cinsine ait bir virüs olduğu rapor edilmiştir (Martelli ve Jelkmann 1998). Uluslararası virüs taksonomi komitesi ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)'nin yaptığı sınıflandırmaya göre ASPV'nin taksonomisi şöyledir (Anonymus, 2005).

Grup : ssRNA (pozitif sens)

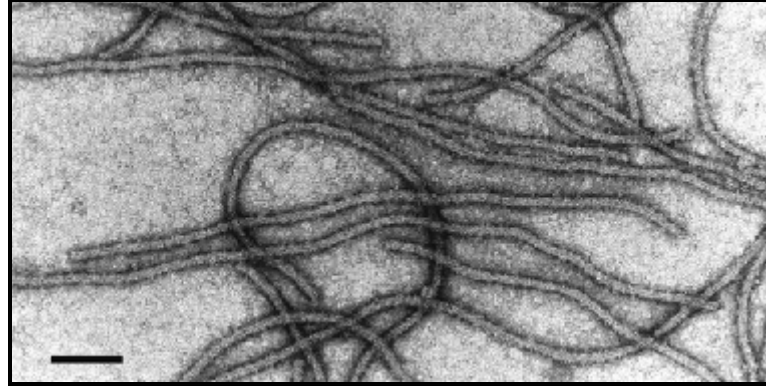
Familya : Flexiviridae

Cins : Foveavirus

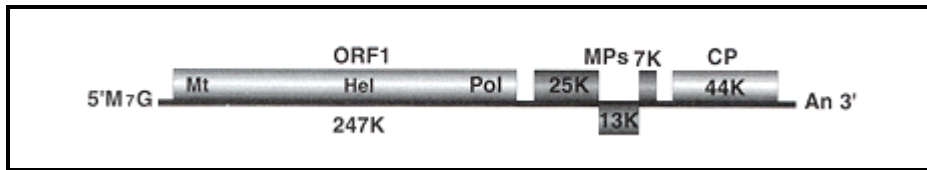
Tür : *Apple Stem Pitting Virus*

Akronim: ASPV (Mayo ve Brunt, 2006).

ASPV üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda bu etmenin genom organizasyonu ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda ASPV virüsünün beş adet ORF'ye sahip, 9293 nükleotidden meydana gelen tek parçalı bir genoma sahip olduğu belirlenmiştir (Khan ve Dijkstra, 2006). Farklı ASPV izolatlarının genomu üzerinde yapılan çalışmalarda izolatların %81 ile %94 arasında değişen oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Yoshikawa ve ark. 2001). Koganezawa ve Yanase, (1990) tarafından görüntülenen ASPV'nin elektron mikroskop görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir. Khan ve Dijkstra, (2006) tarafından yapılan bu etmene ait genomun model çizimi de Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.1. ASPV hastalık etmeninin elektron mikroskop görüntüsü (Koganezawa ve Yanase, 1990).



Şekil 2.2. ASPV'nin genom yapısını gösteren model çizim (Khan ve Dijkstra, 2006).

2.3.1.2. ASPV'nin Konukçuları ve Yayılışı

Elma türleri (*Malus pumila*, *M. sieboldii*, *M. sylvestris*), armut (*Pyrus communis*) ve alıç bitkileri (*Crataegus mongyna*) bu hastalığın doğal konukçularıdır. Fakat bu konukçulardan çoğu hastalığı latent olarak taşımaktadır. Bunun yanında ASPV'nin 9 ayrı familyadan değişik bitkilere deneysel olarak taşındığı bildirilmiştir.

ASPV'nin varlığı elma ve armut yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok bölgede rapor edilmiş olup bu etmenin genel olarak yumuşak çekirdekli meyvelerin yetiştirildiği bütün bölgelerde yaygın olarak bulunabileceği kabul edilmektedir (Nemeth 1986).

2.3.1.3. Hastalık Belirtileri

ASPV elma ve armut ağaçlarında geriye ölüm, gövde odun dokusunda yivleşme, damar sararması ve aşu noktasından içeriye doğru çukurlar (pit) oluşmasına neden olmaktadır. Bu hastalık, meyve ve gövdede oluşan belirtilerin görünme süresi ve şiddeti açısından hafif ve şiddetli olmak üzere iki ırka ayrılmaktadır. ASPV'nin hafif ırkının belirtileri gövdede en erken üçüncü yılda görülmekte ve küçük pitler (çukurlar) oluşturmaktadır. Bu ırk oluşturduğu enfeksiyonlarda meyve belirtileri ise üçüncü yılda çok zayıf olarak görülmekte ve görülme yüzdesinin de düşük olduğu belirtilmektedir. Buna karşın ASPV'nin şiddetli ırkında ise gövde belirtileri ikinci yılda ortaya çıkmakta ve üçüncü yılda belirtiler çok şiddetli olarak görülmektedir. Şiddetli ırk enfeksiyonlarında meyve belirtileri de gövde belirtilerinde olduğu gibi ikinci yılda görülmeye başlamakta ve daha şiddetli olarak seyretmektedir (Welsh ve Uyemoto 1980; Desvignes ve ark. 1990). ASPV esas olarak aşılama yoluyla taşınmakta, ancak enfekteli ağaçlardan komşu ağaçlara kök kaynaşması yoluyla geçebilmektedir. Nemeth, (1986) bu durumda, hastalık belirtilerinin kök yoluyla bulaşmış ağaçlarda görülebilmesi için yaklaşık bir yıllık inkübasyon süresi gerektiğini rapor etmiştir.

ASPV'nin duyarlı olarak bilinen Virginia crab elma çeşidi üzerinde oluşturduğu yivler Şekil 2.3'te, ve oluşan yivlerin kabuktaki karşılığı Şekil 2.4'te ve diğer bir duyarlı elma anacı olan spy 227 meydana getirdiği epinasty belirtisi ile Hardy armut çeşidinde neden olduğu nekrotik yaprak lekeleri ise sırasıyla Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.3. ASPV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu yivler (Pitting), (Stouffer, 1989).



Şekil 2.4. ASPV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu yivler ve kabuktaki karşılığı (Stouffer, 1989).



Şekil 2.5. ASPV'nin Spy 227 üzerinde meydana getirdiği epinasty (Desvignes, 1999).



Şekil 2.6. ASPV'nin Hardy armut çeşidinde neden olduğu nekrotik yaprak lekeleri (Stouffer, 1989).

2.3.1.4. Hastalığın Ekonomik Önemi

ASPV ile enfekteli yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında oluşan kayıpları araştırmak amacıyla, virüsün neden olduğu Pear Vein Yelloving (PYV) hastalığı ile enfekteli armut fidanlığında 12 ayrı çeşit denemeye alınarak bir çalışma yapılmıştır. Minoiu ve ark. (1986), tarafından yapılan bu çalışmada enfekteli armut bitkilerinin sağlıklı bitkilere oranla % 13,4 ile % 69,7 arasında değişen büyüme geriliği gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda ASPV ile enfekteli armut fidanlarının kış soğuklarına karşı daha duyarlı oldukları anlaşılmış ve yapılan analizler sonucunda ASPV ile enfekteli bitkilerin bünyesinde fosfor, azot, kalsiyum ve phytoasimilatör pigmentlerin daha az oranda bulunduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca enfekteli ağaçların bünyesinde sağlıklı ağaçlarda bulunmayan Hydroxyproline tespit edilmiştir. Bu madde yalnızca enfekteli bitkilerde bulunduğundan bu maddenin varlığının hastalığın teşhisi için kullanılabilceği bildirilmiştir (Minoiu ve ark,1986).

ASPV elmalarda yalnızca Virginia Crab üzerine aşılansmış bitkilerde gözle görülebilir hastalık belirtileri oluşturmakta ve belirgin bir zarar meydana getirmektedir. ASPV ile enfekteli Virginia Crab bitkisinde anacın geriye doğru ölmesinden dolayı elma ağaçlarında kayıplar meydana gelmektedir. Diğer ticari anaç-kalem kombinasyonlarında hastalık latent olarak bulunmaktadır. Bu hastalığın V. Crab dışında yalnızca bodur M klon anaçları üzerine aşılansan Charden gibi duyarlı çeşitlerde aşı noktasında büyüme ve aşı uyumsuzluğu sonucu ağaç ölümlerine neden olduğu bilinmektedir.

Ülkemizde bu hastalığın yaygınlığı ve ekonomik önemi ile ilgili fazla bir çalışma bulunmamakla birlikte Birışik ve ark. (2008), Akdeniz bölgesi elma alanlarında yaptıkları bir sürvey çalışmasında alınan örneklerle biyolojik indeksleme çalışmaları sonucu örneklerin %55 gibi yüksek bir oranda ASPV ile enfekteli olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3.1.5. Hastalığın Teşhisi ve Mücadelesi

Viral hastalık etmenlerinin rutin teşhis çalışmalarında en yaygın olarak

kullanılan ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) test çalışmalarında kullanmak amacıyla ASPV için antiserum üretilmeye çalışılmıştır. Bu konuyla ilgili yapılan çok sayıda araştırmaya rağmen ASPV için uzun süre rutin teşhise olanak verecek ticari bir antiserum üretilmemiştir. Ancak son yıllarda monoklonal antiserum üretimi Gugerli ve Ramel, (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir. Devam eden antiserum üretim çalışmaları sonucunda 2006 yılında Bioreba (İsviçre) firması tarafından ASPV için poliklonal antiserumu üretilerek kullanıma sunulmuştur.

Bilindiği üzere serolojik testlerin latent virüs hastalıklarındaki teşhis başarısı çoğunlukla etmene bağlı nedenlerden dolayı düşüktür. ASPV genomu üzerinde yapılan nükleodit dizi çalışmaları sonucunda RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) tekniği ile virüsün teşhis imkânları geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Schwarz ve Jelkmann 1998, Kummert ve ark. 1998: Jelkmann, 1994: Yoshikawa ve ark, 1992). Daha sonra Jelkmann ve Keim-Konrad (1997), immunocapture/RT-PCR tekniğini konusunda bazı çalışmalar yapmış ve bu metodun ASPV için daha sağlıklı ve güvenilir teşhis imkanı verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Boom ve ark. (1990) ile Rott ve Jelkmann, (2001) ASPV izolasyonu için silica capture yönteminin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Bu hastalıkla mücadelenin esası diğer virüs hastalıklarında olduğu gibi virüsten ari sağlıklı üretim materyali kullanmaktır. Söz konusu sağlıklı üretim materyalinin elde edilmesi amacıyla ilk kullanılan teknik termoterapidir. Cropley (1968), enfekteli elma kalemlerinin 38⁰C sıcaklıkta, çeşide bağlı olmak üzere 21 ile 77 gün tutulduğunda virüsün bitki bünyesinden elemine edildiğini rapor etmiştir. Fakat günümüzde, meristem kültürü, shoot-tip grafting (sürgün ucu aşılması), protoplast kültürü ve in-vitro doku kültürü gibi yöntemlerle virüsten ari bitkiler elde etmek mümkün hale gelmiştir. Virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi uzun vadede sonuç vermeyen ve ekonomik olmayan uygulamalar olmasına rağmen bazı kimyasalların bitki bünyesinde virüs çoğalmasını azalttığı veya durdurduğu bilinmektedir. Hansen (1989), bir Guanosine analogu olan Ribavirini 500 ppm dozunda haftalık olarak vejetasyon boyunca elma bitkilerine uygulamış ve sonuçta bu kimyasalın bitki bünyesinde ASPV virüs replikasyonunu (çoğalmasını) ve bu virüsün bitkide sistemik olarak taşınmasını inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

2.3.2. Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (Apple Stem Grooving Capillovirus :ASGV)**2.3.2.1. ASGV'nin Tespiti ve Özellikleri**

Lister ve ark. (1965) bu hastalığı ilk olarak 1965 yılında ABD'de rapor etmişlerdir. İlk zamanlar hastalık etmeninin ASPV ile aynı olduğu düşünülmüş, daha sonraki yıllarda De Sequeira (1965, 1967) yaptığı çalışmalarda bu hastalığın biyolojik olarak ASPV'den farklı olduğunu tespit etmiştir. Bu güne kadar yapılan çalışmalara göre ASGV'nin polen veya herhangi bir vektör böcekle taşınmadığı, fakat mekanik inokulasyon ve aşı yolu ile taşındığı ortaya konmuştur (Nemeth 1986). ASGV; Capillovirus grubundan 600-700 nm uzunluğunda, 12 nm genişliğinde, toplam genom büyüklüğü 6.5 kb olan, ssRNA nükleotid yapısına sahip ipliksi bir virüstür (Murphy ve ark., 1995).

Uluslararası virüs taksonomi komitesi ICTV tarafından yapılan sınıflandırmaya göre ASGV'nin taksonomisi aşağıda verilmiştir (Anonymus, 2005).

Grup : ssRNA (pozitif sens)

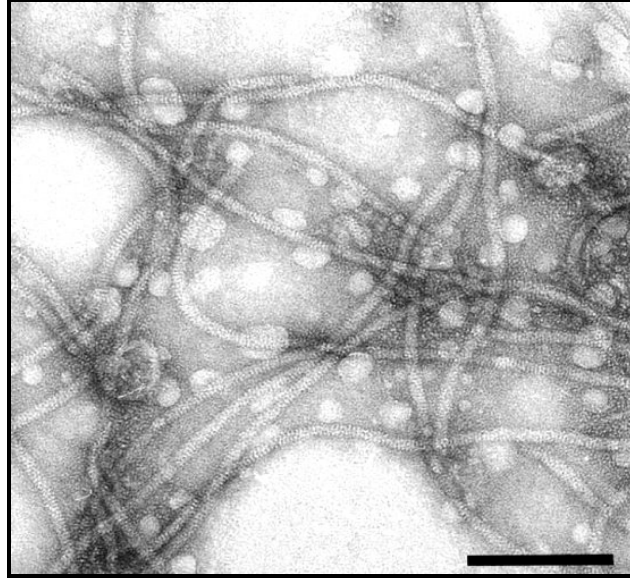
Familya : Flexiviridae

Cins : Capillovirus

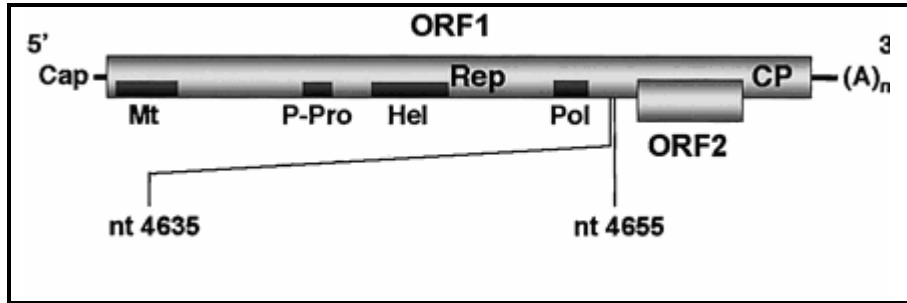
Tür : *Apple Stem Grooving Virus*

Akronim: ASGV (Khan ve Dijkstra, 2006)

Hirata ve ark. (2003) tarafından Japonya'da değişik ASGV ırkları üzerinde yapılan araştırmalarda etmenin genom organizasyonu ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda ASGV virüsünün birbiri üzerine binen iki adet ORF (Open Reading Frame)'ye sahip, 6496 nükleotitten meydana gelen tek parçalı bir genoma sahip olduğu ve bu genom yapısının ırklar düzeyinde %82 ile %98 arasında değişen oranda homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Lister (1970), yaptığı çalışmalar sonucunda ASGV etmenine ait elektron mikroskop görüntüsünü elde etmiştir. Şekil 2.7'de görüldüğü üzere ASGV ipliksi yapıda bir görünüme sahiptir. Bu virüsün genom yapısıyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda Hirata ve ark. (2003) tarafından Şekil 2.8'de görülen model ortaya konmuştur.



Şekil 2.7. ASGV hastalık etmeninin elektron mikroskop görüntüsü (Lister, 1970).



Şekil 2.8. ASGV'nin genom yapısını gösteren model çizim (Hirata et, all. 2003).

2.3.2.2. ASGV'nin Konukçuları ve Yayılışı

Geniş bir konukçu dizisine sahip olan ASGV'nin deneysel olarak 17 familyadan 40 bitki türüne taşındığı belirlenmiştir. Bu hastalık elma ve armut yetiştiriciliği yapılan bölgelerde yaygın olarak bulunan bir virüs hastalığıdır. ASGV yumuşak çekirdekli meyveler dışında çok farklı bitki türlerinde de hastalık etmeni olarak rapor edilmiştir. Örneğin, bir süs bitkisi olan zambak bitkisinin ASGV'nin doğal bir konukçusu olduğu Inouye ve ark. (1979) tarafından rapor edilmiştir. Nickel ve ark., (2001) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda sert çekirdekli

meyvelerden kayısı (*Prunus armeniaca* L.) ve kiraz (*Prunus avium* L.) çeşitlerinin büyük çoğunluğunun hastalığı latent olarak taşıdığı saptanmıştır. Brezilya’da Cleopatra mandarin çeşidinde uzun yıllardan beri gözlenen kabukta renk açılması ve basık meyve sendromunun ASGV’nin turunçgil ırkı olan CTLV enfeksiyonundan kaynaklandığı, serolojik, biyolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konmuştur (Osvaldo ve ark. 2002). Takip eden yıllarda Yeni Zellanda’da Clover ve ark, (2003), tarafından yapılan bir çalışma sonucunda Çin kaynaklı kivilerde ASGV tespit edilmiş ve böylece kivi bitkisinin de ASGV’nin konukçusu olduğu ortaya konmuştur. ASGV’nin bugüne kadar tespit edilmiş başlıca ırkları Çizelge 2.3’te verilmiştir.

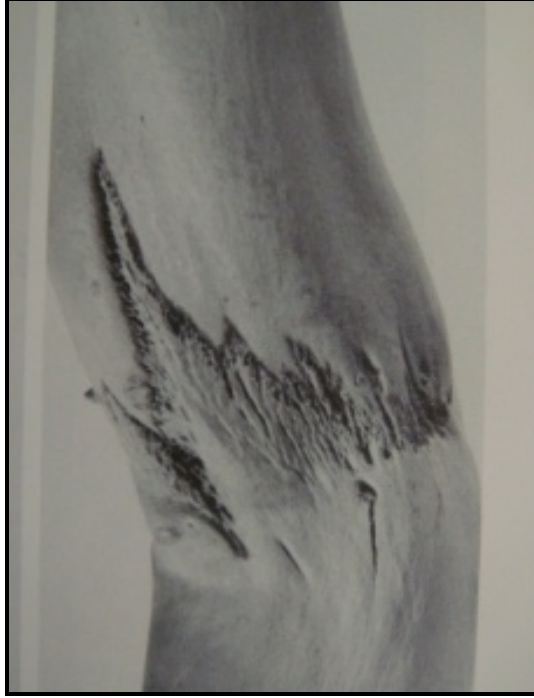
ASGV’nin genel olarak aşı materyali ile taşındığı bilinmesine karşın, Shim ve ark. (2006a, 2006b), tarafından Kore’de yapılan bir çalışmada ASGV-K olarak bilinen ve armutlarda “Pear Black Necrotic Leaf Spot (PBNLS)” Nekrotik Siyah Yaprak Lekesi hastalığına neden olan ırkın *Talaromyces flavus* adlı fungus tarafından taşındığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacı adı geçen fungusun ASGV hastalık etmeninin armut bitkisinin yanı sıra otsu konukçu olan *Phaseolus vulgaris* (fasulye) bitkisine taşınmasında da rol aldığı ortaya koymuştur. Fakat bu çalışma herhangi başka bir araştırmacı tarafından henüz doğrulanmamıştır.

Çizelge 2.3. ASGV’nin tespit edilmiş başlıca ırkları. Anonymous, (2005)

Virüs ırkı	Akronimi	Konukçusu
Apple stem grooving virus	ASGV	Elma- Armut
Citrus tatter leaf virus	CTLV	Turunçgiller
Cherry virus A	CVA	Sert çekirdeklilerde
Liliac chlorotic leaf sport virus	LiCLV	Zambak

2.3.2.3. Hastalık Belirtileri

ASGV elma ve armut ağaçlarında geriye ölüm, gövde odun dokusunda çukurlaşma, yapraklarda damar sararması ve aşı noktasında şişmelere neden olmaktadır (Welsh ve Uyemoto 1980; Desvignes ve ark. 1990). ASGV’nin neden olduğu bu hastalıklara ait belirtiler Şekil 2.9, 2.10., 2.11., ve 2.12’de görülmektedir.



Şekil 2.9. ASGV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu çukurlar (Welsh ve Meer, 1989).



Şekil 2.10. ASGV'nin Virginia Crab üzerinde oluşturduğu dal şişkinliği ve nekrozlar (Desvignes ve ark. 1999).



Şekil 2.11. Virginia Crab elma çeşidinde aşı noktasında meydana gelen nekroz (Lister, 1970).



Şekil 2.12. ASGV enfeksiyonu sonucu *Malus sieboldii*'de görülen aşı noktası nekrozu (Yanase, 1983).

Yapılan çalışmalar sonucunda ASGV ile turunçgillerlerde hastalık yapan CTLV arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu konu ile ilgili olarak devam

eden çalışmalar sonucunda iki farklı virüs olarak bilinen hastalık etmenlerinin aynı virüsün ırkları olduğu ortaya konmuştur (van Regenmortel ve ark., 2000). CTLV hastalık etmeni; limon (*Citrus limon* (L.) Cleopatra mandarin ve üçyapraklı turunçgil anacı (*Poncirus trifoliata* (L.) üzerine aşılı birçok turunçgil çeşidinde cüceleşme, kloroz, aşı noktasında uyuşmazlık, yapraklarda parçalanma ve gövde incilmesi belirtilerine neden olmaktadır. CTLV'nin tipik tatter leaf (parçalı yapraklılık) belirtileri ise *C. excelasa* ve Mexican lime (*C. aurantifolia*) üzerinde deneysel aşılama ile indekslemeden altı ay sonra gözlenmektedir (Frison ve Taher, 1991; Roistacher, 1991; Miyakawa ve Ito, 2000). Osvaldo ve ark. (2002) tarafından Brezilya'da yapılan bir çalışma sonucunda Cleopatra mandarinlerinde (*Citrus reshni*) Fruit intumescence hastalığının da muhtemel bir ASGV izolatı olduğu ortaya konmuştur. Bunların dışında Çin'de kivilerde (*Actinidia chinensis*) görülen damarlar arası çöküntü, yapraklarda mozaik ve halkalı lekeler şeklindeki belirtilerin ASGV enfeksiyonu sonucunda oluştuğu rapor edilmiştir (Clover ve ark, 2003).

ASGV'nin elma ve armut gibi Rosaceae familyasına ait bitkilerden turunçgillerle veya zambak bitkisine nasıl taşındığına dair bir bilgi yoktur. Bununla birlikte ASGV'nin turunçgillerden *Rosaceae* familyasına ait türlere aşı yoluyla geçtiği düşünülmektedir (Herron ve Skaria, 2000). Kore'de armut yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan PBNLS hastalığının ASGV virüsünden kaynaklandığı yapılan elektron mikroskopi, RT-PCR ve gen sekans analizi çalışmaları sonucu Shim ve ark. (2004) tarafından ortaya konmuştur. Bu hastalık armut yapraklarında önce siyah daha sonra nekroze olan ve dökülen büyük yaprak lekelerine yol açmaktadır. Bu enfeksiyon sonucunda yaprak alanının büyük bir kısmı siyah lekelerle kaplanabilmektedir. Böylece fotosentez alanı azalan ağaçta gelişme geriliği ve verim düşüklüğü meydana gelmektedir.

2.3.2.4. Hastalığın Ekonomik Önemi

ASGV için Çek Cumhuriyetinde ELISA testi ile yapılan sürvey çalışmalarında bazı bahçelerde %50 den fazla bir enfeksiyon oranı tespit edilmiştir (Polak ve Zieglerova 2001). ASGV'nin elma ağaçlarındaki ekonomik zarar düzeyi

ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada, bu hastalık etmeni denemeye alınan 14 farklı elma çeşidine aşı yoluyla bulaştırılmış ve takip eden yıllarda gövde kalınlıkları ve boyları ölçülerek hasta bitkiler sağlıklı kontrol bitkileriyle karşılaştırılmıştır. Maxim ve ark. (2004) tarafından yapılan bu çalışma sonucunda ASGV'den dolayı bütün çeşitlerde ortalama % 23,4 ağaç boyunda kısalma ve % 13,7 gövde çapında daralma tespit edilmiştir. Bu etmeden dolayı en büyük kayıp % 64,4 boy kısalması ve % 42,9 çap daralmasıyla Golden Delicious çeşidinde görülmüştür.

ASGV yumuşak çekirdekli meyveler dışında bazı süs bitkileri, sert çekirdekli meyveler ve bazı turunçgillerde de zararlıdır. ASGV'nin turunçgillerde zararlı olduğu bilinen ve CTLV olarak adlandırılan ırkının turunçgil üretiminde ekonomik kayba neden olduğu, özellikle Güney Amerika ülkelerinde ve ABD'de bilinmektedir. Bu nedenle CTLV'nin mücadelesine yönelik olarak ABD'de bu etmen virüs turunçgil sertifikasyon programına da dahil edilmiştir (Skaria ve ark. 1997).

Ülkemizde ASGV'nin ekonomik zarar düzeyini belirlemeye yönelik bir çalışma bulunmamakla birlikte Birişik ve ark. (2008) tarafından Akdeniz Bölgesi elma alanlarında yapılan bir survey çalışmasında alınan örneklerde ELISA testi sonucunda %5 biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda ise % 60 oranında ASGV virüs hastalığına rastlanmıştır. Bu farklı enfekteli düzeyleri ELISA test yönteminin bitkinin farklı fenolojik dönemlerinde alınan örneklerde virüsü teşhis etme yeteneğinin farklılığından veya değişik dönemlerde virüs konsantrasyonunun farklılık göstermesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Birişik ve ark, 2008).

Bu çalışma dışında ülkemizde elma, armut ve ayva üretimi yapılan geniş alanların ve kullanılan çeşitlerin ASGV açısından durumlarına dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Ancak, Kamberoğlu ve ark. (1995) tarafından turunçgillerde yapılan bir çalışmada yurt dışından getirilen üretim materyalleriyle kurulmuş meyer limon bahçelerinde survey çalışmasında elde edilen örneklerde serolojik testler sonucunda CTLV'nin bulunmadığı ortaya konmuştur.

2.3.2.5. Hastalığın Teşhisi ve Mücadelesi

Bu hastalığın teşhisinde genel olarak biyolojik indeksleme, serolojik testler ve

moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu testlerden biyolojik indeksleme amacıyla mekanik inokulasyon ve odunsu indikatörlere aşıyla taşıma çalışmaları yapılmaktadır. Serolojik testlerden ise ELISA testi bu virüsün teşhisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Fakat virüs bitki bünyesinde düşük yoğunlukta bulunduğundan ELISA testi de zaman zaman hatalı negatif sonuçlar verebilmektedir (Kınard ve ark. 1996). Serolojik teşhis yöntemlerinden DIBA (Dot Immuno Binding Assay) ASGV için modifiye edilerek kullanılmış fakat ELISA'dan daha başarılı sonuçlar vermediği görülmüştür (Wang ve ark, 1998). ASGV için yapılan nükleotid dizi çalışmaları sonucunda Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu: RT-PCR) ve Single-Strand Confirmation Polymorphism (Tek Kollu Konformasyonel Polimorfizm: SSCP) teknikleri ile virüsün teşhis imkânları geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Jelkmann, 1994; Yoshikawa ve ark, 1992; Schwarz ve Jelkmann, 1998; Kummert ve ark., 1998; Magome ve ark. 1999). ASGV için ayrıca immunocapture/RT-PCR metodu geliştirilmiş ve uygulanmıştır (Jelkmann ve Keim-Konrad, 1997; James 1999).

Kirby ve ark. (2001) ASGV'nin teşhisinde kullanılan metotları karşılaştırılmış ve ELISA testinin yıllara göre farklı sonuçlar verdiğini, biyolojik indeksleme çalışmalarında ise kullanılan indikatör bitki tür ve çeşitlerinin sonuçlara etki ettiğini, dolayısıyla IC-RT-PCR metodunun bu hastalığı teşhis etmek için en uygun yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Bu hastalıkla mücadelenin esası diğer birçok meyve virüs hastalığında olduğu gibi virüsten arî üretim materyali kullanılmasıdır. Temiz üretim materyali elde etmek amacıyla termoterapi ile meristem kültürü gibi in-vitro üretim teknikleri kullanılmaktadır. ASGV termoterapi ile elemine edilmesi en zor olan latent virüslerdendir. Bununla birlikte enfekteli veya şüpheli bitkiler 37 °C'de 7-8 hafta tutulduğunda virüsten arî bitkiler elde edilebilmektedir (Campbell, 1968). Sertifikalı turunçgil üretim materyalinin ASGV'nin bir ırkı olan CTLV den arî olması önemlidir. Yapılan çalışmalarda CTLV'nin turunçgillerlerden yalnızca sürgün ucu aşılmasıyla (Shoot-tip grafting; STG) elemine edilemediği için ayrıca termoterapi ile kombine edilmesi gerektiği belirlenmiştir. (Frison ve Taher, 1991).

ASGV'nin enfekteli bitkilerden arındırılması ile ilgili olarak yapılan bazı

çalışmalarda doku kültüründen elde edilen bitkilere bazı kimyasalların etkisi araştırılmıştır. Doku kültürü aşamasındaki 9–12 haftalık bitkilere Quercetin ve ribavirin ($10\mu\text{g ml}^{-1}$) uygulamalarının olumlu sonuç verdiği bildirilmiştir (James, 2001). Rusya’da Kivi yetiştiriciliğinde dal uçlarında geriye lme neden olan ve önemli ekonomik kayıplara yol açan ASGV ile mücadelede *Trichoderma harzianum* adlı antogonist fungus denenmiş ve denemede %0,1 İodine Alkol (%5’lik) solusyonu, 1 lt % 2, 5 yağ oranına sahip süt, ve *Trichoderma harzianum* str. VKM F-2477D ırkı toplam 10 lt su içinde karıştırılarak kivi bitkilerine uygulamış ve yapılan bu uygulamanın hastalıkla mücadelede etkili olduğu ve verimi artırdığı rapor edilmiştir (Grinko, 2008).

3. MATERYAL ve METOT

Bu tezin laboratuvar çalışmaları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü ile Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Fitopatoloji şubesi viroloji laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çeşit reaksiyonu çalışmaları ile sera, iklim odası ve screen-house çalışmaları Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirilmiştir. Virüs izolatlarının biyolojik karakterizasyonu amacıyla odunsu indikatörler üzerinde yapılan denemeler ise, Isparta ilinde bulunan Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü deneme alanında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyalleri Adana, Kahramanmaraş, Niğde, Mersin ve Osmaniye illerindeki elma, armut ve ayva alanları ile bu alanlardan toplanan yaprak, sürgün, meyve ve kök örnekleri ile bu örneklerden elde edilen ASPV ve ASGV virüs izolatları oluşturmuştur. Sürvey alanlarından bitki örneklerinin alınması için buz kutusu, plastik torbalar, budama makası ve etiketler ile bu alanlardaki belirtilerin görüntülenmesi amacıyla dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

Örneklerin muhafazası için buzdolabı, derin dondurucu (-20, -80 °C) ve + 4°C soğuk oda ve farklı büyüklüklerdeki plastik tüpler ile petri kapları kullanılmıştır. Serolojik teşhis çalışmalarında Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilen ApMV, ACLSV, ASPV ve ASGV spesifik ELISA kitleri kullanılmıştır. Örneklerin özsuynun çıkarılmasında porselen ve cam havan setlerinden faydalanılmıştır. ELISA çalışmaları Merck, Sigma, Carloerba vb. değişik firmalardan temin edilen kimyasallarla hazırlanmış olan tampon çözeltiler ile yürütülmüştür. Bu çözeltilerin içeriği EK-1'de verilmiştir. ELISA plateleri Titertek-Multiskan ve Tecan-Sunrise ELISA okuyucularında 405 nm dalga boylu filtre kullanılarak okunmuştur.

RT-PCR çalışmalarında ise Promega (ABD) firmasından temin edilen SV Total RNA İzolasyon kiti, GoTaq Flexi DNA Polymerase, M-MLV Reverse Transcriptase, Proteinase K enzimleri ile Bench Top 100bp DNA Ladder Markır, MgCl, RNasin (Ribonükleaz inhibitörü) ve dNTP's setleri kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarda İontek (Türkiye) firmasından temin edilen Oligonükleotidler (primer) kullanılmıştır. Tezin moleküler kısmında yer alan RFLP çalışmaları ise Fermentas

(Kanada) firmasından temin edilen restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılmıştır. Moleküler çalışmalarda Eppendorf Mastercycler Gradient PCR Thermocycler, Eppendorf 5429 ile Hettich micro 12-24 mikro santrifüjleri, Sigma 2-16 K soğutmalı santrifüj, Eppendorf Thermomixer compact karıştırıcılı ısıtma bloku, Sartorius CP 323 S hassas terazi, Orison GLP 22 pH metre, Sellecta-Agimatic N ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Sellecta-precisng su banyosu ile Pipetman, Biohit-proline ve Gilson mikropipet setleri ve vortex cihazı kullanılmıştır. Elektroforez ve jel görüntüleme çalışmalarında ise Ter-Max yatay jell tankı, Agaroz (Sigma), Consort E 861 güç kaynağı, Barnsteadlab-line e-class çalkalayıcı, Sony-Lip 895 CE Video Graphic printer ile etihidium bromide muhafaza tankından faydalanılmıştır.

Mekanik inokulasyon ve biyolojik karakterizasyon çalışmalarında ise 4000 lüx aydınlatmalı iklim odası, çift katlı 0,7 mm aralıklı screen house, sera, otomasyonlu damla sulama sistemi, yaprak gübrelere, organik sıvı gübreler ile tarım ilaçları, ayrıca harç hazırlanmasında torf, perlit, dezenfekte edilmiş bahçe toprağı ve hayvan gübresi kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan otsu indikatör bitki tohumları İtalya'da bulunan Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari (IAM-Bari) enstitüsünden ve Hollanda karantina servisinden (PDI-Wageningen), çeşit reaksiyon denemesinde kullanılan elma fidanları ise aşılı olarak Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Biyolojik karakterizasyon çalışmalarında kullanılan odunsu indikatör bitkiler Norveç'te faaliyet gösteren Gartnerhalles Eliteplantestasjon Sauherad isimli özel bir fidancılık firmasından alınmıştır.

Yukarıda verilen materyallerin dışında moleküler çalışmalarda değişik firmalardan temin edilen; Phenol, chloroform, lithium chloride, SDS, NaCl, Glikoz, Bromophenol blue, Tris, Sodyumasetat, Potasyumasetat, EDTA, PEG, alkol, RNase free su, miliQ su, değişik boylarda santrifüj tüpleri, tülbent, parafilm, alimünyum folyo, sterilizasyon bandı, plastik ve cam pipetler, otoklav, etüv, inkübator, dijital kumpas, steril cam malzeme vb. diğer laboratuvar araç gereçleri kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Sürvey Yapılacak Alanların Belirlenmesi

Çalışmaların yürütüldüğü bölgelere ilkbahar ve sonbaharda yapılan arazi ziyaretleri ile sürvey çalışması yapılmıştır. Sürvey çalışmalarında alınan örnek sayısı Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere ilgili meyve türünün o ildeki varlığına bağlı olarak hesap edilmiş, fakat genel olarak planlanan sayıdan daha fazla örnek alınmıştır. Ağaç varlığına göre, çalışma boyunca 73 bahçeden örnek alınması planlanmış olup çalışma süresince imkanların elverdiği ölçüde ve çalışmaların daha da detaylandırılması için toplam 134 bahçeden örnek alınmıştır.

Çizelge 3.1. Sürvey çalışmalarında örnek alınan iller, türler ve bahçe sayıları .

İl	Tür	Ağaç varlığı (TÜİK, 2009).	Planlanan bahçe sayısı	Gerçekleşen bahçe sayısı
Adana	Elma	327.746	8	13
	Armut	67.765	4	13
	Ayva	4.075	1	5
Mersin	Elma	1.147.451	8	9
	Armut	150.994	6	7
	Ayva	30.267	2	4
Osmaniye	Elma	64.764	5	7
	Armut	15.355	2	3
	Ayva	1.400	1	3
Niğde	Elma	4.316.466	12	12
	Armut	117.735	6	6
	Ayva	4.464	2	4
Kahramanmaraş	Elma	1.211.230	8	23
	Armut	119.085	6	8
	Ayva	22.930	2	17
Toplam		7.601.727	73	134

Örneklemede yer alan bazı illerde ağaç sayısı az olduğu halde, örneklenecek bahçe sayısı yüksek tutulmuştur. Bunun nedeni; bu bölgelerde yerel çeşitlerin bulunma ihtimalinin yüksek olması veya sık dikim (bodur-yarıbodur) bahçe tesis edilmesidir. Bu planlı örneklemenin dışında Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsüne Tarım Bakanlığının taşra teşkilatlarından gönderilen örnekler ve çalışma süresince diğer bazı projeler için araziye gidildiğinde planlama dışı alınan örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmalar esnasında imkanlar ölçüsünde elde edilen bulguların güçlendirilmesi amacıyla daha fazla sayıda bahçeden örnek alınmıştır.

3.2.2. Sürvey Alanındaki Bahçelerden Örneklerin Alınması

Örnek almak amacıyla belirlenen bahçelerde örnekleme basit tesadüfi usulle yapılmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Buna göre; örnek sayısı bahçe büyüklüğüne bağlı olarak planlanmıştır; 5 da'dan küçük bahçelerden üç, 5-10 da olan bahçelerden dört, 10 da'dan büyük bahçelerden ise altı ila oniki arasında bir ağaç sayısı olarak hesaplanmıştır. Örnek alınan ağaçlar öncelikle semptomatolojik olarak kontrol edilmiştir. Bu kontroller esnasında ağaçlarda görülen epinasty, aşı noktasında şişme, aşı noktasında nekroz, meyvelerde şekil bozuklukları, yapraklarda renk bozulması, leke oluşumu ve deformasyon gibi belirtiler aranmış ve herhangi bir belirti tespit edildiğinde kaydedilmiştir. Örnek alınan ağacın her yönünden (doğu, batı, kuzey, güney) 15–20 cm uzunluğunda bir yıllık sürgünler alınmıştır. Bir ağaçtan alınan örneklerin hepsi plastik torbaya konularak etiketlenmiş ve bir örnek olarak kabul edilmiştir. Bu örnekleme metodu rutin sürvey çalışmalarında kullanılmıştır.

Sürvey çalışmalarında pozitif bulunan bazı ağaçlar belirlenerek hastalık etmenlerinin bitkinin hangi dokusunda daha iyi teşhis edildiğinin araştırılması için sonraki dönemlerde tekrar ziyaret edilmiştir. Belirlenen bu ağaçlardan çiçek dönemindeyken örnek alınmaya başlanmış olup, vejetasyon dönemine bağlı olarak çiçek, yaprak, kabuk, meyve, meyve eti, meyve kabuğu ve meyve çekirdeği örneklendirilmiştir. Alınan bu örnekler plastik torbalara konularak ve örnek alınan ağaca dair bilgiler bir etikete yazılarak numaralandırılmıştır. Karakteristik belirti gösteren ve numaralandırılan ağaçların aynı zamanda fotoğrafları da çekilerek gerektiğinde ağaçların bulunması ve tekrar örneklenebilmesi için bahçe içindeki yerlerinin krokisi çizilmiştir. Örnekler toplandıktan sonra etiketlenerek buz kutusu içinde soğuk ortamda laboratuara getirilmiştir.

Sürvey çalışmaları esnasında alınan örneklerin ELISA sonuçları göz önünde bulundurularak aynı ağaçlardan forse (sürgün vermeye teşvik) edilmek üzere dormant (durgun) dönemde (Kasım-Aralık) 20–25 cm uzunluğunda bir yaşlı sürgünler alınmıştır. Alınan sürgünler etiketlenerek soğuklama ihtiyacının karşılanması amacıyla 1/1 oranında torf/kum karışımı içinde katlanarak 60 gün süreyle +4 °C muhafaza edilmiştir. Soğuklama ihtiyacı karşılanan sürgünler 18-25 °C

sıcaklık, %70 nem ve 16/8 saat (aydınlık/karanlık) ışık koşullarında sürmeye teşvik edilmiştir. Bu uygulama sonucunda elde edilen yaprak ve sürgünler vejetasyon döneminde alınan örneklerin ELISA testi sonuçlarıyla karşılaştırılmak üzere kullanılmıştır (Birişik ve ark., 2008).

3.2.3. DAS-ELISA Çalışmaları

Araziden toplanan örnekler Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilen Polyclonal antiserum içeren ticari ELISA kitleri kullanılarak, literatürde önerilen (Clark ve Adams, 1977; Clark ve Bar-Joseph, 1984) DAS-ELISA metodu ve firma tavsiyelerine göre test edilmiştir. ELISA testleri aşağıda belirtilen şekilde teşhis, en uygun örnekleme zamanının, en uygun bitki dokusunun belirlenmesi ve örnek muhafaza koşullarının tesbiti çalışmalarında kullanılmıştır. ApMV ve ACLSV kitleri sürvey amaçlı değil, ASGV ve ASPV belirtilerinin başka viral hastalık etmenlerinden kaynaklanmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. ELISA okumaları 405 nm'de Tecan-Sunrise ELISA reader'da yapılmış ve sonuçlar, negatif kontrol OD değeri $x 3 \pm \%10$ şeklinde hesap edilmiş ve bu sonuca göre ELISA pozitif bulunanlar enfekteli kabul edilmiştir. ELISA test çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler EK.1'de verilmiştir.

DAS-ELISA uygulamaları aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır.

- a. Kaplama: 1/1000 oranında sulandırılmış olan IgG (γ -glubulin) (Polyklonal antiserum) ELISA pleytinin her çukuruna 100 μ l olacak şekilde konmuştur. Bu pleyt üzeri plastik kapakla kapatılarak +4 $^{\circ}$ C ON (Overnight=bir gece) veya 30 $^{\circ}$ C / 5 saat olacak şekilde inkubasyona bırakılmıştır. Bu süreden sonra çıkarılan pleyt 3 kez 3'er dk. olmak üzere yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- b. Örnek İlavesi: ELISA testi için alınan örnekler 1/10 w/v (hacim/ağırlık) olacak şekilde ekstraksiyon tamponunda ezilmiştir. Ezilen örnekler buradan alınarak 2 ml tüplere konmuş, daha sonra her örnek için ELISA pleytinde iki çukur kullanılarak 100'er μ l örnek çukurlara yerleştirilmiş ve şema üzerine kaydedilmiştir. Örnek ilavesinden sonra temin edilen ticari pozitif ve negatifler ilave edilmiş ve plate

+4 °C ON veya 30 °C / 5 saat olacak şekilde inkubasyona bırakılmıştır ve pleyt 3 kez 3'er dk. olmak üzere yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

c. Konjugate ilavesi: İnkubasyon süresinin sonunda ELISA pleyti alınmış ve 1/1000 oranında sulandırılan konjugate her çukura 100 µl ilave edilerek pleyt +4 °C ON veya 30 °C / 5 saat olacak şekilde bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra pleyt yine 3 kez 3'er dk. olmak üzere yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

d. Substrate ilavesi: Substrat tamponu içerisinde taze olarak 1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan substrate (p-nitrophenyl phosphatate) her çukura 100 µl olacak şekilde pleyte ilave edilmiş ve plate oda sıcaklığında inkube edildikten sonra 1, 2, ve 4 saat arayla üç okuma yapılmış ve kaydedilmiştir. Pleyt daha sonra +4 °C ON tutulmuş ve tekrar okuma yapılmıştır.

3.2.4 Sürvey Alanlarında Makroskobik Gözlemler

Arazi çalışmaları 2006 yılında başlamış olup, bu dönemden sonra her sürvey çıkışında hastalıkların elma, armut ve ayva üzerindeki belirtileri gözlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, özellikle önceki sürvey dönemlerinde DAS-ELISA sonucu pozitif olan örnekler ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde tekrar ziyaret edilmiş ve viral hastalık etmenleriyle ilişkilendirilebilecek belirtileri not edilmiştir. Bu çalışmalarda ASPV veya ASGV ile ilişkilendirilebilecek her türlü yaprak, meyve, gövde ve sürgün belirtileri aranmıştır. Bir belirtiyeye rastlanması durumunda işaretlenen ağaçlar sonraki vejetasyon dönemlerinde tekrar ziyaret edilmiş ve aynı belirtilerin otaya çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Üç yıl boyunca yapılan bu çalışmalar, yaprak, meyve ve gövde belirtileri olarak sınıflandırılmış ve her hastalık etmenine göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Makroskobik gözlemler için takip edilen ağaçlar, gözlenen belirtilerin bu meyve türlerinde görülen ApMV ve ACLSV gibi diğer viral hastalık etmenlerinden oluşup oluşmadığının anlaşılması için test edilmiştir. Makroskobik gözlemler esnasında tespit edilen bazı belirtilerin viral olmayan biyotik ve abiyotik diğer bazı hastalık veya zararlılardan dolayı oluşup oluşmadığının tespiti için alınan örnekler ve

kaydedilen gözlemler meyve hastalıkları konusunda çalışan uzmanlarla birlikte değerlendirilmiştir. Makroskobik gözlemler esnasında besin elementi noksanlığı vb. abiyotik etmenlerden veya fizyolojik nedenlerden dolayı oluştuğu düşünülen gözlem ve örnekler ise bahçe bitkileri konusunda uzman kişilerle birlikte değerlendirilmiştir. Ayrıca gözlem yapılan bahçelerde eğer varsa toprak ve yaprak analiz sonuçları da değerlendirilmiş ve bahçede yapılan uygulamalar konusunda bahçe sahipleriyle görüşülmüştür.

3.2.5. Mekanik İnokulasyon

Teşhis ve karakterizasyon amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları Dijkstra ve Jager (1998)'in bildirdiği şekilde yapılmıştır. Özellikle ASPV için ticari ELISA kiti ilk kez bu çalışmada kullanıldığından dolayı ASPV ile enfekteli olduğu şüpheli olan örneklerden daha fazla sayıda mekanik inokulasyon çalışması yapılmıştır. Mekanik inokulasyon çalışmalarında konukçu bitkilerin orta yaşlı yaprakları kullanılmıştır (Nemeth, 1986: Refatti ve ark. 1996: Boscia ve ark. 1999).

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri hastalık belirtilerinin gözlenmesi amacıyla 20 ± 2 °C ye ayarlanmış en az 4000 lüks aydınlatma kapasitesine sahip 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olan klima odalarında muhafaza edilmiştir. Belirtiler ilk haftadan sonra günlük olarak gözlenmiş ve belirtiler kaydedilmiştir. Bitkiler 5 haftalık olduktan sonra gözlemlere son verilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında 0,01M Fosfat tamponu (1,362 gr KH_2PO_4 , 1,781 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 gr Egg Albumin 1lt için, pH 8.0) kullanılmıştır (Dijkastra ve Jager, 1998).

Mekanik inokulasyon çalışmalarında Çizelge 3.2'de verilen otsu indikatör bitkilerden her denemede bir karakter için 4 adet kullanılarak tekerrür oluşturulmuştur. Her bir denemede sadece Phosphat buffer ile muamele edilmiş, 4 bitkiden oluşan negatif kontrol yer almıştır. Denemedeki bütün bitkiler aynı toprak karışımında normal bakım koşullarında dengeli besleme ve sulama yapılarak yetiştirilmiştir. Test bitkilerinin hastalık ve zararlılardan korunması amacıyla bitki

koruma önlemleri alınmıştır. Bu çalışmaların yürütüldüğü iklim odasındaki test bitkileri Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmalarının yapıldığı iklim odasından bir görüntü.

Çizelge 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan otsu test bitkileri.

No	İndikatör bitki
1	<i>Chenopodium quinoa</i>
2	<i>C. amaranticholor</i>
3	<i>Nicotiana occidentalis</i>
4	<i>N. occidentalis</i> cvs. P1
5	<i>N. benthamiana</i>
6	<i>N. glutinosa</i>
7	<i>N. tabacum</i> cvs. White Barley
8	<i>Cucumis sativus</i>
9	<i>Phaseolus vulgaris</i>
10	<i>Gomphrena globosa</i>

3.2.6. Odunsu İndikatör Bitkilere Aşılama

Odunsu indikatör bitkilere aşılama faaliyetleri bu çalışma kapsamında iki amaçla yapılmıştır. Bunlardan ilki virüs izolatlarının teşhisi ve karakterizasyonu ile

ticari bazı elma çeşitlerinin bu virüs hastalıklarına gösterdikleri reaksiyonların belirlenmesi amacıyla enfekteli bitkilerden sağlıklı çöğür veya fidanlara yapılan aşılamalardır. Bu aşılama Nemeth (1986), Refatti ve ark. (1996), ve Boscia ve ark. (1999)'nın bildirdiği yöntemlere göre yapılmıştır.

ASGV ve ASPV'nin karakterizasyonu için enfekteli elma ve armut ağaçlarının sürgünlerinden Çizelge 3.3'te verilen her bir indikatör bitkiye 1 göz, ve 2 kabuk olmak üzere toplam 3 aşı yapılmıştır. İndeksleme çalışmalarında kullanılan indikatör bitkiler ISHS (Anonymus, 2004) önerilerine göre seçilmiş ve bu bitkiler virüsten arı olacak şekilde Norveç'ten temin edilmiştir. Yurt dışından temin edilen bu indikatör bitkilerden alınan gözler daha önceden araziye dikilmiş 2 yaşlı çöğürlere aşılanmış ve gelişmeleri beklenmiştir. Çöğürlere aşılanan indikatör bitkilere yaklaşık 6 ay sonra enfekteli olduğu tespit edilmiş elma ağaçlarından alınan sürgünlerden aşılama yoluyla bulaştırma yapılmıştır. Bulaştırma amaçlı aşılama çalışmalarında her indikatörden bir negatif kontrol olmak üzere iki bitki kullanılmıştır. Aşılanan bitkilerin normal bakım ve beslemeleri yapılmış, vektör böceklere karşı ilaçlanmış, ve budama aletleriyle taşınan hastalıkların bulaşmaması amacıyla herhangi bir budama veya kesim yapılmamıştır. Aşılamadan iki yıl sonra belirtilerin incelenebilmesi için aşılanan bitkilerden gövde kesme ve kabuk kaldırma işlemi yapılmış ve gözlenen belirtiler not edilmiştir. Odunsu indikatör bitkilerle yapılan bu çalışma Şekil 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3.3. Odunsu bitkilere indeksleme çalışmasında kullanılan indikatör bitkiler.

İndikatör ismi	Tür ismi	Anaç
Virgina crab	<i>Malus sylvestris</i> cv.	Çöğür
Spy 227	<i>Malus sylvestris</i> cv.	Çöğür
Lord Lamborne	<i>Malus domestica</i>	Çöğür
<i>Malus Platycarpa</i>	<i>Malus Platycarpa</i>	Çöğür
Gravenstain Rellstab	<i>Malus domestica</i>	Çöğür



Şekil 3.2. Odunsu indikatörler üzerinde yapılan biyolojik karakterizasyon çalışmasından bir görüntü (Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Isparta).

3.2.7. Enfekteli Bitki Dokularından Nükleik Asit İzolasyonu

Araziden toplanan ve ELISA testinde yüksek absorbands değeri ile pozitif sonuç veren örneklerden bazıları ile ELISA testinde negatif sonuç veren örneklerden tesadüfen seçilen bir kısım örneklerden ASGV ve ASPV'nin moleküler analizlerinde kullanılmak üzere nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Birinci yöntemde; Kobs, (1998), tarafından bildirilen ve Promega firmasınca SV Total RNA izolasyon kiti için önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde;

- ✓ Şüpheli bitkiden alınan yaprak örnekleri su ile temizlenerek sıvı azot içinde ezilmiştir.
- ✓ Toz haline gelen örneklerden 30 mg alınarak kullanılmıştır.
- ✓ Alınan 30 mg dokuya önce 175 µl Lysis buffer (RLA), daha sonra 350 µl RNA dilutaion (RDA) buffer ilave edilerek birkaç kez elle karıştırılmıştır.
- ✓ Bu karışım daha sonra 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Çökelti atılarak sıvı faz yeni bir tüpe alınmıştır.
- ✓ Sıvı faza 200 µl %99 ETOH ilave edilerek pipetle yavaşça karıştırılmıştır.
- ✓ Elde edilen bu karışım pipet yardımıyla tüm RNA'ların yapışacağı spin kolonuna aktarılmış ve kolon atık tüpünün içinde olacak şekilde 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Bu aşamadan sonra kolon alınarak yeni bir tüpün içine yerleştirilmiş ve kolona 600 µl RNA yıkama solüsyonu konularak (RWA) 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmek suretiyle RNA temizlenmiştir.
- ✓ Ortamdaki DNA'ların temizlenmesi için kolona 50 µl DNase inkubasyon karışımı ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 20-25 dk inkubasyona bırakılmıştır. Bu karışım her seferinde taze hazırlanmış ve pipet yardımıyla kolona yavaşça ilave edilmiştir.
- ✓ 200 µl DNase stop solüsyonu (DSA) spin kolonun içine ilave edilerek DNase aktivitesi durdurulmuş ve 14.000 rpm'de 1 dk olacak şekilde tekrar santrifüj

edilerek kolon DNA'dan temizlenmiştir.

- ✓ 600 µl RNA yıkama solüsyonu (RWA) kolona ilave edilerek 14.000 rpm'de yeniden 1 dk santrifüj edilmiş ve bu aşama 250 µl RNA yıkama solüsyonu (RWA) ilave edilerek ikinci kez tekrar edilmiştir.
- ✓ Kolon bu aşamadan sonra tüpten çıkarılmış ve toplama tüpüne konulmuştur. Kolonda mevcut RNA'ların toplama tüpüne alınması amacıyla 100 µl Nükleaze enziminden ari su ilave edilmiştir.
- ✓ Bu aşamadan sonra kolon 14.000'de rpm 1 dk santrifüj edilerek elde edilen 100 µl RNA içeren sıvı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

İkinci yöntemde: Kundu (2002), tarafından önerilen Fenol-cloroform ve LiCl (Lithium Chloride) esaslı ekstraksiyon metodudur. Bu yöntem aşağıda verilen aşamalar takip edilerek yürütülmüştür.

- ✓ 1:10 (ağırlık/hacim) miktarındaki bitki örneği 20 mM ekstraksiyon tamponu (20 mM Tris-HCl pH7,4, 200 mM LiCl, 20 mM EDTA, %1 SDS) varlığında steril havan içerisinde ekstrakte edilmiştir.
- ✓ Ekstrakt 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek 500 µl süpernatant alınmış ve yeni bir tüpe konulmuştur.
- ✓ Bu tüpe 5 µl Proteinase K enzimi (20 mg/ml) ilave edilmiş ve 37°C 1 saat inkube edilmiştir.
- ✓ İnkubasyondan sonra karışıma aynı miktarda (500 µl) fenol/kloroform (1/1) ilave edilerek 10 dk karıştırılmış (vorteks) ve 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üst sıvı faz alınarak işlem ikinci kez tekrar edilmiştir.
- ✓ Yine üst sıvı faz alınarak 3 katı kadar soğuk alkol (ETOH) ve 2 M LiCl karışımı ilave edilerek vortexte karıştırılmış ve -20°C'de 45 dk. virüs partiküllerinin çökmesi için bırakılmıştır.
- ✓ Çökelmeye bırakılan karışım 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve sıvı faz dikkatlice atılarak çökelti muhafaza edilmiştir.
- ✓ Tüpteki çökeltiye 100 µl %70 soğuk ETOH ilave edilip 10 dk oda

sıcaklığında bekletilmiştir.

- ✓ Daha sonra ETOH ilave edilmiş pellet 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmek suretiyle yıkanmış ve bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.
- ✓ Çökelti vakum altında veya ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur.
- ✓ Bu aşamadan sonra tüplere 50 µl DEPC (Diethyl pyrocarbonate) kullanılarak steril edilmiş deionise su ilave edilerek tRNA çözdürülmüş ve kullanılıncaya kadar -20⁰C muhafaza edilmiştir.

3.2.8. Revers Transkripsiyon: RT

RT çalışmaları Kundu (2002)'ye göre yapılmıştır. Çalışmalarda izole edilmiş olan nükleik asitlerden her bir virüs için 2 µl RNA alınarak içinde 10 pmol primer (Çizelge 3.4. ASPV-A veya ASPV-II ile ASGV-2 veya ASGV-4R) bulunan 10 µl steril su (DEPC ile muamele edilmiş) ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 70⁰C'de 5 dk inkube edildikten sonra soğuması için buz içerisine konmuştur. Daha sonra bu örneklerle hazırlanmış olan RT reaksiyon karışımı (Promega firmasından temin edilen 5,25 µl RNAase ari su, 300 Unite M-MLV reverse transcriptase enzimi, 5 µl M-MLV tamponu, 20 Unite RNAsin enzimi ve 0.2 mM dNTP nükleotid) ilave edilerek 37⁰C'de 1 saat tutulmuş ve 100⁰C'de 5 dk ısıtılarak elde edilen cDNA daha sonra kullanılmak üzere -20⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu: PCR

PCR çalışmaları Kundu (2002)'ye göre yapılmıştır. Mikrotüp içerisinde hazırlanan PCR karışımı; Promega firmasından temin edilen 2.5 µl Taq-polymerase tamponu ve 2.5 Unite Taq-polymerase, 10 pmol reverse ve forward primer (İontek), 0.2 mM dNTPs ve 1.25 mM MgCl₂ kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım deionize su ile 23 µl'ye tamamlanarak üzerine 2 µl daha önce elde edilmiş

cDNA ilave edilmiş ve reaksiyon PCR cihazında (thermocycler) aşağıdaki gibi uygulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

ASPV:

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Denatürasyon (Ayrılma): 94 °C'de 45 saniye,

Anneling (Bağlanma): 55 °C'de 1 dk. (ASPV-A/ ASPV-C) veya 62 °C'de 45 saniye (ASPV-I /ASPV-II) primerlerinin yapışması için ve,

Extantion (Uzama): 72 °C'de 1 dk.

Yalnız son döngüden sonra 72 °C'de 10 dk daha yapılarak PCR verimliliği arttırılmaya çalışılmıştır (Kundu, 2002).

ASGV:

Toplam 35 döngü olacak şekilde;

Denatürasyon (Ayrılma): 94 °C'de 30 saniye,

Anneling (Bağlanma): 55 °C 45 saniye. (ASGV-U/ ASGV-2) veya 62 °C 1 dak (ASGV-4F /ASGV-4R) primerlerinin yapışması için ve,

Extantion (Uzama): 72 °C'de 1 dk (polymerisation) olarak ayarlanmıştır.

Ayrıca son döngüden sonra 10 dk 72' °C daha ilave edilerek PCR verimliliği arttırılmaya çalışılmıştır (Kundu, 2002).

Çizelge 3.4. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerler.

Virüs	Primer	Baz dizisi	Büyükük ^x	Referans
ASPV	ASP-C ^a ASP-A ^b	5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3' 5'-ATAGCCGCCCGGTTAGGTT-3'	264 bp	Jelkman ve Keim-Konrad (1997)
	ASP-I ^a ASP-II ^b	5'-AAGAGAAGACATCCAGATTTG-3' 5'-CTATAGCCTCTCCCTTGGT-3'	553 bp	Kundu (2001)
ASGV	ASGV-U ^a ASGV-2 ^b	5'CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC-3' 5'-GGAATTTACACGACTCCTAACCTCC-3'	499 bp	James (1999)
	ASGV-4F ^a ASGV-4R ^b	5'-GTTCACTGAGGCAAAGCTGGTC-3' 5'-GACGACACCTTCTCCATGCCTTC-3'	574 bp	Kummert ve ark. (1998)

a= Forward primer (upstream)

b=Reverse primer (Downstream)

x= Çoğaltılan gen bölgesinin bp sayısı.

3.2.10. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan ASPV ve ASGV izolatlarının nükleik asit yapılarındaki farklılıkları belirlemeye yönelik olarak RT-PCR sonucu elde edilen PCR ürünü nükleik asitler farklı restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilmiştir. RFLP çalışmaları Fermentas firması tarafından önerilen uygulama protokolü doğrultusunda Çizelge 3.5'te gösterilen enzimlerle gerçekleştirilmiştir. Bu enzimlerle muamele edilmiş olan PCR ürünü nükleik asitlerle daha sonra %2'lik Agaroz jel ortamında elektroforez yapılmıştır. Elektroforez çalışmaları sonunda jel ethidium bromide ile boyanmış ve görüntülenmiştir (Galitelli ve Minafra, 1994).

Çizelge 3.5. RFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon enzimleri.

No	Enzim	Kestiği gen bölgesi	Kaynağı	Konsantrasyonu
1	HindII	5'...G Pu ↓ C G Py C..3' 3'...C Py G C ↑ Pu G ...5'	<i>Heamophilus influenza</i> RFL1	10 U/μl
2	HindIII	5'...A ↓ A G C T T..3' 3'...T T C G A ↑ A...5'	<i>Heamophilus influenza</i> Rd	10 U/μl
3	RsaI	5'...G T ↓ A C..3' 3'...C A ↑ T G...5'	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	10 U/μl
4	EcoRI	5'...G ↓ A A T T C..3' 3'...C T T A A ↑ G...5'	<i>Escherichia coli</i> RY 13	10 U/μl
5	PstI	5'...G T G C A ↓ G...3' 3'...G ↑ A C G T C...5'	<i>Providencia stuarti</i>	10 U/μl
6	AluI	5'...A G ↓ C T...3' 3'.....T C ↑ G A...5'	<i>Arthrobacter luteus</i>	10 U/μl

RFLP Uygulama Protokolü

- 10 μl PCR reaksiyon karışımı alınarak 0,2 ml steril tüpe konulmuştur.
- Üzerine 18 μl Nükleaz enziminden ari su ilave edilmiş,
- Bu karışımın üzerine 2 μl 10X G tamponu (Fermentas) eklenmiş,
- Daha sonra Çizelge 3.5'te belirtilen enzimlerin birinden 1-2 μl alınarak karışıma ilave edilmiştir.
- Bu karışım hafifçe çalkalanarak daha sonra 3-4 sn santrifüj edilmiştir.
- Enzim ilave edilen karışım 37⁰C 8-16 saat inkubasyona bırakılmıştır.
- Enzim faaliyetinin durdurulması için enzime bağlı olarak belli sıcaklık ve sürelerde ısıtılarak inaktivasyon işlemi yapılmıştır (HindII, EcoRI ve AluI için 65 ⁰C 20 dk, HindIII, RsaI, PstI için 80 ⁰C 20 dk).
- Kesilen DNA parçalarının ayırımı için 60V elektrik ortamında 1.5 saat süreyle %2 oranındaki agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır..
- Son olarak ethidium bromide ile boyanan jel UV altında görüntülenmiştir.

NOT: Yukarıda verilen protokol bir örnek içindir.

3.2.11. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR ve RFLP çalışmalarının sonuçların değerlendirilmesi ve elde edilen DNA parçalarının görüntülenmesi için agaroz jel elektroforez çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre aşağıda anlatıldığı şekilde yürütülmüştür. Jeldeki agaroz oranı RT-PCR ürünleri için %1,5 RFLP uygulamalarının görüntülenmesi için %2 olarak ayarlanmış ve genel olarak elektroforez işleminden sonra jel, 0.5 µg/ml oranında ethidium bromide içeren solüsyona konularak boyanması sağlanmış ve elde edilen bantlar görüntülenmiştir. Bu çalışmaların uygulanması sırasıyla şöyledir;

- ✓ Cam erlen içerisine 1,5 (%1,5) veya 2 gr (%2) agaroz tartılarak konmuş ve üzerine 75 ml 1X TAE tampon ilave edilmiştir. Bu karışım mikro dalga fırında tamamen eriyinceye kadar ısıtılmış, eriyen karışım sonuçta 100 ml olacak şekilde TAE tampon çözeltisi ile tamamlanmış ve 60⁰C sıcaklıktaki su banyosunda tutularak yavaşça soğuması beklenmiştir.
- ✓ Jel tankı hazırlanarak tarak takılmış ve su banyosunda 60⁰C sıcaklığa gelen karışım alınarak tanka dökülmüştür. Oda sıcaklığında bekletilen jel 15-20 dk içerisinde tamamen donduktan sonra tarak çıkarılarak jel aparatı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiştir.
- ✓ 1 X TAE tamponu jelin üzerini 1-2 mm kaplayacak şekilde elektroforez tankının içerisine doldurulmuştur.
- ✓ Örnekler 10-12 µl PCR veya RFLP ürünü ile 2-3 µl 6 X yükleme tamponu (Loading Dye) olacak şekilde toplam 12-15 µl'lik karışım jelde açılmış kuyucuklara mikropipetle yerleştirilmiştir.
- ✓ Örnekler yerleştirildikten sonra 6 µl Markır en soldaki çukura gelecek şekilde yerleştirilmiş ve sağdaki en son çukura ise negatif kontrol konulmuştur.
- ✓ Tank kapağı kapatılarak güç kaynağı açılmış 50-70 V elektrik ortamında jel koşulmuştur. Markırda yer alan turuncu bandın jelde son 1 cm alan kalıncaya kadar ilerlemesi sağlanmış ve bu aşamada işleme son verilmiştir.

- ✓ İşlemin sonunda tanktan alınan jel oda sıcaklığında ethidium bromid ile boyanmış ve daha sonra UV-transliminatörde görüntülenmiştir.

3.2.12. Çeşit Reaksiyon Denemeleri

Bu çalışma ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bazı ticari elma çeşitlerinin (Çizelge 3.6) ASPV ve ASGV izolatlarına ne tür tepkiler verdiklerinin belirlenmesi için yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle ülkemizde son yıllarda çok talep gören elma çeşitleri erkenci, güzlük ve kışlık olarak farklı tiplerde olmasına dikkat edilerek belirlenmiştir. Böylece hastalık etmenlerinin değişik dönemlerde ve rakımlarda yetiştirilen elma çeşitlerine farklı etkilerinin olup olmayacağı gözlenmeye çalışılmıştır. Denemeye alınacak çeşitlerin belirlenmesinden sonra, bu çeşitler her iki hastalık etmenine de duyarlı olduğu bilinen MM106 üzerine aşılı fidan olarak Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilmiştir.

Çeşit reaksiyon denemeleri Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan ve etrafında bu hastalıklara konukçuluk eden herhangi bir bitkinin bulunmadığı tel evlerde (Screen-House) kurulmuştur.

Denemede kullanılan fidanların ASPV, ASGV, ApMV ve ACLSV ile enfekteli olup olmadığının belirlenmesi için dikimden önce tüm fidanlara DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Bu testler sonucunda temiz bulunan 8 farklı elma çeşidine ait toplam 80 fidan 40 X 70 cm boyutlarında varillere 1/1/1/ oranındaki torf+kum+bahçe toprağı ortamına dikimleri yapılmıştır. Deneme Screen-house'ta tesadüf bloklarına göre yapılmış olup deneme süresince bütün bitkilere aynı kültürel işlemler uygulanmıştır. Deneme alanında hastalık ve zararlılar görüldüğünde ruhsatlı etkili maddelerle ilaçlı mücadele yapılmıştır.

Deneme süresince bitkilerde herhangi bir budama veya kesme işlemi yapılmamış ve yeni bulaşmalara meydan vermemek için screen house giriş çıkışlar kontrol altına alınmıştır.

3.2.12.1. Çeşit Reaksiyon Deneme Planı

Çeşit reaksiyon deneme planında yer alan karakterler ve denemeye ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

1. Karakter: Virüsler : ASPV (P2 elma izolatu, EK. 3).
: ASGV (G2 elma izolatu, EK. 3).
2. Karakter: Çeşitler : 8 farklı elma çeşidi.
Yazlık : Jersey mac, Summer Red, Vista Bella.
Güzlük : Fuji, Galaxy Gala
Kışlık : Golden, Starking, Granny Smith
3. Negatif kontrol : Her çeşit için 2 bitki
4. Deneme başlangıcı : 02 Nisan 2007
5. Sulama : Otomasyonlu spagetti damla sulama sistemi
6. Gübreleme : Damla sulama sistemi yoluyla (Fertigasyon)
5. Hastalık bulaştırma tarihi : 05 Haziran 2007
6. Deneme değerlendirme tarihi: 28 Aralık 2008
7. Deneme süresi : 2 vejetasyon yılı

Çeşit reaksiyon denemesine ait kroki Çizelge 3.6'da ve bu denemeye ait screen houston alınmış bir görüntü ise Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çeşit reaksiyon deneme planı.

Karakter	No	DENEMEYE ALINAN ÇEŞİTLER							
		1. Jersey Mac	2. Golden	3. Summer Red	4. Granny Smith	5. Fuji	6. Starking	7. Vista Bella	8. Galaxy Gala
ASGV	1								
	2								
ASPV	3								
	4								
Negatif Kontrol	5								
	6								
ASGV	7								
	8								
ASPV	9					ö			
	10								

ö= Deneme süresince yalnızca Fuji çeşidine ait 9 nolu bitki ölmüştür.



Şekil 3.3. Çeşit reaksiyon denemesinden bir görünüm.

Deneme kurulduktan sonra 5 Haziran 2007 tarihinde inokulasyon amaçlı aşılama yapılmış ve aşılamanın tutup tutmadığı 2. 3. ve 4. haftalarda gözle kontrol edilmiştir. Denemeden sağlıklı sonuçlar alınması için bitkilere iki vejetasyon yılı boyunca eşit bakım ve besleme yapılmıştır.

Çeşit reaksiyon denemesi çalışmasında kullanılan metot daha önce şarka (plum pox virus) için Audergon ve Morvan (1990) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde göre ASPV (P2) ve ASGV (G2) izolatlarının kaynağından alınan sürgünlerden aşı gözü alınarak denemedeki çeşitlere T göz aşısı yöntemi ile aşılanmıştır. Ayrıca enfeksiyonun kesin olarak sağlanması amacıyla iki adet kabuk aşısı da yapılmıştır. Bu aşılamanın başarılı olup olmadığının anlaşılması amacıyla ilk vejetasyon yılının sonunda bu bitkilerden örnek alınmış ve ELISA testi yapılmıştır.

Çeşit reaksiyon denemesindeki elma bitkilerinin hastalık etmenlerine karşı gösterdikleri tepkinin değerlendirilmesi amacıyla sekiz farklı karakter belirlenmiştir.

Bu karakterlerin altısı morfolojik (1-Gövde çapı, 2-Ağaç boyu, 3-Dal sayısı, 4-Toplam dal uzunluğu, 5-Ortalama Dal uzunluğu, 6-Ortalama Dal açısı), diğer ikisi ise fiziksel karakterdir (1-Yaprak kuru ağırlığı, 2-Odun dokusu kuru ağırlığı). Bu karakterlerin ölçülmesinde cetvel, metre, gönye, dijital kumpas ve hassas terazi kullanılmıştır. Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar destekli istatistik programında varyans analizi ve Duncan testi yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.12.2. Gövde Çapının ve Ağaç Boyunun Belirlenmesi

Denemede yer alan bitkilerde anaç ile kalemin birleştiği aşı yerinin 2-3 cm üzerinden deneme sonunda dijital kumpas ile gövde çapı ölçülmüştür. Ağaç boyu ölçümleri ise toprak seviyesinden en üst dal ucuna kadar metre ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar negatif kontroldeki bitkilerin ortalamalarıyla kıyaslanmıştır (Maxim ve ark. 2004).

3.2.12.3. Dal sayılarının ve Dal Uzunluklarının Belirlenmesi

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin dal sayıları hesaplanırken ana gövde üzerinden çıkan birincil dallar dikkate alınmıştır. Gövde üzerinden çıkan topuzlar ve diğer meyve dalları dal olarak sayılmamıştır. Bu çalışmada da değerlendirme her çeşit için denemede yer alan iki adet negatif kontrol bitkisinin ortalamasına göre yapılmıştır (Jones, 1980).

3.2.12.4. Dal Açılarının Ölçülmesi

Dal açılarının ölçülmesi amacıyla her bitkide dört yönde en gelişmiş dal seçilerek toplam dört dal üzerinden dal açısı hesabı yapılmıştır. Çalışmada gönye kullanılmış ve dalın gövdeyle yaptığı iç açının ölçümü yapılmıştır. Ortalama dal açısı o bitkide açısı ölçülen dört dalın aritmetik ortalamasının alınmasıyla hesap edilmiştir (Ahman, 1995).

3.2.12.5. Yaprak Dokusu Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin farklı yönlerdeki dallarından değişik dönemdeki yapraklar alınarak karıştırılmış ve böylece her bir bitki için bir örnek elde edilmiştir. Bu yapraklar toz ve kaba kirlerinden arındırılacak şekilde silinmiş ve temiz bir makasla 1 cm genişliğinde olacak şekilde kesilmiştir. Kesilen yapraklar hassas terazide 10 gr olarak tartılmış olup gazete kâğıdı üzerinde yayılacak şekilde serilerek numaralandırılmış ve 70⁰C kuru yakılmak üzere etüve konulmuştur. Son ağırlık tartısının belirlenmesi amacıyla 24 saat sonra tesadüfen seçilen örneklerden tartım yapılmış ve bu tartım beşer saat aralıklarla tekrar edilmiş olup 39 saatin sonunda örneklerin en son ağırlıklarına ulaştığı ve daha fazla ağırlık kaybetmedikleri tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra etüvden alınan örnekler tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Walsh ve Beaton, 1973). Elde edilen yaprak kuru ağırlıkları üzerinden istatistik analizleri yapılmıştır.

3.2.12.6. Odun Dokusu Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

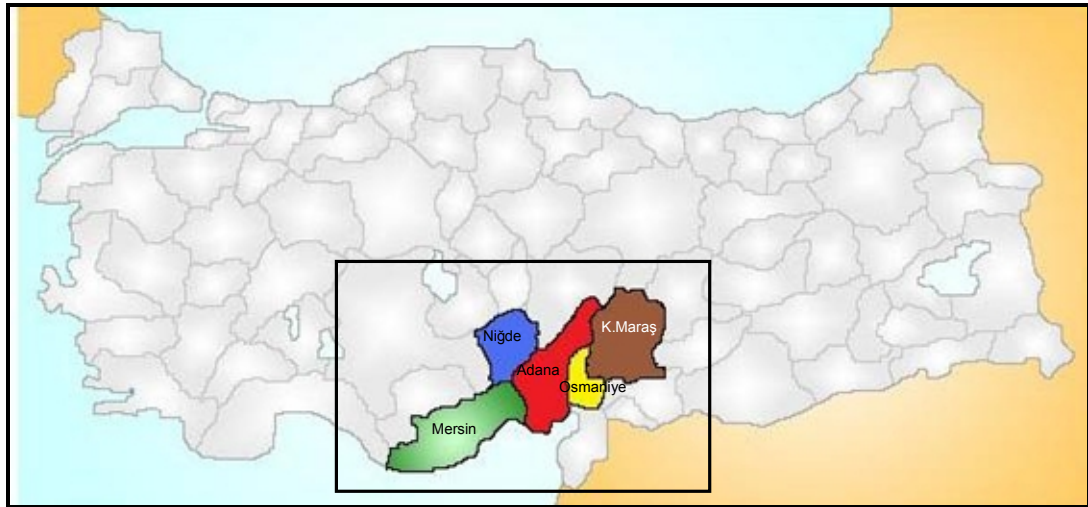
Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerden diğer bütün gözlemler ve analizler yapıldıktan sonra her bitkideki dallar kesilerek alınmış ve yaş ağırlık farkı oluşmaması için örnekler plastik torbalar içinde en kısa sürede laboratuara getirilmiştir. Dallar üzerindeki kabuk dokusu bıçakla sıyrılarak uzaklaştırılmış ve geriye kalan odun dokusu çift uçlu meyve kesme makaslarıyla 2–3 mm kalınlığında kesilmiştir. Kesilen bu odun dokuları hassas terazide petri kapları kullanılarak 10 gr olacak şekilde tartılmış ve kurutma kağıtlarından kesilerek elde edilen örnek torbacıklarına konularak 70⁰C'de kuru yakılmak üzere etüve yerleştirilmiştir. Son ağırlık tartısının belirlenmesi amacıyla 24 saat sonra tesadüfen seçilen örneklerden tartım yapılmış ve bu tartım beşer saat aralıkla tekrar edilmiş olup 44 saatin sonunda örneklerin en son ağırlıklarına ulaştığı ve daha fazla ağırlık kaybetmedikleri tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra etüvden alınan örnekler tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Walsh ve Beaton, 1973). Elde edilen odun dokusu kuru ağırlıkları üzerinden istatistik analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma Şekil 4.1’de görülen Adana, Mersin, Niğde, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerini kapsayan bölgede 2006-2009 yılları arasında yürütülmüştür. Niğde, Kahramanmaraş ve Mersin önemli Y.Ç.M yetiştiricisi illerdir, bununla birlikte Adana ve Mersin ise Y.Ç.M üretiminin yanında bu hastalıkların konukçusu olan turunçgil ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin önemli olduğu illerdir.

4.1. ASPV ve ASGV Virüs Hastalıklarının Saptanmasına Yönelik Sürvey ve Teşhis Çalışmaları**4.1.1. Sürvey Çalışmaları**

Sürvey çalışmaları 2006, 2007 ve 2008 yıllarında İlkbahar ve Sonbahar olmak üzere iki dönemde yapılmıştır. Yapılan üç yıllık sürvey çalışmaları neticesinde Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Niğde ve Osmaniye olmak üzere toplam 5 ilin, elma, armut ve ayva alanlarından örnekler alınmıştır. Örnekleme 5 dekadardan küçük bahçelerde üç, 5–10 dekar olan bahçelerden dört ve 10 dekadardan büyük bahçelerde ise altı ila oniki örnek alınmıştır. Ayrıca 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkilerine ait adaptasyon parselinde yapılan örnekleme çalışmalarında çeşitlerin fazla olmasından dolayı 10 dekadardan oluşan ve 1 bahçe olarak kabul edilen bu alandan toplam 49 örnek alınmıştır.



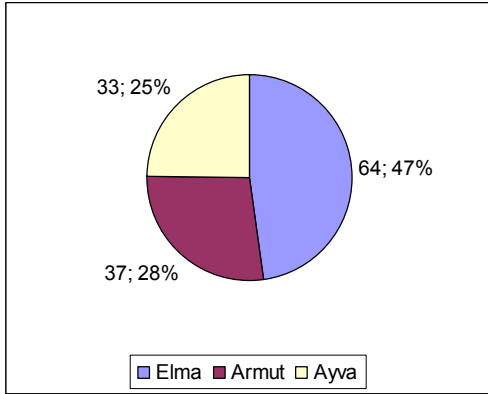
Şekil 4.1. Sürvey çalışmalarının yürütüldüğü iller.

Toplam üç yıllık sűrvey çalıřmalarında izelge 4.1’de gűrűldűgű űzere 2006 yılında 7 bahçeden 77 örnek, 2007 yılında 50 bahçeden 243 örnek ve 2008 yılında 77 bahçeden 299 olmak űzere toplam 134 bahçeden 619 örnek alınmıřtır. Bu rnek sayılarına aynı ađaçlardan yapılan ikincil örneklemeler dahil edilmemiřtir.

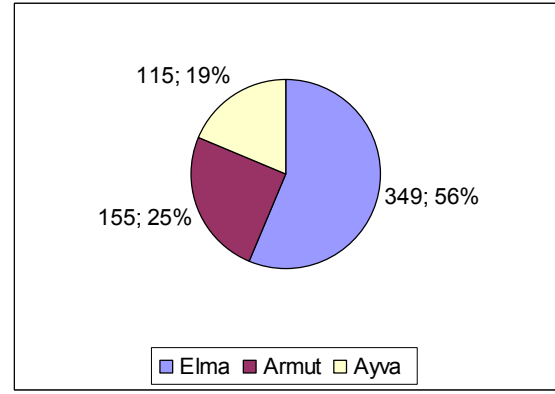
Çizelge 4.1. Sűrvey çalıřmalarında örneklenen iller, tűrler ve alınan örneklerin yıllara göre dađılımı.

İl	Tűr	2006		2007		2008		Toplam	
		Bahçe	rnek	Bahçe	rnek	Bahçe	rnek	Bahçe	rnek
Adana	Elma	3	61	3	39	7	34	13	134
	Armut	1	6	2	12	10	36	13	54
	Ayva	1	3	1	3	3	9	5	15
Mersin	Elma	1	4	1	6	7	27	9	37
	Armut	1	3	1	6	5	21	7	30
	Ayva	-	-	1	3	3	9	4	12
Osmaniye	Elma	-	-	2	12	5	18	7	30
	Armut	-	-	1	6	2	6	3	12
	Ayva	-	-	1	3	2	6	3	9
Niğe	Elma	-	-	7	30	5	21	12	51
	Armut	-	-	3	15	3	12	6	27
	Ayva	-	-	2	6	2	6	4	12
K. maraş	Elma	-	-	16	67	7	30	23	97
	Armut	-	-	4	16	4	16	8	32
	Ayva	-	-	5	19	12	48	17	67
Toplam		7	77	50	243	77	299	134	619

Sűrvey çalışmalarında örneklenen bahçelerin ve alınan örneklerin yumuşak çekirdekli meyve tűrleri bazında oranları Őekil 4.2 ve Őekil 4.3’te verilmiştir. Őekiller incelendiğinde; elma 64 (%47) bahçe ve 349 (%56) rnek sayısı ile en çok örnek alınan tűr olduğu grűlmektedir. Armut 37 (%28) bahçeden alınan 155 (%25) rnek ile ikinci sırayı alırken, ayva ise 33 bahçe (%25) toplam 115 (%19) rnek ile son sırada yer almıştır. İllerden alınan örnek sayısı o ilde bulunan ađaç sayısına orantılı olarak alınmıştır.

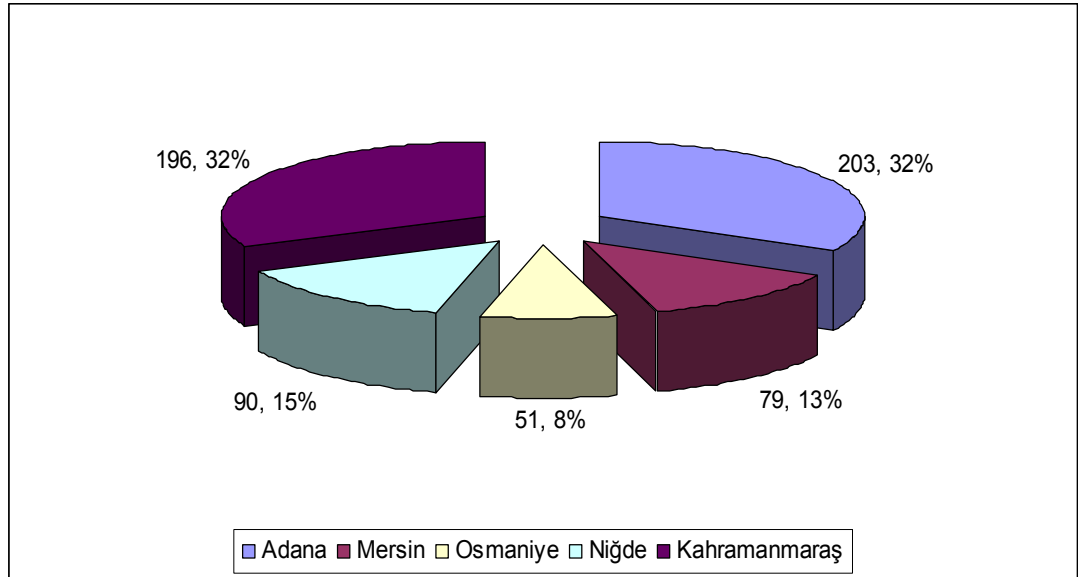


Şekil 4.2. Sürvey çalışmalarında örneklenen bahçelerin meyve türlerine göre % dağılımı.



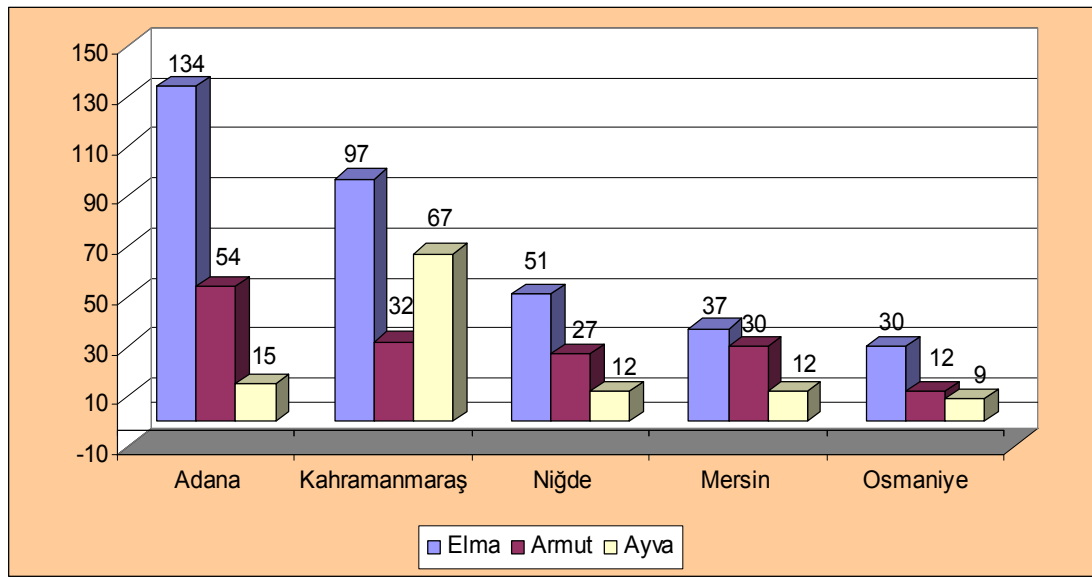
Şekil 4.3. Sürvey çalışmalarında alınan örnek sayısının meyve türlerine göre % dağılımı.

Çalışmada toplanan bütün örneklerin illere göre oranına bakıldığında Şekil 4.4'te görüldüğü gibi Adana 203 (%32) örnek ile ilk sırada yer alırken, Kahramanmaraş 196 (%32) örnekle ikinci, Niğde 90 (%15) örnekle üçüncü, Mersin 79 (%13) örnekle dördüncü ve Osmaniye 51 (%8) örnekle beşinci sırada yer almıştır.



Şekil 4.4. Sürvey kapsamında alınan örneklerin illere göre sayıları ve %'de dağılım oranları.

İllerden alınan örneklerin türlere göre oranına bakıldığında tüm illerde elma ilk sırada yer alırken, armut Kahramanmaraş hariç ikinci sırada, ayva ise son sırada yer almıştır. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere Kahramanmaraş'ta ikinci sırayı 67 örnekle ayva alırken, armut 32 örnekle son sıradadır. Bu durum; Kahramanmaraş'ta ayva alanlarında ASPV'nin varlığının tespit edilmesinden sonra hastalık belirtilerinin ASPV veya diğer virüs hastalıklarıyla ilişkisinin araştırılması amacıyla daha çok sayıda ayva örneği alınması nedeniyle oluşmuştur.



Şekil 4.5. Sürvey çalışmaları esnasında alınan örneklerin türlere ve illere göre dağılımı

4.1.2 Teşhis Çalışmaları

Sürvey çalışmalarında alınan örneklerin yumuşak çekirdekli meyve türlerine göre dağılımı ve tespit edilen ASPV, ASGV ve ASPV+ASGV ile enfekteli bitki sayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre alınan toplam 619 örneğin 114 tanesi virüs ile enfekteli bulunmuş olup, ortalama enfeksiyon oranı % 18,41'dir. Analizler sonucunda 64 örneğin ASPV ile enfekteli olduğu, bu rakamın bütün örnekler oranının ise % 10,34 olduğu belirlenmiştir. Toplam 34 örnekte ASGV bulunmuş ve bütün örnekler göre bu etmenin bulunma oranı % 5,49 olarak belirlenmiştir. Toplanan örneklerdeki ASPV+ASGV karışık enfeksiyon oranı ise 16 örnekle % 2,58 olarak hesaplanmıştır. Kahramanmaraş hariç diğer bütün ayva

alanları temiz çıkarken en enfekteli alan %38,8 ile Adana ili armut alanları olmuştur .

Çizelge 4.2. Sürveylerde alınan örneklerin illere ve türlere göre ELISA sonuçları.

İl	Tür	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV +ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% enfeksiyon
Adana	Elma	134	14	9	3	26	19,40
	Armut	54	11	6	4	21	38,88
	Ayva	15	-	-	-	-	-
Mersin	Elma	37	2	4	1	7	18,90
	Armut	30	2	-	-	2	6,66
	Ayva	12	-	-	-	-	-
Osmaniye	Elma	30	3	1	1	5	16,66
	Armut	12	2	-	-	2	16,66
	Ayva	9	-	-	-	-	-
Niğde	Elma	51	6	5	4	15	29,41
	Armut	27	-	-	-	-	-
	Ayva	12	-	-	-	-	-
K. maraş	Elma	97	5	6	-	11	11,34
	Armut	32	5	-	-	5	15,62
	Ayva	67	14	3	3	20	29,85
Toplam		619	64	34	16	114	18,41
% enfeksiyon			10,34	5,49	2,58	18,41	

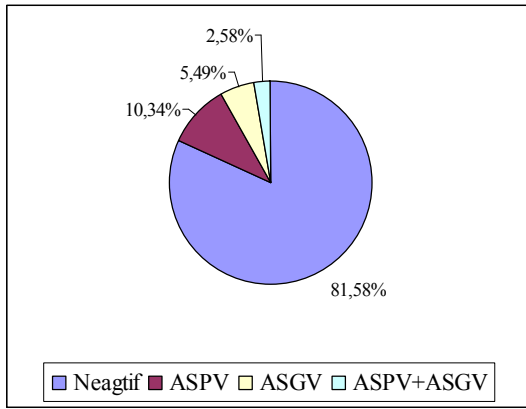
Sürvey çalışmalarında elde edilen örneklerle yapılan DAS-ELISA çalışmaları türler bazında değerlendirildiğinde; her üç türdeki enfeksiyon oranlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Çizelge 4.3'ten de anlaşılacağı üzere %19,35 toplam enfeksiyon oranı ile Armut birinci sırada yer alırken ikinci sırada %18,33 ile elma, ve % 17,39 enfeksiyon oranı ile ayva son sırada yer almıştır.

Çizelge 4.3. Sürvey çalışmaları ve ELISA sonuçlarının türlere göre dağılımı.

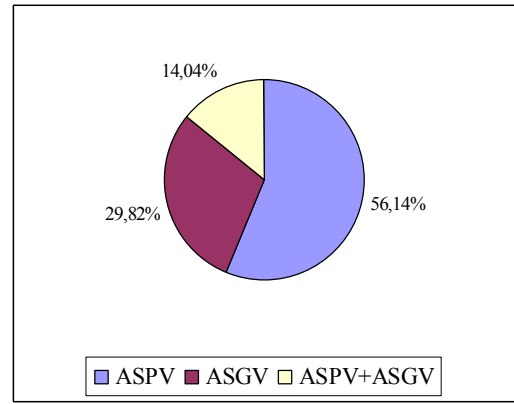
Tür	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV +ASGV	Toplam	% enfeksiyon
Elma	64	349	30	25	9	64	18,33
Armut	37	155	20	6	4	30	19,35
Ayva	33	115	14	3	3	20	17,39
Toplam	134	619	64	34	16	114	18,41
% Bulunma			10,34	5,49	2,58	18,41	

Yapılan teşhis çalışmaları sonucunda toplam 114 örnek en az bir hastalıkla enfekteli bulunurken 505 örnek ASPV ve ASGV açısından temiz bulunmuştur. Tüm

örnekler üzerinden enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde ASPV %10,34; ASGV %5,49 ve karışık enfeksiyon oranı ise %2,58 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Enfekteli bulunan 114 örnek içinde ASPV 64 örnekle birinci sırada yer almış olup, ASPV'nin bütün enfekteli örnekler içindeki bulunma oranı Şekil 4.7'de görüleceği üzere %56,14'dır. ASGV ise 34 örnekle enfekteli örneklerin %29,82'ini oluşturmuştur. Ayrıca ASPV+ASGV enfekteli örneklerin oranı 16 örnek ile %14,04 olarak belirlenmiştir.

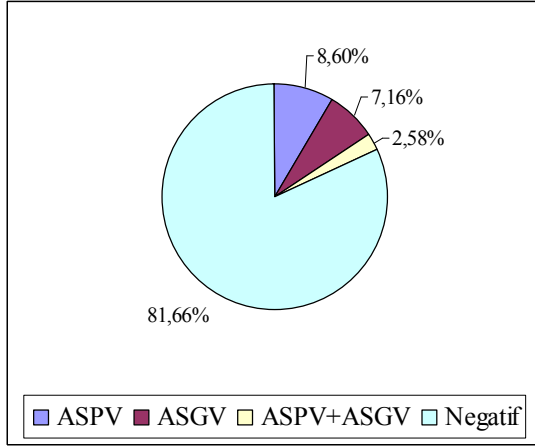


Şekil 4.6. Bütün örneklerdeki ELISA sonuçlarının dağılımı.

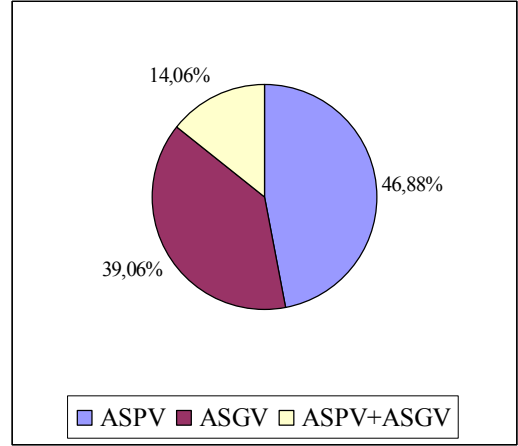


Şekil 4.7. Enfekteli örneklerdeki ASPV, ASGV ve ASPV+ASGV oranları.

Sürvey çalışmaları türler bazında değerlendirildiğinde 5 ildeki 64 bahçeden alınan 349 elma örneğinde yapılan DAS-ELISA testleri sonucunda 64 örnek enfekteli bulunmuştur. Bu çalışmalarda elma örneklerinin 30 tanesinde ASPV, 25 tanesinde ASGV ve 9 adet elma örneğinde de ASPV+ASGV karışık enfeksiyon tespit edilmiştir. Bu elma örneklerindeki enfeksiyon oranları Şekil 4.8'de verilmiştir. Sonuç olarak elma örneklerinde sırasıyla %8,60 ASPV, %7,16 ASGV ve % 2,58 karışık enfeksiyon tespit edilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere toplam 64 adet enfekteli elma örneğinin %46,88'i ASPV ile enfekteli bulunurken, %39,06'u ASGV ve %14,06'sı ise karışık enfeksiyon ile enfekteli olarak bulunmuştur.

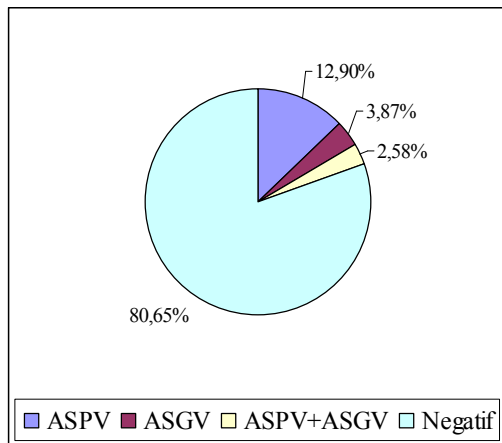


Şekil 4.8. ELMA örneklerindeki ELISA sonuçlarının dağılımı.

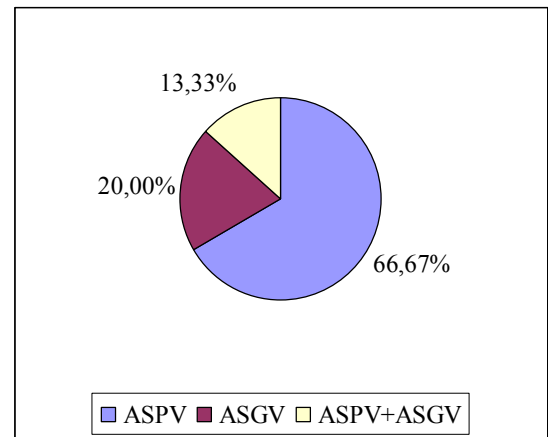


Şekil 4.9. Enfekteli ELMA örneklerindeki ASPV, ASGV ve ASPV+ASGV oranları.

Çalışma süresince 5 ilden toplam 155 armut örneği alınmış ve bu örneklerin 30 tanesi enfekteli bulunmuştur (Şekil 4.10). Bu armut örneklerinden 20'si ASPV, 6'si ASGV ve 4 bitki ise karışık enfeksiyonla enfekteli bulunmuştur. Bütün armut örnekleri üzerinde enfeksiyon oranları ise %12,90 ASPV, %3,87 ASGV ve %2,58 karışık enfeksiyon şeklinde belirlenmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi hastalıklı örneklerin %66,67 ASPV ile enfekteli bulunurken %20'si ASGV ve %13,33'ü ise ASPV+ASGV karışık enfeksiyonu ile enfekteli bulunmuştur.

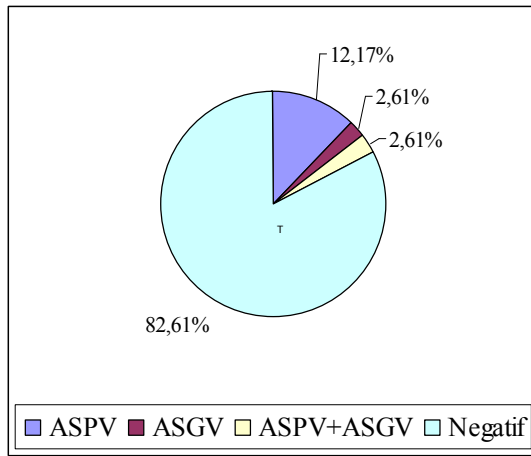


Şekil 4.10. ARMUT örneklerindeki ELISA sonuçlarının dağılımı.

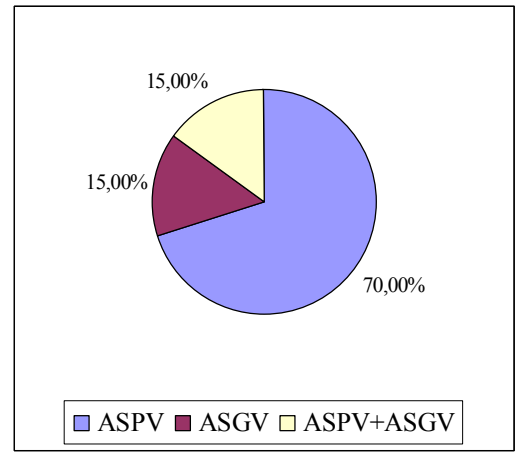


Şekil 4.11. Enfekteli ARMUT örneklerindeki ASPV, ASGV ve ASPV+ASGV oranları.

Ayva ile ilgili olarak srvey çalışmaları kapsamında toplam 115 örnek alınmıştır. DAS-ELISA alışmaları sonucunda ASPV 14, ASGV ve karışık enfeksiyon ise 3'er örnekte tespit edilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi yüzde enfeksiyon oranları ise sırasıyla %12,17 ASPV, % 2,61 ASGV ve ASPV+ASGV Şeklinde belirlenmiştir. Enfekteli bulunan 20 adet ayva rneği içerisinde Şekil 4.13'te görüldüğü üzere %70,00 ile ASPV en yaygın halde bulunurken, ASGV ve ASPV+ASGV ise %15,00 oranında eşit olarak belirlenmişlerdir.

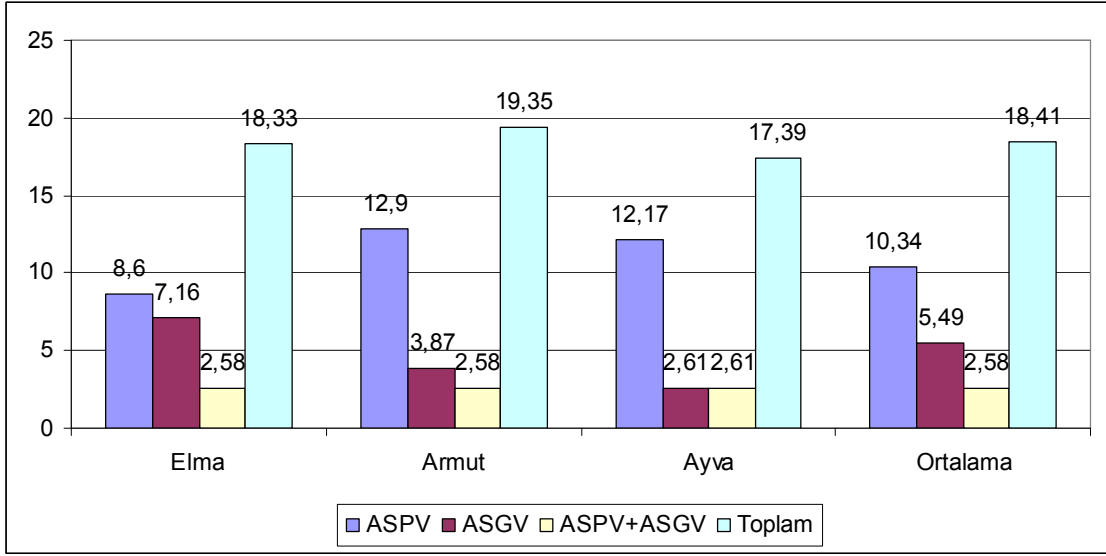


Şekil 4.12. AYVA rneklerindeki ELISA sonuçlarının dağılımı.



Şekil 4.13. Enfekteli AYVA rneklerindeki ASPV, ASGV ASPV+ASGV oranları.

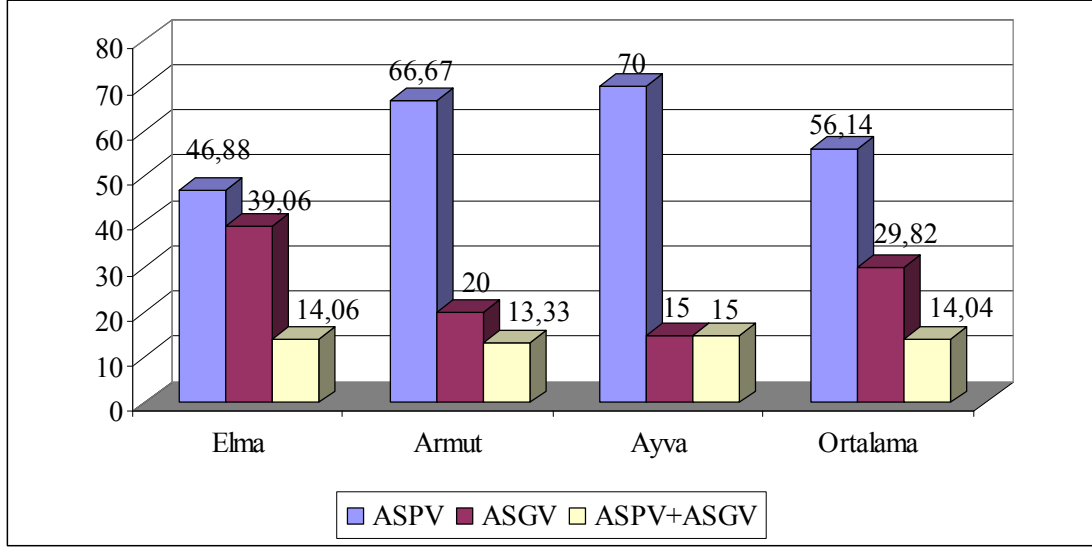
Yapılan teşhis çalışmaları sonucunda her üç yumuşak çekirdekli meyve türünde de ASGV ve ASPV'nin bulunduğu, enfeksiyon oranlarının türler arasında çok büyük fark göstermediği grlmştir. Hastalık etmenleri arasında ASPV'nin ASGV'ye oranla yaklaşık iki kat daha yaygın bulunduğu karışık enfeksiyon oranlarının ise türler arasında çok fark göstermediği belirlenmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi ASPV armutta (% 12,9), ASGV ise daha çok elmada (% 7,16) bulunmaktadır. Karışık enfeksiyon oranları ise her üç türde de bir birine yakın (% 2,58 elma, % 2,58 armut ve % 2, 61 ayva) ıkmıştır.



Şekil 4.14. ELISA sonuçlarına göre survey alanındaki yumuşak çekirdekli meyve türlerinin % enfeksiyon oranları ve genel ortalama.

ELISA sonuçlarına göre enfekteli bulunan 114 örnek içinde hastalık etmenlerinin dağılımı (Şekil 4.15) ASPV %56,14 ile ilk sırada, ASGV %29,82 ile ikinci sırada ve karışık enfeksiyon ise %14,04 ile son sırada yer almıştır. Yine Şekil 4.15'ten de anlaşılacağı üzere ayva'da %70 ile ASPV'nin tek başına bulunma durumu diğer türlere göre farklılık arz etmektedir. Elma'da ASGV %39,06 ile diğer türlere göre daha yaygın olarak bulunmakta iken bu türde ASPV birinci sırada olmasına rağmen %46,88 ile ayva ve armuttan daha düşük bir oranda görülmektedir. Her üç türdeki karışık enfeksiyon oranları birbirine oldukça yakın olarak %14 civarında bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre ASPV yumuşak çekirdekli meyvelerde ASGV'ye oranla daha baskın bir halde bulunduğu görülmüştür. Özellikle ASPV; ayvada ASGV'den yaklaşık dört kat, armutta ise ASGV'den üç kattan daha yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve virüs hastalıkları içerisinde ASPV'nin ASGV'den daha büyük bir tehdit olarak öne çıktığı söylenebilir.



Şekil 4.15. Türler bazında enfekteli örneklerdeki hastalık oranları.

Ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerde bu kapsamda bir survey çalışması bulunmamakla birlikte 2002-2005 yılları arasında Doğu Akdeniz Bölgesi elma alanlarında yapılan çalışmada ELISA sonuçlarına göre ortalama enfeksiyon %18,88 ve ASGV %5,08 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışmaya konu olan örneklerle yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarına göre ASGV %60,8 ASPV ise %54,5 olarak tespit edilmiş ve bu sonuçlar moleküler testlerle de doğrulanmıştır (Birişik ve ark. 2008).

Bu çalışmada ASGV %5,49 oranında bulunmuş olup bu oran Birişik ve ark. (2008) tarafından daha önce elma alanlarında bulunan ASGV oranına oldukça yakın olup sonuçlar benzerlik göstermiştir. Kore’de Park ve ark. (2006) tarafından yapılan ASGV ve ACLSV için ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada RT-PCR sonuçlarının genel olarak ELISA sonuçlarından iki kat daha fazla pozitif verdiği rapor edilmiştir. Biyolojik indeksleme sonuçlarının RT-PCR sonuçlarından daha yüksek oranda pozitif verdiği bilindiğinden bu çalışmada elde edilen sonuçlar diğer ülkelerde ve ülkemizde bu konuda yapılmış olan diğer çalışmalarla paralellik gösterdiği söylenebilir.

Ismaeil ve ark. (2006) tarafından Suriyede, elma, armut ve ayva alanlarında yapılan benzer bir çalışmada ELISA sonuçlarına göre ACLSV, ASPV ve ASGV için toplam enfeksiyon oranı % 34 olarak bulunmuş; fakat ASGV tek başına % 2 olarak

tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayva örneklerinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmemiştir. Alınan örnekler ile biyolojik indeksleme yapıldığında testlenen örneklerin % 80'i ASPV ve ASGV ile enfekteli bulunmuştur. Biyolojik indeksleme sonuçlarının yüksek çıkması, latent virüslerin gerçek yaygınlık oranlarının daha yüksek olduğunu ve ELISA testinin latent virüslerin teşhisinde diğer metotlar kadar hassas olmadığını göstermektedir.

Litvanya'da ülke çapında elma ve armut alanlarında yapılan sürvey çalışmasında DAS-ELISA sonuçlarına göre toplam enfeksiyon % 12 olarak bulunmuştur. Litvanyadaki bu çalışmada ASGV % 3,40 oranında bulunmuştur. Diğer bir sonuç ise armut alanlarında ASPV'nin % 9,8 oranında bulunması ve bu oranın ASGV'nin iki katı çıkmasıdır. Aynı örneklere RT-PCR uygulandığında ise ASPV %70, ASGV ise % 50 oranında tespit edilmiştir (Püpola ve ark. 2008). Litvanya'da yapılan çalışma sonucunda ASPV ve ASGV 'nin ELISA ile bulunma oranları bu tez çalışması sonuçları ile paralellik arz etmektedir. Aynı zamanda ASPV'nin yumuşak çekirdekli meyve çeşitlerinde ASGV'den daha yaygın olduğu sonucu her iki çalışmayla doğrulanmaktadır. Püpola ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada Mramonaja gibi yerli bir armut çeşidinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmezken, Avrupa'da oldukça yaygın olan Conferance armut çeşidinde ELISA sonuçlarına göre % 50 ASPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hastalık etmenlerinin daha çok enfekteli üretim materyali ile yayıldığını göstermektedir. Lolic ve ark. (2007) tarafından Bosna Hersek'te elma ve armut alanlarında yapılan çalışmada RT-PCR analiz sonuçlarına göre ASPV ve ASGV'nin % 69 oranında bir yaygınlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak elma ve armutta yumuşak çekirdekli virüs etmenleri yakın oranda bulunsa da genel olarak armutlarda ASPV enfeksiyon oranı daha yüksek çıkmaktadır. HuaiQiong ve RuXi, (1996), Çin'in Sichuan bölgesi armut alanlarında yaptıkları çalışmada ASPV % 61,5 oranında, ASGV'nin ise % 43,2 oranında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Nedeni tam olarak açıklanamamakla beraber genellikle Y.Ç.M.'de ASPV ASGV'ye oranla daha yaygın olarak görülmektedir. Bu çalışmada ortaya çıkan verilere göre ASPV tek başına %56,1 olarak bulunurken ASGV % 29,8, ve her ikisinin karışık enfeksiyon oranı ise %14 olarak bulunmuştur (Şekil 4.15).

Çağlayan ve ark. (2006) elma alanlarında yaptıkları çalışmada alınan 174 örnekte ELISA testi ile ASGV enfeksiyon oranının % 12,06 olduğunu, aynı örneklerle yapılan RT-PCR çalışmalarında ise ASGV oranının % 28,16 olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir. RT-PCR test sonuçlarına göre enfeksiyon oranlarının yüksek bulunması bu metodun daha hassas olmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin Kundu, (2003), Çek cumhuriyetinde elma alanlarında yaptığı çalışma sonucunda RT-PCR analiz sonuçlarına göre ASPV'yi % 27,86, ASGV'yi % 44 karışık enfeksiyon oranını ise % 16,7 olarak rapor etmiştir.

Ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve virüsleri konusunda yapılan çalışmalar daha çok elma ile ilgilidir. Bu çalışmayla armut ve ayva türlerinde ilk kez planlı bir sürvey çalışması yapılmıştır. Dolayısıyla bu türlerde ASPV ve ASGV ile ilgili veriler ülkemiz için yenidir.

4.1.3. Sürvey ve Teşhis Çalışmalarının İller Bazındaki Sonuçları

Adana ilinde yapılan sürvey çalışmalarında Çizelge 4.4'te gösterildiği üzere 6 ilçede 31 bahçe ziyaret edilmiş ve toplam 203 örnek alınmıştır. Örneklemelemlerde 134 (% 66,00) örnekle elma ilk sırada yer alırken, armut 54 (% 26,60) örnekle ikinci sırada, ayva ise 15 (% 7,38) örnekle son sırada yer almıştır. Adana ili Sarıçam ilçesinde yer alan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği ile Bahçe Bitkileri Bölümüne ait deneme parselinde çeşitlerin farklı olmasından dolayı fazla sayıda örnek alınmıştır.

Adana ilinde alınan örneklerin 47 tanesi enfekteli bulunmuş, enfeksiyon oranı % 23,15 olarak hesaplanmış ve ASPV 25, ASGV 15 ve ASPV+ASGV ise 7 örnekte tespit edilmiştir. Bu sayılara göre hastalık etmenlerinin bulunma oranları Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi sırasıyla % 12,31, % 7,38 ve % 3,44 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar tüm sürvey alanındaki örneklerin enfeksiyon oranından daha yüksektir. Çizelge 4.4'de Saimbeyli ilçesinden alınan örneklerin hiçbirinde enfeksiyon tespit edilmediği, ayrıca Adana ilinden alınan tüm ayva örneklerinin negatif sonuç verdiği görülecektir. Sonuç olarak Adana'da enfeksiyon oranlarının bahçeler bazında farklı olsada bazı bahçelerde % 91,66 oranında enfekteli tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. ADANA iline ait sürvey ve ELISA sonuçları.

İlçeler	Türler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV +ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% enfeksiyon
Sarıçam	Elma	2	76	7	4	2	13	17,10
Karaisalı	Elma	3	15	-	-	-	-	-
	Armut	3	12	4	2	2	8	66,66
Yüreğir	Elma	2	16	3	3	1	7	43,75
	Armut	2	12	5	4	2	11	91,66
	Ayva	1	3	-	-	-	-	-
Ceyhan	Elma	1	6	1	-	-	1	16,66
Pozantı	Elma	4	18	3	2	-	5	27,77
	Armut	6	24	2	-	-	2	8,33
	Ayva	4	12	-	-	-	-	-
Saimbeyli	Elma	1	3	-	-	-	-	-
	Armut	2	6	-	-	-	-	-
Toplam		31	203	25	15	7	47	23,15
% Bulunma				12,31	7,38	3,44	23,15	

Örnek sayısı bakımından Adana ilinden sonra 196 örnek ile Kahramanmaraş ili ikinci sırada yer almaktadır. Kahramanmaraş ilinde Çizelge 4.5'ten anlaşılacağı gibi Merkez ve Göksun ilçelerinden toplam 48 bahçeden 97 elma, 67 ayva ve 32 armut örneği alınmıştır. Alınan örneklerin oranı sırasıyla elma % 49,48, ayva %34,18 ve armut %16,32 şeklinde gerçekleşmiştir. Kahramanmaraş'ta elma ve armut dışında ayrıca ayva örneklerinde de enfeksiyon tespit edilmiş olup bu nedenle Kahramanmaraş'taki ayva örnek sayısı artırılmıştır. Kahramanmaraş'ta ASPV %12,24 ile sürvey ortalamasının üstünde, ASGV %4,59, ASPV+ASGV %1,53 ile sürvey ortalamasının altında kalırken ortalama enfeksiyon oranı ise %18,36 ile toplam sürvey ortalamasına oldukça yakın bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. KAHRAMANMARAŞ iline ait sürvey ve ELISA sonuçları.

İlçeler	Türler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV + ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% enfeksiyon
Merkez	Elma	5	27	2	2	-	4	14,81
	Armut	2	9	-	-	-	-	-
	Ayva	15	61	13	3	3	19	31,14
Göksun	Elma	18	70	3	4	-	7	10,00
	Armut	6	23	5	-	-	5	21,73
	Ayva	2	6	1	-	-	1	16,66
Toplam		48	196	24	9	3	36	18,36
% bulunma				12,24	4,59	1,53	18,36	

Niğde ilinde üç farklı ilçede bulunan 22 bahçeden 51 elma, 27 armut ve 12 ayva olmak üzere toplam 90 örnek alınmıştır. Bu örneklerin %56,66'sı elma, %30'u armut ve %13,33'ü ise ayvadır. Yapılan teşhis çalışması sonucunda ASPV %6,66, ASGV 5,55 ve ASPV+ASGV %4,44 oranında bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bütün örneklerin ortalama enfeksiyon oranı ise % 16,66 ile sürvey ortalamasından daha düşük oranda bulunmuştur. Niğde ilinden alınan elma örneklerinin 15'i çöğür üzerine aşı Amasya elmasıdır. Yapılan teşhis çalışmalarında alınan Amasya çeşidi elma örneklerinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilememiştir. Niğde ilinde ASGV ve karışık enfeksiyon oranları sürvey ortalamasına yakın iken özellikle ASPV sürvey ortalamasının altında tespit edilmiştir. Niğde ilinden alınan armut ve ayva örneklerinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. NİĞDE iline ait sürvey ve ELISA sonuçları.

İlçeler	Türler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV+ ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% Enfeksiyon
Merkez	Elma	2	12	1	-	1	2	16,66
Bor	Elma	4	18	3	2	2	7	38,88
	Armut	2	12	-	-	-	-	-
	Ayva	2	6	-	-	-	-	-
Çamardı	Elma	6	21	2	3	1	6	28,57
	Armut	4	15	-	-	-	-	-
	Ayva	2	6	-	-	-	-	-
Toplam		22	90	6	5	4	15	16,66
% bulunma				6,66	5,55	4,44	16,66	

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi Mersin merkez ve Çamlıyayla ilçelerinden 37 elma, 30 armut ve 12 ayva olmak üzere toplam 79 örnek alınmıştır. Alınan örneklerin oranı sırasıyla % 46,83 elma, % 37,97 armut ve %15,18 ayva gelmektedir. Yapılan teşhis çalışmaları sonucunda Mersin ili örnekleri %5,06 ASPV ve ASGV ile enfekteli bulunurken, karışık enfeksiyon oranı % 1,26 olarak belirlenmiştir. Mersin'den alınan bu 79 örneğin ortalama enfeksiyon oranı % 11,39 ile sürvey ortalamasının en düşük sonucu olarak çıkmış, ayva örneklerinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmezken yalnızca bir elma örneğinde karışık enfeksiyon bulunmuştur.

Çizelge 4.7. MERSİN iline ait sörvey ve ELISA sonuçları.

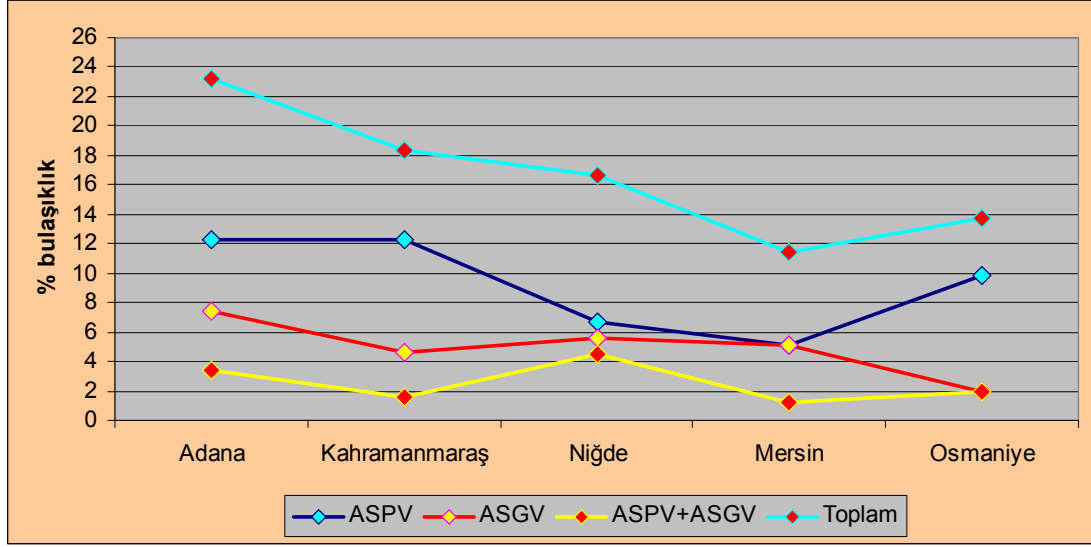
İlçeler	Türler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV+ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% enfeksiyon
Merkez	Elma	2	12	-	2	-	2	16,66
	Armut	2	12	-	-	-	-	-
Çamlıyayla	Elma	7	25	2	2	1	5	20,00
	Armut	5	18	2	-	-	2	11,11
	Ayva	4	12	-	-	-	-	-
Toplam		20	79	4	4	1	9	11,39
% bulunma				5,06	5,06	1,26	11,39	

Proje kapsamındaki sörvey çalışmalarında en az örnek Osmaniye ilinden alınmıştır. Çizelge 4.8’de belirtildiği gibi Osmaniye Merkez, Bahçe ve Hasanbeyli ilçelerinden 30 elma, 12 armut ve 9 ayva olmak üzere toplam 51 örnek alınmıştır. Alınan örneklerin oranı sırasıyla %58,88 elma, %23,52 armut ve %17,64 ayva şeklindedir. Yapılan teşhis çalışmaları neticesinde Çizelge 4.8’de gösterildiği gibi ASPV %9,80, ASGV ve ASPV+ASGV %1,96, toplam enfeksiyon oranı da %13,72 ile sörvey ortalamasının altında bulunmuştur. Osmaniye ilinden alınan ayva örneklerinde herhangi bir enfeksiyon tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.8. OSMANİYE iline ait sörvey ve ELISA sonuçları.

İlçeler	Türler	Bahçe sayısı	Örnek sayısı	ASPV	ASGV	ASPV+ASGV	Enfekteli örnek sayısı	% enfeksiyon
Merkez	Elma	1	5	-	-	-	-	-
Bahçe	Elma	4	15	3	-	1	4	26,66
	Armut	2	9	2	-	-	2	22,22
	Ayva	1	3	-	-	-	-	-
Hasanbeyli	Elma	2	10	-	1	-	1	10,00
	Armut	1	3	-	-	-	-	-
	Ayva	2	6	-	-	-	-	-
Toplam		13	51	5	1	1	7	13,72
% bulunma				9,80	1,96	1,96	13,72	

Tüm çalışma boyunca illerden alınan örnekler ve yapılan ELISA test sonuçlarına göre elde edilen verilerin grafik olarak ifadesi Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. İller bazında ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.

Yapılan test çalışmalarının sonuçları iller bazında değerlendirildiğinde bazı örnekleme alanlarında hiçbir enfekteli örneğe rastlanmazken bazı bahçelerde çok yüksek enfeksiyon oranları belirlenmiştir. Bu durumun hastalık etmenleriyle bulaşmanın büyük çoğunlukla fidan üretim aşamasında ASPV ve ASGV ile enfekteli anaç veya kalemlerin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Temiz üretim materyali ile kurulan bahçelerde sonradan meydana gelen enfeksiyon oldukça azdır, buna karşın fidanlık aşamasında özellikle klon anaçlarda başlangıç materyali enfekteli ise bahçede yüksek oranda bir enfeksiyon saptanmıştır. Benzer bir durum Kundu (2003) tarafından yapılan çalışmada Çek Cumhuriyeti elma üretim alanlarında da tespit edilmiştir. Bu çalışmada da bazı bahçelerde herhangi bir enfeksiyon saptanmazken enfekteli bahçeler kendi içinde değerlendirildiğinde enfeksiyon oranları oldukça yüksek çıkmıştır.

4.2 ELISA Testinin Optimizasyonu Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.2.1. Farklı DAS-ELISA Metotlarının Karşılaştırılması

Farklı DAS-ELISA metotlarının karşılaştırılması çalışmalarına 2006 yılında başlanmış ve 2007 yılında devam edilmiştir. Bu çalışmayla ASPV hastalık etmeninin

teşhisinde kullanılan DAS-ELISA metodunun uygulama sıcaklıklarında ve sürelerinde yapılan bazı değişikliklerle en yüksek OD değeri elde edilerek rutin teşhislerde hangi yöntemin daha başarılı olduğunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla klasik DAS-ELISA, klasik metotta sıcaklık ve inkubasyon sürelerinin değiştirilmesiyle oluşturulmuş MODİFİYE, ile klasik DAS-ELISA testinin yükleme ve konjugate ilavesi aşamaları birleştirilerek oluşturulan Simultane DAS-ELISA ve firma önerisi dahil dört yöntem karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan bu yöntemlerin aşamaları ve bu aşamalardaki farklılar Çizgele 4.9’da verilmiştir.

Çizgele 4.9. ASPV’nin teşhisinde farklı ELISA yöntemlerinin kullanılması.

Uygulamalar	ELISA yöntemleri			
	Klasik DAS-ELISA	Modifiye DAS-ELISA	Simultane DAS-ELISA	Firma önerisi DAS-ELISA
Kaplama	37 °C / 4h	4°C / ON	37 °C / 4h	30 °C/5h
Yükleme	4 °C / ON	4 °C / ON	4 °C /ON+ Kon.	4 °C / ON
Konjugate	37°C / 2h	4 °C / ON	-	30 °C/5h
Substrate	RT/ 2h	4 °C / ON	RT/2h	4 °C / ON

Bu çalışmalarda makroskobik gözlemler ve karakterizasyon çalışmaları için takip edilen ve Çizgele 4.19’da verilen ağaçlardan alınan yaprak örnekleri kullanılmıştır. Deneme amacıyla değiştirilen zaman ve sıcaklık dışında kalan diğer bütün uygulamalar; kullanılan solüsyon miktarları (100 µl/ çukur), dilüsyon oranları (1/1000) ve yıkamalar (3 dk x 3) aynı şekilde kalmıştır. Çalışmalarda antiserum alınan firmanın (Bioreba) önerileri dikkate alınarak her denemede dört pozitif dört negatif örnek kullanılmış ve sonuçlar bu örneklerin ortalamaları alınarak hesap edilmiştir.

Çizgele 4.10. Farklı ELISA yöntemlerinin denenmesinde elde edilen OD değerleri.

Yöntemler	Karşılaştırma değerleri				
	Örnek Sayısı	Pozitif örnek sayısı	Negatif kontrol OD	Pozitif kontrol OD	Ortalama pozitif OD
Klasik DAS-ELISA	8	3	0,112	0,403	0,356
Simultane DAS-ELISA	8	3	0,124	0,413	0,372
Firma önerisi DAS-ELISA	8	4	0,118	0,435	0,402
Modifiye DAS-ELISA	8	4	0,119	0,469	0,411

Farklı DAS-ELISA metotlarının karşılaştırılması çalışmalarında Modifiye DAS-ELISA yönteminin klasik ve simultane DAS-ELISA yöntemlerinden daha yüksek sayıda örneği pozitif olarak saptayabildiği belirlenmiştir. Fakat modifiye DAS-ELISA yöntemi ile pozitif bulunan örnek sayısı, antiserum üreticisi firmanın önerileriyle yapılan test sonucunda bulunan pozitif örnek sayısı ile aynı olmuştur. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi modifiye DAS-ELISA metodunda elde edilen OD değerleri klasik, simultane ve firma önerisi ile yapılan DAS-ELISA'lara oranla daha yüksek gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre ASPV virüs hastalığının teşhisinde Modifiye edilmiş DAS-ELISA ile üretici firmanın önerdiği metot arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Her iki metot klasik ve simultane DAS-ELISA'dan daha başarılı bulunmuştur.

Carvo ve Barros (2001) ASGV'nin DAS-ELISA testlerindeki başarısının artırılması amacıyla antiserum sulandırma oranlarını değiştirerek ve farklı ekstraksiyon metotları kullanarak benzer bir çalışma yapmış ve bu uygulamaların sonucu etkilemediğini tespit etmişlerdir. Wu ve ark. (2001), ASGV teşhisinde ELISA metodunu geliştirmek amacıyla standart DAS-ELISA metodunu PAS-ELISA (Protein A Swebich-ELISA) yöntemiyle karşılaştırmış ve standart DAS-ELISA metodunun daha başarılı olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışma kapsamında ise karşılaştırmalar yalnızca DAS-ELISA metotları arasında gerçekleştirilmiş, farklı ekstraksiyon metotları çalışılmamıştır.

4.2.2. ASPV ve ASGV'nin ELISA İle Teşhisi İçin En Uygun Örnekleme Zamanının Tespiti

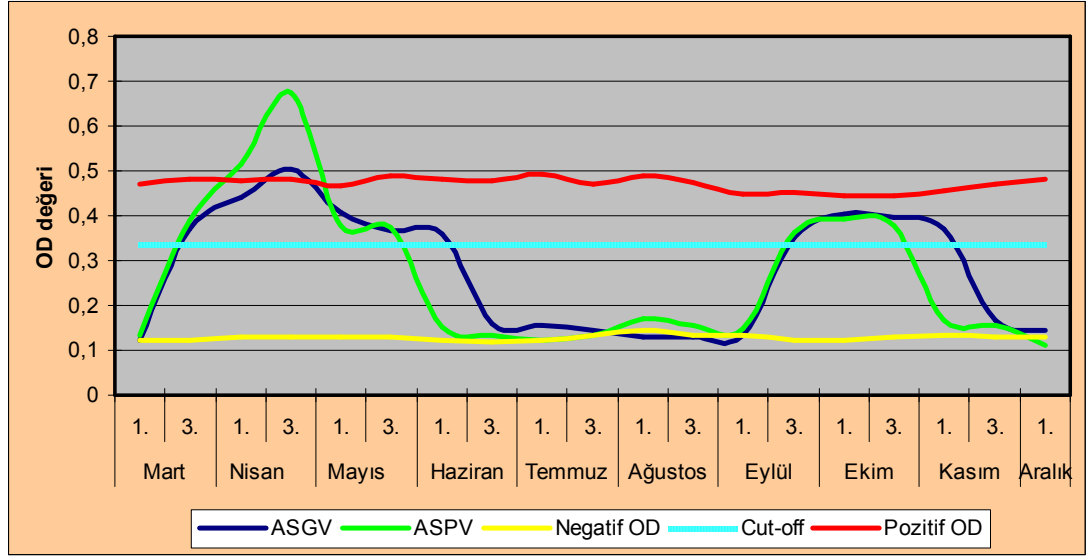
DAS-ELISA testi için en uygun örnekleme döneminin belirlenmesi amacıyla çalışmalar 2007 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2006 yılı sürvey çalışmaları esnasında ASPV ve ASGV ile enfekteli bulunan Anna çeşidi elma ağaçlarından alınan yaprak örnekleri kullanılmıştır. Her iki izolat da Adana ilinde bulunmakta olup izolatlardan P2 ASPV ile G2 ise ASGV ile enfektelidir (EK 3). Yaprak örnekleri Mart-Aralık aylarında ortalama 15 günlük periyotlarla alınmıştır. Örnekler aynı gün ELISA testine tabi tutulmuş ve yapılan DAS-ELISA çalışmalarının

sonuçlarının verildiği Çizelge 4.11'den de anlaşılacağı üzere her iki etmen de Mart ayının 2. yarısından sonra alınan örneklerde pozitif sonuç vermiştir. ASGV örnekleri haziran ayının ortalarına kadar pozitif sonuçlar verirken ASPV örnekleri aynı dönemde negatif bulunmuştur. Sonbahar örneklemelerinde daha düşük OD değeri elde edilmekle beraber ASGV Eylül sonu, Ekim ve Kasım aylarında pozitif sonuçlar vermiştir. Aynı dönemde ASPV ile enfekteli örnekler kasım ayında pozitif sonuç vermemiştir. Hem ASGV hem ASPV en yüksek OD değerini meyvelerin yaklaşık olarak 4-6 cm çapında olduğu Nisan ayı örneklerinde vermiştir. Bu ayda yapılan ELISA testlerinde ASGV en yüksek negatif OD değerinin yaklaşık 3 katı, ASPV ise yaklaşık 4 katı OD değeri vermiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere yıl içerisinde ASGV, ASPV'ye oranla daha uzun bir dönemde pozitif sonuçlar vermektedir. Fakat ASPV örneklerinin pozitif sonuç verdiği dönemlerde OD değerlerinin daha yüksek ölçülmesi ve daha kısa dönemde teşhis edilebilmesinden dolayı ASPV'nin çevre koşullarından ASGV'ye oranla daha çok etkilendiği kanaatine varılmıştır.

Çizelge 4.11. Farklı örnekleme zamanlarının tespiti amacıyla örnek alma tarihleri ve ELISA sonuçları.

Ay	Tarihi	ASGV ort. OD	ASPV ort.OD	Negatif ort. OD	Pozitif ort. OD	Sonuç ASGV	Sonuç ASPV
Mart	1. Hafta	0,123	0,134	0,124	0,471	-	-
	3. Hafta	0,370	0,388	0,123	0,482	+	+
Nisan	1. Hafta	0,440	0,515	0,128	0,477	++	+++
	3. Hafta	0,505	0,673	0,130	0,481	+++	++++
Mayıs	1. Hafta	0,407	0,376	0,130	0,467	++	+
	3. Hafta	0,365	0,375	0,129	0,488	++	+
Haziran	1. Hafta	0,360	0,151	0,122	0,482	+	-
	3. Hafta	0,160	0,132	0,117	0,479	-	-
Temmuz	1. Hafta	0,155	0,123	0,122	0,491	-	-
	3. Hafta	0,143	0,135	0,133	0,471	-	-
Ağustos	1. Hafta	0,131	0,170	0,144	0,490	-	-
	3. Hafta	0,130	0,155	0,135	0,475	-	-
Eylül	1. Hafta	0,133	0,148	0,132	0,450	-	-
	3. Hafta	0,351	0,364	0,121	0,452	+	+
Ekim	1. Hafta	0,404	0,391	0,122	0,445	++	++
	3. Hafta	0,395	0,376	0,131	0,443	++	+
Kasım	1. Hafta	0,371	0,167	0,134	0,456	+	-
	3. Hafta	0,166	0,156	0,129	0,472	-	-
Aralık	1. Hafta	0,144	0,111	0,131	0,481	-	-

En uygun örnekleme zamanının tespiti için yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen grafik Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekilden anlaşılacağı üzere cut-off değerinin üzerinde OD elde edilen 15 mart - 30 mayıs ile 15 eylül -15 kasım arasındaki dönemler ASPV ve ASGV için uygun örnekleme zamanını işaret etmektedir.



Şekil 4.17. ASPV ve ASGV'nin ELISA ile teşhisi için en uygun örnek alma zamanı.

Yumuşak çekirdekli meyve virüs hastalıklarının serolojik olarak kısa bir vejetasyon döneminde teşhis edilebildiği daha önceki çalışmalarda da ortaya konmuştur (Carvo ve Barros, 2001). ASGV hastalık etmeninin yıl boyu hangi dönemlerde daha başarılı bir şekilde ELISA veya RT-PCR ile teşhis edilebildiği üzerine Kundu ve ark. (2003), tarafından Çek Cumhuriyetinde yapılan bir çalışmada RT-PCR için en uygun dönemin Ocak-Haziran, fakat ELISA testi için ise en uygun dönemin mayıs ayı olduğunu bildirmişlerdir. Adı geçen çalışmanın yapıldığı bölge iklim farkı nedeniyle vejetasyon açısından Adana ilinden yaklaşık olarak 1- 1,5 ay daha geridir. Adana koşullarında yapılan bu çalışmada ise vejetasyon farklılığından dolayı en uygun dönemin Nisan ortasından-Mayıs ortasına kadar olan zaman olduğu belirlenmiştir. Diğer bölgelerde iklim farklılığından dolayı en iyi örnekleme zamanının meyvelerin yaklaşık ceviz büyüklüğüne geldiği dönem olduğu söylenebilir. Bu çalışmada sonbahar döneminde alınan örneklerden de pozitif sonuçlar alınabildiği ortaya konmuştur. Birçok virüs hastalığında tespit ve teşhis için daha geniş bir zaman

aralığı varken ASPV ve ASGV hastalık etmenleri için bu süre oldukça kısa olarak saptanmıştır.

Bunun nedeninin floemde yerleşmiş olan ipliksi (*Flexiviridae* familyası) yapıdaki bu virüslerin özellikle çevre sıcaklığından diğer virüslere oranla daha fazla etkilenmeleri olduğu söylenebilir (Khan ve Dijkstra, 2006). ASPV ve ASGV virüs hastalıkları da birer *Flexiviridae* üyesidir ve özellikle ASPV sıcaklıktan daha fazla etkilenmektedir. Nitekim GuoPing ve ark, (1996) yaptıkları çalışmada ASPV ve ASGV ile enfekteli elma bitkilerine thermotherapy ve meristem ucu kültürü uygulamalarının kombinasyonu ile virüsten ari üretim materyali elde etmeye çalışmış, bu çalışmanın sonunda enfekteli bitkilerin ancak %66,7'sini arındırılabilirdiğini bildirmişlerdir. Enfekteli olarak kalan bitkilerin içerisinde ASGV %49,8, ASPV %29,3 oranında bulunmuştur. Bu çalışmadan anlaşıldığı üzere ASPV, ASGV'ye oranla sıcaklığa daha duyarlıdır. Başka bir çalışmada virüsten ari çoğaltım materyali üretiminde yapılan termoterapi uygulamalarında ASPV 45 günün sonunda %90 oranında elemine edilirken ASGV ancak 65 günün sonunda %90 oranında elemine edilebilmiştir (Eastwell, 2008). Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ASGV'nin sezon içinde ASPV'ye oranla daha geniş bir zaman aralığında pozitif sonuçlar vermesinin bu etmenlerin başta sıcaklık olmak üzere çevre koşullarına verdikleri farklı tepkilerden olduğu anlaşılmaktadır. ASPV ve ASGV gibi latent virüsler bu yüzden yalnızca yıl içinde değil, değişik yıllarda da ELISA testinde farklı sonuçlar verebilmektedir (Kirby ve ark. 2001). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda yıldan yıla değişen sıcaklık farklılıklarına bağlı olarak en uygun örnekleme zamanında küçük değişiklikler olabileceği anlaşılmaktadır.

4.2.3. ELISA Çalışmalarında Kullanılacak En Uygun Bitki Dokusunun Tespiti

ASPV ve ASGV gibi hastalık etmenleri bitki bünyesinde daha az çoğalmakta ve dokular arasında düzensiz dağılmaktadırlar. Bu etmenler bitki bünyesinde az sayıda bulduklarından ve yavaş yayıldıklarından dolayı da bitki metabolizmasında gözle kolayca görülebilecek şekilde belirti oluşturamazlar ve bu nedenle latent hastalık etmeni olarak adlandırılırlar. Latent virüslerin bitki bünyesindeki

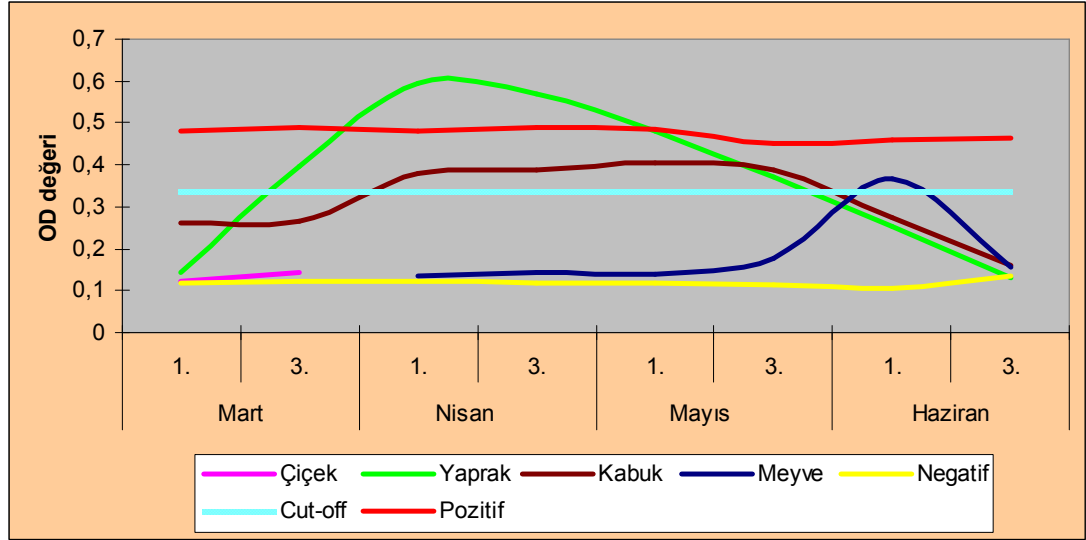
konsantrasyonları da az olduğundan ELISA testi ile tespitleri de zordur (Bos, 1999).

ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin en uygun hangi bitki dokusundan belirlenebileceğinin saptanması amacıyla farklı bitki dokularından alınan örneklerle ELISA çalışmaları yapılmıştır. Çalışma ASPV (P2) ve ASGV (G2) ile enfekteli bulunan Anna çeşidi elma ağaçlarından alınan, yaprak, kabuk (floem), çiçek ve meyve (meyve eti, meyve çekirdeği) örnekleriyle yapılmıştır. Mart ve Haziran ayları arasında 15 günlük dönemler halinde alınan örneklerle yapılan ELISA test sonuçları Çizelge 4.12’de, bu sonuçlarla oluşturulan grafik ise Şekil 4.18 verilmiştir

Çizelge 4.12. ASPV’nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.

Ay	Tarihi	Çiçek ort. OD	Yaprak ort. OD	Kabuk ort.OD	Meyve ort.OD	Negatif ort.OD	Pozitif Ort.OD
Mart	3 Mart	0,121	0,144	0,262	-	0,119	0,481
	18 Mart	0,145	0,398	0,265	-	0,123	0,489
Nisan	2 Nisan	-	0,595	0,378	0,133	0,121	0,479
	17 Nisan	-	0,570	0,386	0,145	0,119	0,488
Mayıs	5 Mayıs	-	0,481	0,405	0,139	0,120	0,486
	20 Mayıs	-	0,371	0,390	0,177	0,112	0,452
Haziran	4.Haziran	-	0,252	0,273	0,367	0,105	0,461
	19 Haziran	-	0,132	0,161	0,155	0,133	0,464

Bu grafikten de anlaşılacağı üzere ASPV için kabuk dokusu pozitif sonuç vermesine rağmen en uygun bitki dokusu yaprak olarak saptanmıştır. Yaprak dokusu mart ayının ikinci yarısından haziran başına kadar pozitif sonuçlar vermiş olmakla birlikte en yüksek OD değerleri nisan ayı ile mayıs ayının ilk yarısında elde edilmiştir. Kabuk örnekleri nisan ayından itibaren pozitif sonuçlar vermiş olmakla birlikte OD değerleri yaprak örneklerinin altında kalmıştır. Yapılan teşhis çalışmalarında ASPV yaprak ve kabuk dışında meyve çekirdeğinde de saptanabilmiştir. Fakat meyve örnekleri yalnızca haziranın ilk yarısında kısa bir dönemde pozitif sonuç vermiş ve OD değerleri yaprak ve kabuk örneklerine ait OD değerlerinin altında kalmıştır. Gugerli ve Ramel (2004), yaptıkları bir çalışmada ASPV’yi benzer bir şekilde yine düşük OD değeri ile meyve çekirdeğinde bulduklarını rapor etmişlerdir. Haziran ayında hava sıcaklığı yüksek olduğu halde meyve örneklerinde ASPV tespit edilmesi meyve iç sıcaklığının düşük olması ve metabolik faaliyetlerin devam ediyor olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

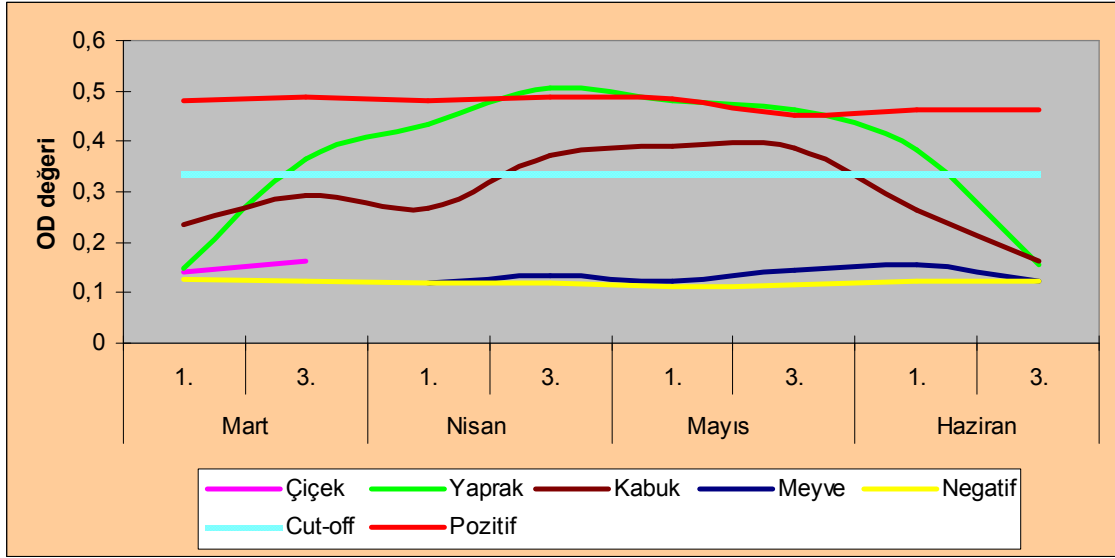


Şekil 4.18. ASPV'nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.

ELISA testlerinde kullanılmak üzere ASGV için en uygun bitki dokusunun tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.13'te verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere yaprak ve kabuk örnekleri pozitif, çiçek ve meyve örneklerinden negatif sonuçlar alınmıştır. Yaprak örnekleri ASPV'ye benzer şekilde mart ayının ikinci yarısından haziran başına kadar pozitif sonuçlar vermiş olup OD değerleri kabuk dokusundan yüksek olmuştur. Fakat bu değerler ASPV için elde edilen OD değerlerinden daha düşük kalmıştır. ASGV için alınan kabuk örnekleri ancak nisan ayının ikinci yarısından itibaren pozitif sonuçlar vermiş ve yaprak örnekleri gibi haziran ayından sonra negatif sonuçlar vermişlerdir (Şekil 4.19).

Çizelge 4.13. ASGV'nin ELISA ile teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi.

Ay	Tarihi	Çiçek ort. OD	Yaprak ort. OD	Kabuk ort.OD	Meyve ort.OD	Negatif ort.OD	Pozitif Ort.OD
Mart	3 Mart	0,141	0,148	0,236	-	0,126	0,481
	18 Mart	0,164	0,365	0,291	-	0,122	0,489
Nisan	2 Nisan	-	0,433	0,267	0,121	0,120	0,479
	17 Nisan	-	0,505	0,371	0,133	0,119	0,488
Mayıs	5 Mayıs	-	0,482	0,389	0,122	0,113	0,486
	20 Mayıs	-	0,464	0,385	0,125	0,116	0,452
Haziran	4.Haziran	-	0,382	0,263	0,115	0,123	0,461
	19 Haziran	-	0,156	0,161	0,123	0,124	0,464



Şekil 4.19.ASGV'nin teşhisi için uygun bitki dokusunun belirlenmesi için yapılan ELISA test sonuçları.

ASGV için ELISA testlerinde kullanılacak en uygun dokunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada çiçek, yaprak, kabuk ve meyve dokusu kullanılmıştır. Çalışmalar neticesinde en uygun dokunun orta yaşlı yaprak olduğu belirlenmiştir. Kabuk dokusu örneklerinde pozitif sonuçlar alınmasına rağmen, ELISA 405 nm'deki absorbans değerleri Şekil 4.19'da görüldüğü gibi yaprak dokusu değerlerinden daha düşük çıkmıştır. Kundu ve ark. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada da ASGV için en uygun dokunun yaprak olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada saptandığı gibi Çek Cumhuriyeti'nde de Stark Earliest gibi bazı yazlık çeşitlerin haziran ayının ortasına kadar ELISA testinde pozitif sonuçlar verdiği rapor edilmiştir, (Kundu ve ark. 2003).

ELISA testlerinde kullanılmak için uygun bitki dokusunun belirlenmesi amacıyla son yıllarda Sırbistan'da yapılan bir çalışmada; elmada, yalnızca çiçek petal yaprakları kullanıldığında her iki etmenin de ELISA ile teşhis edilebildiği rapor edilmiş olmakla beraber (Paunovic ve Jevremovic (2008), bu bulgu henüz başka bir araştırmacı tarafından doğrulanmamıştır. Bu çalışmada çiçek örnekleri bütün dokuları içerecek şekilde kullanılmış fakat yapılan çalışmada çiçeklerde ASPV ve ASGV saptanmamıştır.

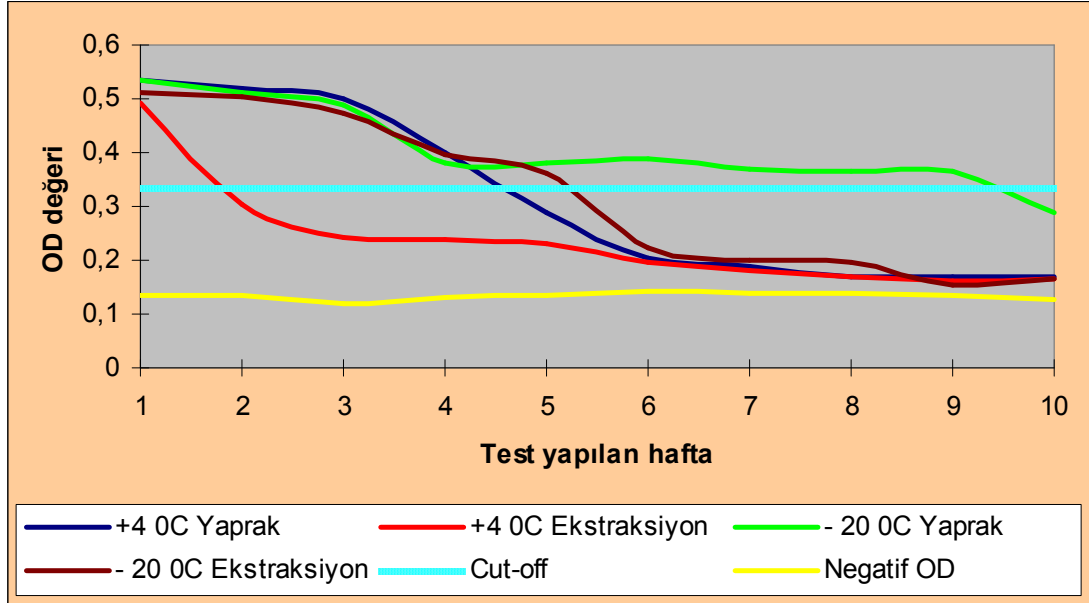
4.2.4. ELISA Teşhis Çalışmalarında Kullanılacak Örneklerin Muhafazası

Sürvey kapsamında toplanan örneklerin çokluğu ve bozulma riskinden dolayı örneklerin muhafaza koşulları ve bu koşulların DAS-ELISA teşhis metoduna etkisinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Bu amaçla 2006 yılında yapılan çalışmalarda ASPV ve ASGV ile enfekteli olduğu belirlenen ağaçlardan nisan ayında yaprak örnekleri alınmış, alınan bu örnekler ELISA testlerinde kullanılmak üzere hazırlanan ekstraksiyon tamponunda ezilmiş ve test edilmiştir. Daha sonra alınan yaprak örnekleri yaprak ve ekstrakt olarak 4°C ve -20°C muhafaza edilmiş ve haftalık periyotlar halinde ELISA testine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14. ASPV örneklerinin muhafaza koşulları üzerine yapılan test sonuçları.

Hafta	Örnek Muhafaza Koşulları				Pozitif OD	Negatif OD	Sonuç
	+4 °C		- 20 °C				
	Yaprak ort. OD	Ekstraksiyon ort. OD	Yaprak ort. OD	Ekstraksiyon ort. OD			
1	0,535	0,491	0,534	0,512	0,499	0,134	++++
2	0,518	0,302	0,513	0,505	0,489	0,133	+++
3	0,501	0,241	0,490	0,475	0,493	0,121	+++
4	0,399	0,239	0,380	0,398	0,487	0,129	+++
5	0,289	0,231	0,379	0,361	0,496	0,135	++
6	0,202	0,195	0,388	0,223	0,452	0,143	+
7	0,187	0,179	0,370	0,201	0,496	0,138	+
8	0,169	0,171	0,367	0,195	0,405	0,140	+
9	0,168	0,160	0,364	0,155	0,492	0,133	+
10	0,170	0,164	0,289	0,165	0,498	0,128	-

Bu araştırmayla yaprak örneklerinin +4°C’de bir ay, -20°C’de ise yaklaşık iki ay muhafaza edilebildiği anlaşılmıştır. Ekstrakte edilen örneklerin -20°C’de beş hafta +4°C’de ise sadece bir hafta kullanılabilceği görülmüştür. İpliksi virüslerin ekstrakte edilmiş halde ısı değişikliklerine fazla dayanıklı olmadıkları, dolayısıyla doku içerisinde muhafaza edilmelerinin daha uygun olduğu düşünülmektedir. Fakat örneklerin doku içerisinde -20°C’de bile dokuz hafta kadar ELISA pozitif sonuçlar verdiği göz önünde alındığında araştırma çalışmalarında alınan örneklerin fazla bekletilmeden en kısa sürede çalışılması gerektiği ortaya konmuştur. Elde edilen veriler Şekil 4.20’de daha kolay anlaşılacak üzere grafik olarak ifade edilmiştir.

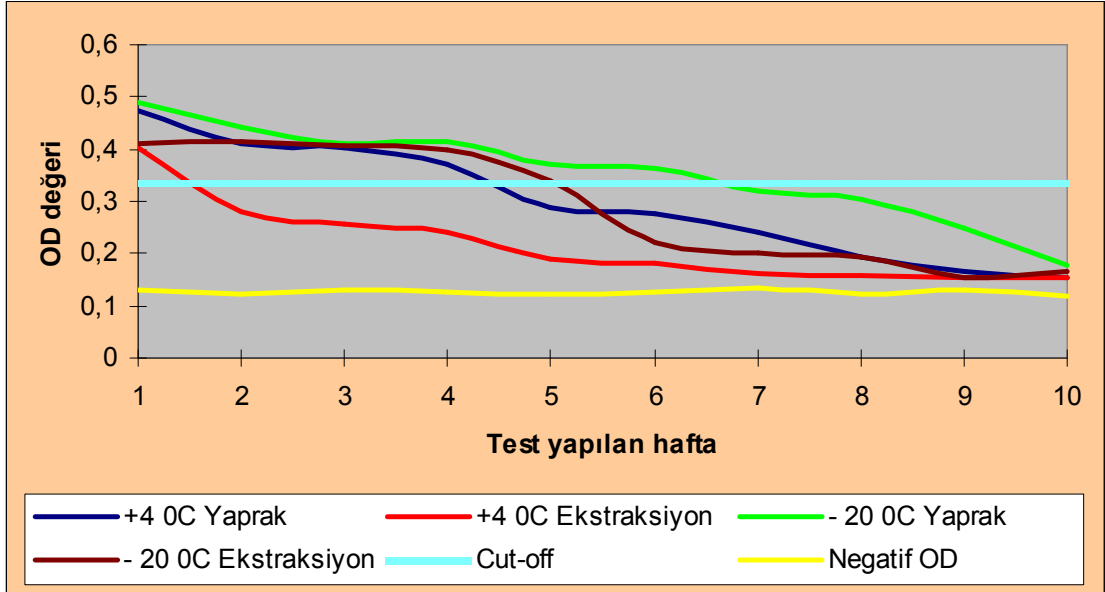


Şekil 4.20. ASPV için örnek muhafaza koşullarının saptanması.

Örnek muhafaza koşulları üzerine ASGV için yapılmış olan çalışma sonuçları Çizelge 4.15'te verilmiş ve enfekteli yaprak örneklerinin en fazla -20°C 'de altı hafta süre ile muhafaza edilebildiği görülmüştür (Şekil 4.21). Diğer muhafaza koşullarında ASGV, ASPV ile aynı sonuçları vermiş olmakla birlikte, ASGV örneklerinin ASPV'den daha kısa sürede bozulması bu etmenle çalışıldığında daha hızlı olunması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar sonucunda ELISA tamponunda ezilmiş olan örneklerin yaprak örneklerine göre daha kısa sürede bozulduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. ASGV örneklerinin muhafaza koşulları üzerine yapılan test sonuçları.

Hafta	Örnek Muhafaza Koşulları				Pozitif OD	Negatif OD	Sonuç
	$+4^{\circ}\text{C}$		-20°C				
	Yaprak ort. OD	Ekstraksiyon ort. OD	Yaprak ort. OD	Ekstraksiyon ort. OD			
1	0,475	0,401	0,491	0,412	0,405	0,132	++++
2	0,410	0,279	0,443	0,415	0,411	0,123	+++
3	0,401	0,255	0,412	0,405	0,410	0,131	+++
4	0,370	0,240	0,413	0,398	0,417	0,127	+++
5	0,288	0,191	0,371	0,341	0,399	0,122	++
6	0,277	0,183	0,362	0,223	0,403	0,128	+
7	0,241	0,162	0,320	0,201	0,419	0,135	-
8	0,195	0,159	0,304	0,195	0,401	0,124	-
9	0,164	0,154	0,249	0,155	0,412	0,129	-
10	0,154	0,152	0,179	0,165	0,392	0,118	-



Şekil 4.21. ASGV için örnek muhafaza koşullarının saptanması

ELISA çalışmalarında kullanılan bitki dokuları daha çok 4 °C muhafaza edilmekle beraber bu konuda özellikle yapılmış fazlaca çalışma bulunmamaktadır. Fakat James (1999) yaptığı çalışmada RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere Kanada, Nepal, İsrail, Japonya, ABD ve Güney Afrika gibi değişik ülkelerden elde ettiği elma ve armut bitkilerine ait yaprak ve kabuk dokularını -80 °C'de 4 ay boyunca muhafaza etmiş ve bu sürenin sonunda izolatların IC/RT-PCR analizlerinde pozitif sonuçlar verdiğini belirlemiştir. Bu çalışma -80 °C'de muhafaza edilen örneklerin immunolojik reaksiyon gösterdiklerini ispatlamıştır. Bu çalışmadan da anlaşıldığı üzere -80 °C'de bile ancak 4 ay muhafaza edilebilen örneklerin ASPV ve ASGV için -20 °C de en fazla iki ay süreyle pozitif sonuçlar vermekle birlikte örnek saklama süresinin tercihen 5 haftayı geçmemesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca ekstrakte edilmiş örneklerin muhtemelen bitki özsuyu içeriklerinden dolayı çok çabuk bozuldukları, dolayısıyla örneklerin ekstrakte edilip 4°C'de saklanmalarını, fakat -20 °C'de ekstrakte edilmiş bu örneklerin bir ay süreyle kullanılmak üzere saklanabileceği görülmüştür. Cann (1999), yaprak materyallerinin saklama süresinin etmene göre değişebileceğini fakat kurutarak +4°C'de saklamanın daha uygun olacağını, daha uzun süreli muhafaza için ise -190 °C'de cryopreservation yöntemlerinin kullanılmasının daha uygun olacağını bildirmiştir

4.2.5. Dormant Dokuların Forse Edilerek ELISA Testlerinde Kullanılması

Sürvey çalışmalarında alınan örneklerin ELISA sonuçları göz önünde bulundurularak aynı ağaçlardan dormant dönemde (Kasım-Aralık) 20-25 cm uzunluğunda bir yaşlı sürgünler alınmıştır. Alınan sürgünler etiketlenerek soğuklama ihtiyacının karşılanması amacıyla 60 gün süreyle +4⁰C'de muhafaza edilmiştir. Soğuklama ihtiyacı karşılanan sürgünler 18-25⁰C sıcaklık, %70 nem ve 16/8 (aydınlık/karanlık) ışık koşullarında sürmeleri teşvik edilmiştir. Yaprak veren sürgünlerden alınan örnekler ELISA testine tabi tutulmuş ve sonuçlar vejetasyon döneminde yapılan testlerle karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.16'dan anlaşılacağı üzere değişik illerinden alınan 16 elma, 7 armut 8 ayva olmak üzere toplam 31 adet forse edilen örnekte, ortalama enfeksiyon oranında yalnızca %3,5 civarında bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlarla dormant dönemde alınan örneklerin forse edilmesi ile daha yüksek pozitif sonuçlar verdikleri ortaya konmuştur. Fakat bu oran yapılan uygulamanın test başarısını artırmasından daha çok örneklerin test için en uygun dönemde kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu metot sertifikasyon çalışmalarında veya geniş sürvey çalışmalarında uygulanabilir. Nitekim Carvo ve Barros (2001) tarafından yapılan bir çalışmada da ACLSV için forse edilen örneklerin serolojik teşhisler için daha uygun test örneği olduğu ortaya konmuştur.

Çizelge 4.16. Forse edilen örneklerle yapılan ELISA çalışmaları.

İller	Konukçu	Örnek sayısı	Enfekteli Örnek sayısı		Etmen
			Vejetasyon dönemi	Forse edilen	
K. maraş	Elma	9	1	1	ASGV
	Armut	1	1	1	ASPV
	Ayva	5	2	2	ASGV
Niğde	Elma	6	2	2	ASGV
	Armut	6	-	1	ASPV + ASGV
	Ayva	3	-	-	-
Adana	Elma	1	1	1	ASGV + ASPV
Toplam(%)		31	7 (%22,85)	8 (%25,80)	

4.3. Sürvey Alanlarında Yapılan Makroskobik Gözlemler**4.3.1. ASPV İle İlgili Makroskobik Gözlemler**

Sürvey çalışmalarının başladığı 2006 yılında Adana ilinde ASPV ile enfekteli elma ve armut ağaçları tespit edilmiştir. Enfekteli olduğu tespit edilen bu ağaçlar yılda en az iki defa olmak üzere ilkbahar ve sonbahar aylarında ziyaret edilmiş ve gerekli gözlemler yapılarak notlar alınmıştır. Çalışmanın ilk yılında ASPV ile enfekteli herhangi bir ayva ağacı tespit edilemediğinden ayva ile ilgili gözlemler 2007 ve 2008 yıllarına aittir. Sürvey çalışmaları neticesinde yalnızca Kahramanmaraş ilinde ayva bahçelerinde ELISA testi ile ASPV için pozitif sonuçlar alınmıştır. Dolayısıyla ayvada ASPV ile ilgili elde edilen makroskobik gözlem verileri Kahramanmaraş ili ayva alanlarına aittir.

Makroskobik gözlemlerin yapıldığı bazı ağaçlarda ASPV ile beraber ACLSV virüs hastalığına da rastlanmıştır. Bu karışık enfeksiyon en çok Kahramanmaraş ilindeki ayva örneklerinde görülmüştür. Dolayısıyla ayva bahçelerinde gözlenen makroskobik belirtilerin ASPV+ACLSV karışık enfeksiyonunda daha şiddetli seyrettiği tespit edilmiştir.

Elmalarda ASPV ile ilgili elde edilen makroskobik veriler ise Adana ilinde bulunan ASPV MM106 üzerine aşılı İO-54 kod numaralı Anna çeşidi ile, yine Adana ilinde tespit edilen ASPV enfekteli M9 üzerine aşılı Vista Bella elma çeşitlerine aittir. Bunun dışında sürvey alanlarında örneklenen çok sayıda elma çeşidinde de makroskobik gözlemler yapılmıştır.

Armutta ASPV ile ilgili elde edilen veriler ise; Adana ilinde bulunan OHF (Old Home x Fermingdale) üzerine aşılı ÇF-41 kodlu Santamaria ile armut çöğürü üzerine aşılı ve çeşidi tespit edilemeyen yerli bir armut ağacı üzerinde yapılmıştır. Ayrıca sürvey alanlarında bulunan çöğür üzerine aşılı Deveci armut çeşidi ve bunun dışında örneklenen diğer armut alanlarında da makroskobik gözlemler yapılmıştır. Makroskobik belirtiler üzerine yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular yaprak, meyve, gövde ve diğer bulgular olmak üzere sınıflandırılmıştır.

4.3.1.1. ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Görülen Meyve Belirtileri

Makroskobik gözlemler sonucu ASPV'nin çalışma konusu olan her üç yumuşak çekirdekli meyve türünde meyvelerde şekil bozukluklarına yol açtığı gözlenmiştir. Bu belirtiler en şiddetli olarak ayva ve armut bitkisinde görülmekle birlikte, elma meyvelerinde de hafif şekilde meyve bozuklukları gözlenmiştir. Bu belirtiler; elmada yalnızca Anna çeşidinde hafif şekil bozukluğu (Şekil 4.22), armutta taşlaşma (stony pit) olarak bilinen meyve deformasyonu (Şekil 4.23) ve ayva meyvesinde malformation olarak bilinen şekil bozukluğu (Şekil 4.24 ve 4.25) ile çekirdek evi etrafında (Şekil 4.26) ve meyve kabuğu altında zamk paketleri (Şekil 4.27) oluşması şeklindedir.

Bu meyve belirtileri bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmekle birlikte ticari çeşitlerde çok yaygın olmadığı düşünülmektedir. Elmalarda gözlenen belirtiler Welsh ve Uyemato (1980), tarafından Virginia crab üzerinde rapor edilmiş ve *Flute Fruite* olarak isimlendirilmiştir. Elma meyvesinde meydana gelen bu şekil bozukluğunun yanında enfekteli ağaçlardaki meyvelerin sağlıklı meyvelere oranla daha küçük oldukları da gözlenmiştir.

Armutlardaki meyve belirtileri ise bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiş ve Pear Stony Pit hastalığı olarak isimlendirilmiştir. Bu hastalığın oluşumunda hastalık etmeni virüsün meyvede sıklerenkima hücre oluşumunu teşvik etmesi sonucu olduğu bildirilmiştir. Bu meyvelerin dokusu oldukça sert olduğundan kesilmesi çok zordur ve ticari bir değeri yoktur (Thomsen, 1989). Bu çalışmadaki armut meyvesine ait belirtiler yalnızca deveci armut çeşidinde gözlenmiştir.

Ayva meyvesindeki malformation ve zamk oluşumu şeklindeki hastalık belirtileri değişik araştırmacılar tarafından çalışılmış ve bu hastalığın ASPV'nin bir ırkı olan PVYV tarafından oluşturulduğu rapor edilmiştir (Waterworth, 1989; Puanoviç, 1995; Mathioudakis ve ark, 2006). Ayva meyvelerindeki belirtiler yalnızca Kahramanmaraş ilinde ve ekmek ayva çeşidinde tespit edilmiş ve bu belirtilerin meyve çapı 5-6 cm olduktan sonra kolayca görülebilir hale geldiği ve üretim sezonu boyunca gelişerek arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.22. Elma meyvelerinde şekil bozuklukları; küçük ve değişik noktalarda içe çökük meyve.

Yer : Adana

Çeşit/Anaç: Anna/MM106



Şekil 4.23. Armut meyvelerinde stonypit (çukurlaşma ve taşlaşma) belirtileri.

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit /Anaç: Deveci/OHF



Şekil 4.24. ilkbaharda ayva meyvesinde görülen şekil bozukluğu (malformation), sağda.

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç: Çelikleme



Şekil 4.25. Sonbaharda ayva meyvesinde görülen ilerlemiş malformation (sağda).

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç : Çelikleme



Şekil 4.26. Malformation belirtisi gösteren ayva meyvesinin çekirdek evi kenarında ve meyve dokusunda zamk oluşumu (sağda).

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç : Çelikleme



Şekil 4.27. Malformation belirtisi gösteren ayva meyvesinin kabuğu altında zamk oluşumu (üstte).

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç : Çelikleme

4.3.1.2. ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Görülen Yaprak Belirtileri

Yapılan makroskobik gözlemler sonucunda Anna çeşidi elma yaprağında soluk lekeler (Şekil 2.28), Golden elma çeşidinde ana damar boyunca renk açılması ve doku çökmesi (Şekil 4.29), Santamaria armut çeşidinde yan damarlar üzerinde gelişen sarı lekeler (Şekil 4.30), çeşidi belirlenemeyen yerli bir armut bitkisinin yaprak ana damarının arka yüzünde yassılaştırması ve yaprağın küçük kalması şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Şekil 4.31). Bu belirtiler genel olarak erken ilkbaharda ortaya çıkıp mayıs ayı sonlarına kadar devam etmiştir.

En şiddetli yaprak belirtileri ise ayvada görülmüş olup bu belirtiler elma ve armuttaki belirtilerden farklı olarak vejetasyon boyunca daha uzun süre gözlenmiştir. Ayvada ASPV'nin ACLSV gibi diğer hastalık etmenleriyle birlikte bulunduğu durumlarda belirtilerin daha şiddetli olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir. Ayvadaki bu belirtiler; yapraklarda epinasty (Şekil 4.32), mozaik şeklinde renk açılmalarıyla birlikte küçük yaprak oluşumu (Şekil 4.33) ve ACLSV+ASPV enfeksiyonu sonucu sistemik mozaik lekeler şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.28. ACLSV ve ApMV negatif elma yaprağında nisan ayında görülen lekeler.

Yer: Adana

Çeşit: Anna

Anaç: MM106



Şekil 4.29. Elma yaprağında ana damar boyunca görülen renk açılması ve doku çökmesi.

Yer: Adana

Çeşit: Golden

Anaç: M 9



Şekil 4.30. Armut yapraklarında erken ilkbaharda görülen yan damarlar üzerinde gelişen sarı renkli lekeler.

Yer: Adana

Çeşit: Santamaria

Anaç: Çöğür



Şekil 4.31. Armut yaprak ana damarının arkadan bakıldığında yassılaştırmış ve sağlıklı yaprağa göre daha küçük kalmış görüntüsü.

Yer: Adana

Çeşit: Yerli

Anaç: Çöğür



Şekil 4.32. Ayva yapraklarında mozaik ve epinasty (yaprak ucundan geriye bükülme) belirtisi.

Yer: Kahramanmaraş

Çeşit: Ekmek

Anaç: Çelikleme



Şekil 4.33. ASPV ile ACLSV karışık enfeksiyonu sonucu mozaik belirtileri gösteren ve küçük kalmış ayva yaprağı.

Yer: Kahramanmaraş

Çeşit: Ekmek

Anaç: Çelikleme



Şekil 4.34. ACLSV+ASPV karışık enfeksiyonu sonucu ayva yapraklarında görülen sistemik mozaik simptomlar.

Yer: Kahramanmaraş

Çeşit: Ekmek

Anaç: Çelikleme

4.3.1.3. ASPV ile Enfekteli Ağaçlarda Gözlenen Gövde ve Diğer Belirtiler

Bu hastalık etmeni ismini elma gövdesinde meydana getirdiği pitting (yivleşme) belirtisinden almıştır. Bu hastalığın neden olduğu gövde belirtileri en çok Virginia crab çeşidinde görülmektedir. ASPV Ottawa 524 ve Hyslob crab, Radiant ve Sparkler carb gibi çeşitlerde ise aşı noktasında da pitlere neden olabilmektedir. Bazı anaç çeşit kombinasyonlarında ise kabuk dokusunda nekroz ve buna bağlı olarak gelişme geriliği ile bodurluk görülebilmektedir (Stouffer, 1989). ASPV en çok *Pyronia veitchii* armut anacı üzerinde bazı gövde zararlanmalarına neden olmaktadır. Daha çok gövde nekrozu şeklinde olan bu belirtiler önemli büyüme geriliklerine neden olduğu Desvignes ve ark. (1999) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada yapılan makroskobik gözlemler sonucunda, Anna elma çeşidinde bodurluk (Şekil, 4.35), Ekmek çeşidi ayva bitkisinde gövde bükülmesi (Şekil 4.36) ve gövdede diz oluşumuna rastlanmıştır (Şekil 4.37). Daha çok çoğür ve OHF anaçlarının kullanıldığı bölgemizde yapılan gözlemlerde ticari armut bahçelerinde herhangi bir gövde belirtisine rastlanmamıştır.



Şekil 4.35. ASPV ve ASGV ile enfekteli 21 yaşındaki yarı bodur elma ağacı (Ortada).

Yer: Adana

Çeşit: Anna

Anaç: MM106



Şekil 4.36. ASPV ile enfekteli olduğu belirlenen (sağda) ve 2 yıl boyunca gözlenen 11 yaşlı ayva ağacında görülen gövde bükülmesi ve konkaviteler. Solda sağlıklı ayva ağacı.

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç : Çelikleme



Şekil 4.37. ASPV enfekteli 11 yaşlı ayva ağacı gövdesinde görülen bükülme ve diz oluşumu.

Yer : Kahramanmaraş

Çeşit : Ekmek

Anaç : Çelik

Bu makroskobik gözlemler sonucunda ASPV'nin ayvalarda Quince Fruit Deformation Virus (QFDV) olarak bilinen hastalığa neden olduğu ve daha önce eski Yugoslavya da Leskovacka çeşidinde görülen belirtilerle oldukça benzer olduğu görülmüştür (Puanovic ve Rankovic, 1998). Yunanistan'da Mathioudakis ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, QFDV hastalık belirtisi gösteren ayva ağaçlarında yapılan analizler sonucunda ASPV ile enfekteli olduğu, ayrıca bu belirtileri gösteren bazı ayva ağaçlarında aynı zamanda ACLSV'nin de bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da Kahramanmaraş ilinde yapılan ayvada meyve deformasyonlarına yol açan etmenin ASPV olduğu, fakat ASPV'nin ACLSV ile karışık enfeksiyon halinde bulunduğu durumlarda zarar şiddetinin arttığı ve yaprakta renk bozulmalarının meydana geldiği gözlenmiştir. Yine benzer bir çalışma Akbaş ve İlhan (2008) tarafından Ankara ili ayva alanlarında yapılmış ve çalışma sonucunda ayva yapraklarında sarı çizgiler, lekeler ve diğer renk bozulmalarının nedeninin ACLSV olduğu belirlenmiştir, ancak ACLSV enfeksiyonu belirlenen alanlarda meyve deformasyonlarının varlığından söz edilmemiştir. Bu durum ayvada ACLSV'nin tek başına bulunduğu durumlarda meyve deformasyonlarına neden olmadığı kanaatini güçlendirmektedir.

4.3.2. ASGV İle İlgili Makroskobik Gözlemler

Sürvey çalışmaları süresince ASGV pozitif bulunan ağaçlar işaretlenerek takip edilmiştir. İşaretlenen bu ağaçlarda ASGV için spesifik sayılabilecek herhangi bir belirtiyeye rastlanmamıştır. Ancak ASGV enfekteli armut ağaçlarında gözlenen yaprak belirtileri Şekil 4.38, gövde anomalileri ise 4.39'da verilmiştir. Adana'da OHF üzerine aşılı Santamaria, Mersin'de çöğür üzerine aşılı yerli armut çeşitlerinde gözlenen belirtiler diğer ASGV enfekteli armut ağacında gözlenmemiştir.

Yumuşak çekirdekli meyvelerde latent olarak bilinen hastalıkların uygun konukçu ve çevre koşullarında belirti oluşturduğu yapılan bazı araştırma çalışmalarıyla ortaya konmuştur. Örneğin Kore'de yapılan bir çalışmada; armut yapraklarında siyah nekrotik lekeler yol açan PBNLS hastalık etmenin ASGV olduğu ortaya konmuştur (Shim ve ark. 2004).



Şekil 4.38. ASGV enfekteli armut ağacı yaprağında Oak leaf pattern (Meşe yaprağı simptomu).

Yer : Adana

Çeşit : Santamaria

Anaç : OHF



Şekil 4.39. Armutlarda gözlenen aşu uyumsuzluğu belirtisi.

Yer : Mersin

Çeşit : Yerli

Anaç : Çöğür

Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında gövde zararlanmalarına neden olan virüsler konusunda yapılan çalışmalarda bugüne kadar belirgin ve genel bir yaprak belirtisi ortaya konamamıştır. Bu çalışmada yapılan makroskobik gözlemlerde Şekil 4.38’de belirtildiği gibi Santa Maria armut çeşidinde yaprak ana damarından yaprak kenarlarına doğru bir renk açılması görülmüştür. Benzer bir belirti Nashi Hosui armut çeşidi üzerinde Desvignes ve ark. (1999) tarafından bildirilmiştir. Ancak bu belirti ASGV pozitif bütün armutlarda tespit edilmemiştir. Latent bir hastalık etmeni olarak kabul edilen ASGV’nin çevre koşullarına duyarlı olması ve bitki bünyesinde yavaş çoğalmasından dolayı her yıl dökülen yaprak gibi bir dokudaki mevcut virüs miktarı ve aktivitesinin belirti gösterecek orana ulaşamadığı düşünülmektedir.

Ancak bazı duyarlı çeşitlerde ve sıcaklık değerlerinin çok yüksek olmadığı lokasyonlarda latent hastalık etmenelerinin de yaprak belirtilerine neden olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Tayvan’da dünyanın değişik ülkelerinden toplanan farklı ASGV izolatlarıyla yapılan bir çalışmada ASGV’nin *Pyrus pyrifolia* armut yapraklarında, yaprak orta damarından kenarlara doğru doku ve renk bozulması şeklinde belirtiler (Şekil 4.40) gösterdiği rapor edilmiştir (Wu ve ark. 2006). Ayrıca ASGV’nin Kore’de yaygın olarak bulunan armut siyah nekrotik yaprak lekeli hastalığı (PBNLS) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shim ve ark. 2004).

Şekil 4.40. Wu, ve ark. (2006), tarafından Tayvan’da *Pyrus Pyrifolia* armut türü üzerinde rapor edilen ASGV belirtileri.

4.4. ASPV ve ASGV Virüs Hastalıklarının Karakterizasyonu

ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin karakterizasyonu amacıyla 2006 yılında yapılan sürvey çalışmaları neticesinde değişik konukçularda tespit edilmiş olan izolatlar kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan izolatlar Çizelge 4.17’de görülmektedir. Bütün karakterizasyon çalışmalarında aynı izolatlar kullanılmıştır. İzolatların seçimi 2006 yılında yapıldığından ve 2006 yılında ayvalarda herhangi bir enfeksiyon tespit edilemediğinden karakterizasyon çalışmaları yalnızca elma ve armut izolatlarında yürütülmüş olup ayva izolatları bu çalışmaya dahil edilememiştir. Çünkü özellikle “Odunsu İndikatörlere Aşılama” çalışmalardan güvenilir sonuçlar alınabilmesi için en az iki yıla ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 4.17. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan virüs izolatları.

Virüs	İzolat adı	Konukçu	Yaşı	Belirti	Orijin
ASPV	P1	Armut	22	Yaprak lekesi	Adana-Yüreğir
	P2	Elma	14	Yok	Adana-Balcalı
ASGV	G1	Armut	22	Yok	Adana-Yüreğir
	G2	Elma	20	Yok	Adana-Yüreğir
ASPV+ ASGV	PG1	Armut	22	Yaprak lekesi	Adana-Yüreğir
	PG2	Elma	20	Bodurluk-meyvede şekil bozukluğu	Adana-Yüreğir

4.4.1. Biyolojik Karakterizasyon

Biyolojik karakterizasyon; değişik otsu ve odunsu indikatörlere hastalık etmenlerinin taşınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan bitkilerin virüs hatalıklarından ari olarak elde edilmesi sağlanmış ve bitkiler deneme boyunca diğer hastalık ve zararlılardan korunmuştur.

4.4.1.1. Hastalık Etmenlerinin Otsu indikatörlere Mekanik Olarak Taşınması

Hastalık etmenlerinin indikatörler üzerindeki belirtilerinin tespit edilmesi amacıyla Çizelge 4.18’de verilen 10 farklı otsu bitki türü indikatör olarak kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere farklı konukçular

üzerinde belirlenen ve Çizelge 4.17’de gösterilen ağaçlardan alınan yaprak örnekleri mekanik inokulasyon yöntemi ile konukçulara bulaştırılmıştır. Kullanılan otsu indikatör bitkilerde belirti gözlenmediği durumlarda aynı izolatlardan örnek alınarak deneme tekrar edilmiştir. Bu nedenle Çizelge 4.18’den anlaşılacağı üzere özellikle belirti vermeyen otsu bitkiler için çok sayıda inokulasyon denemesi yapılmıştır.

Çizelge 4.18. Odunsu indikatörlere mekanik inokulasyon çalışmaları.

No	İndikatör bitki	Yapılan test ve gözlemler	Deneme sayısı
1	<i>Chenopodium quinoa</i>	ELISA + GMK	11
2	<i>C.amaranticolor</i>	ELISA+ GMK	11
3	<i>Nicotiana occidentalis</i>	ELISA+ GMK	11
4	<i>N. occidentalis P1</i>	ELISA+ GMK	11
5	<i>N. benthamiana</i>	GMK	8
6	<i>N. glutinosa</i>	GMK	8
7	<i>N. tabacum cvs. White Barley</i>	GMK	8
8	<i>Cucumis sativus</i>	ELISA+ GMK	4
9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ELISA+ GMK	4
10	<i>Gomphrena globosa</i>	GMK	4

GMK:Gözle makroskobik kontrol.

Mekanik inokulasyon çalışmaları 2006, 2007 ve 2008 yılı olmak üzere üç yıl boyunca yapılmıştır. İklim odasında yürütülen mekanik inokulasyon çalışmalarının sonuçları izolatlar bazında topluca değerlendirilmiş olup Çizelge 4.19’da özetlenmiştir. Değerlendirmeye esas teşkil eden belirtiler ve kodları Çizelge altında verilmiştir. Değerlendirme esnasında bitkilerden gözlenen belirtiler kod numarası verilerek kaydedilmiş ve deneme bu şekilde değerlendirilmiştir.

Otsu indikatörlere yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları neticesinde *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana occidentalis P1*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum cvs. White Barley* ve *Gomphrena globosa* olmak üzere toplam 5 indikatör bitkide herhangi bir belirti gözlenmemiştir. Fakat *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus* *Nicotiana occidentalis*, *N. benthamiana* ve *Chenopodium quinoa* üzerinde farklı belirtiler gözlenmiştir.

Çizelge 4.19. Virüs izolatlarının otsu indikatör bitkilerde neden olduğu belirtiler.

Virüs	İzolatlar	İndikatör bitki	Belirtiler ^x
ASGV	G1 Armut	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3,4,6
		<i>Cucumis sativus</i>	7
		<i>Nicotiana occidentalis</i>	2
	G2 54 Elma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2
		<i>Cucumis sativus</i>	7
		<i>Nicotiana occidentalis</i>	2
ASPV	P1 Armut	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,7
		<i>Cucumis sativus</i>	6
	P2 19 Elma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,2
		<i>Cucumis sativus</i>	1, 6
ASGV + ASPV	PG1 Armut	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1, 3, 5, 6, 8
		<i>Nicotiana occidentalis</i>	2, 5
	PG2 Elma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1, 3, 4, 6, 9
		<i>Cucumis sativus</i>	7
		<i>Chenapodium quinoa</i>	1
		<i>Nicotiana benthamiana</i>	2, 6
<i>Nicotiana occidentalis</i>	2		

X

- 1 Yapraklarda epinasti
- 2 Yapraklarda nekroz
- 3 Yapraklarda mozaik ve nekroz
- 4 Yapraklarda nekroz ve küçük kalma
- 5 Yapraklarda deformasyon
- 6 Damar sararması-açılması
- 7 Yapraklarda hafif discoloration
- 8 Yapraklarda doku çökmesi
- 9 Bitkide genel bodurluk

Bu çalışmaların yürütüldüğü iklim odasından alınan görüntüler Şekil 4.41'de, indikatörler üzerinde gözlenen belirtiler ise Şekil 4.42 ile Şekil 4.50 arasındaki resimlerde verilmiştir.



Şekil 4.41. Karakterizasyon amacıyla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarından bir görüntü.



Şekil 4.42. *Phaseolus vulgaris* bitkisinde ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen damar açılması (sağda).



Şekil 4.43. ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu *Phaseolus vulgaris*'te küçülme, epinasty ve discoloration (renksizleşme) belirtisi.



Şekil 4.44. İO-50 ASPV+ASGV izolatının *Phaseolus vulgaris*'te oluşturduğu yaprak mozaikleri ve nekrozlar.



Şekil 4.45. ÇÜ 19 ASPV/elma izolatının *Cucumis sativus* üzerinde oluşturduğu damar açılması simptomu.



Şekil 4.46. İO-50 ASPV+ASGV izolatının *Nicotiana benthamiana*'da oluşturduğu damar açılması ve nekrozlar.



Şekil 4.47. İO-50 ASPV+ASGV izolatının *Chenopodium quinoa* üzerinde meydana getirdiği epinasty belirtisi.



Şekil 4.48. ASPV enfeksiyonu sonucu *Phaseolus vulgaris* bitkisinde meydana gelen epinasty belirtisi.



Şekil 4.49. ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu *Phaseolus vulgaris* bitkisinde oluşan gelen yaprak deformasyonu, epinasty ve doku çökmesi.



Şekil 4.50. PG2 (ASPV+ASGV) izolatının *Nicotiana occidentalis*'te meydana getirdiği lokal yaprak nekrozu.

ASPV ve ASGV için yapılan teşhis ve karakterizasyon çalışmalarında bugüne kadar çok sayıda bitki denenmiştir. *N. Occidentalis*'in test bitkisi bu amaçla kullanılan en iyi indikatör bitkilerden biri olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca ASPV'nin *N. occidentalis*'ten odunsu bitkilerde taşınabildiği de bildirilmektedir (Leone ve ark. 1998). Kundu ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada ASPV ile bulaştırılmış *N. occidentalis* bitkilerinin birçok ASPV ırkına sistemik damar sararmaları şeklinde ve yaprak alt kısmının daralması şeklinde tepki verdiğini bildirmiştir. Yürütülen çalışmada ASPV'nin tek başına bulunması halinde literatürde bahsedilen şekilde belirti gösterirken, ASGV ile birlikte bulunduğu durumlarda *N. occidentalis* yaprakları üzerinde ana damarda sararma ve nekrotik alanlar oluşturmuştur.

Klerks ve ark. (2001), ASPV ile enfekteli elma bitkisinden aldıkları yaprak, göz, meyve ve petal yaprakları kullanarak mekanik inokulasyon yapmış ve ASPV'nin petal yapraklar kullanılarak en iyi mayıs ayında teşhis edilebildiğini bildirmişlerdir. Adı geçen bu çalışmada ASPV için en uygun otsu indikatörün *N. Occidentalis* olduğu ve bu indikatör bitkide inokulasyon sonucu görülen nekrotik alanların ASPV'ye spesifik olduğu, meyve örnekleriyle yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarının ise başarılı sonuçlar vermediği bildirilmiştir. Bu veriler tez çalışması sonucunda elde edilen verilerle paralellik göstermektedir.

4.4.1.2. Hastalık Etmenlerinin Değişik Odunsu indikatörlere Aşılması

Hastalık etmenlerinin karakterizasyonu amacıyla Çizelge 4.17'deki izolatlar ile Materyal ve Motot bölümünde Çizelge 3.3'te yer alan virüsten ari 5 farklı odunsu indikatör bitkilerden ikişer adet kullanılarak inokulasyon amaçlı aşılama yapılmıştır. Deneme, Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü arazisinde 2 yaşlı çöğürler üzerinde kurulmuş, inokulasyon amaçlı aşılama 2006 yılı sonbaharında, değerlendirme amacıyla gerekli kesimler ise 2008 yılı sonunda yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler Çizelge 4.20'de özetlenmiştir.

Odunsu indikatörlere yapılan aşılama sonucunda ASGV için Virginia crab'ta aşı noktası nekrozu, ASPV için ise Spy 227 üzerinde yapraklarda epinasty belirtileri gözlenmiştir. ASGV izolatları içerisinde P1 armut izolatı P2 elma izolatına göre Virginia crab üzerinde daha çok belirti verirken, ASPV izolatları arasında çok önemli bir fark çıkmamıştır. Tekli enfeksiyonları içeren izolatlarla yapılan inokulasyonların hiç biri ikinci yıl sürgün ölümüne neden olmadığından denemede kullanılan izolatların tek başına şiddetli ırk olmadıkları düşünülmektedir (Welsh ve Uyemoto 1980, Desvignes ve ark. 1990).

Her iki hastalığın birlikte buldukları durumda her iki belirtinin dışında özellikle spy 227'de sürgün ölümü, floemde nekroz ve aşı noktasında şişkinlik görülmüştür. Karışık enfeksiyonlar arasında ise elma izolatı PG2 daha şiddetli bulunmuştur. Bu izolat Virginia crab, spy 227 ve M. Platycarpa üzerinde daha fazla belirti vermiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında karışık izolatlardan armut izolatı (PG1) daha şiddetli bulunurken, odunsu indikatörlerde elma izolatının (PG2) daha şiddetli bulunması odunsu indikatörlerin elma olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sürgün ölümü yalnızca Spy 227 indikatör bitkisinde PG2 elma izolatı inokulasyonu sonucu oluşmuştur. Gravenstein Rellstab üzerinde yalnızca PG1 izolatı dal açılmasına neden olmuş bu indikatörde başka herhangi bir belirti gelişmediğinde ve özellikle Şekil 4.58'de görüldüğü üzere floem nekrozu oluşmadığından kullanılan izolatlar şiddetli ırk sınıfına girmemiştir. Dal açılması bugüne kadar rapor edilmemiş bir belirtidir, fakat çeşit reaksiyon denemesinde benzer bir belirti oluşması elde edilen verileri doğrulamaktadır.

Çizelge 4.20. Biyolojik indeksleme değerlendirme tablosu

Virüs	İzolatlar	Konukçular	Belirtiler ^x
ASGV	G1 Armut	Virgina crab	2, 4, 6
		Spy 227	-
		Lord Lamborne	6
		<i>Malus Platycarpa</i>	2
		Gravenstein Rellstab	-
	G2 Elma	Virgina crab	2
		Spy 227	-
		Lord Lamborne	6
		<i>Malus Platycarpa</i>	2
		Gravenstein Rellstab	-
ASPV	P1 Armut	Virgina crab	-
		Spy 227	1, 3
		Lord Lamborne	6
		<i>Malus Platycarpa</i>	1, 2, 3, 6
		Gravenstein Rellstab	-
	P2 Elma	Virgina crab	-
		Spy 227	1, 3
		Lord Lamborne	6
		<i>Malus Platycarpa</i>	2, 3, 6
		Gravenstein Rellstab	-
ASGV + ASPV	PG1 Armut	Virgina crab	2, 6
		Spy 227	1, 2, 3, 6
		Lord Lamborne	4, 6
		<i>Malus Platycarpa</i>	2, 3
		Gravenstein Rellstab	6
	PG2 Elma	Virgina crab	2, 4, 6
		Spy 227	1, 2, 3, 4, 6, 7
		Lord Lamborne	4, 6
		<i>Malus Platycarpa</i>	1, 2, 3
		Gravenstein Rellstab	-

1. Epinasty
2. Aşı noktasında nekroz
3. Floemde nekroz
4. Aşı noktasında şişkinlik
5. Sürgünlerde dal şişkinliği
6. Dal açısının genişlemesi, /7.Sürgün ölümü

Bu çalışma sonucunda odunsu indikatörlerde gözlenen belirtiler Şekil 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.65, 4.56, 4.57 ve 4.58’te verilmiştir.



Şekil 4.51. ASGV enfeksiyonu sonucunda Virgina crab üzerinde görülen aşı noktası şişkinliği



Şekil 4.52. ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu Virgina crab üzerinde görülen aşı noktası nekrozu.



Şekil 4.53. *Malus platycarpa* üzerinde gelişen aşı noktası nekrozu.



Şekil 4.54. ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen floem nekrozu.



Şekil 4.55. ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen sürgün ölümü.



Şekil 4.56. ASPV enfeksiyonu sonucu spy 227 indikatöründe meydana gelen epinasty.



Şekil 4.57. ASPV enfeksiyonu sonucu *Malus platycarpa* üzerinde meydana gelen hafif epinasty.



Şekil 4.58. Lord lamborne üzerinde meydana gelen açığı genişlemesi ve floem nekrozu.



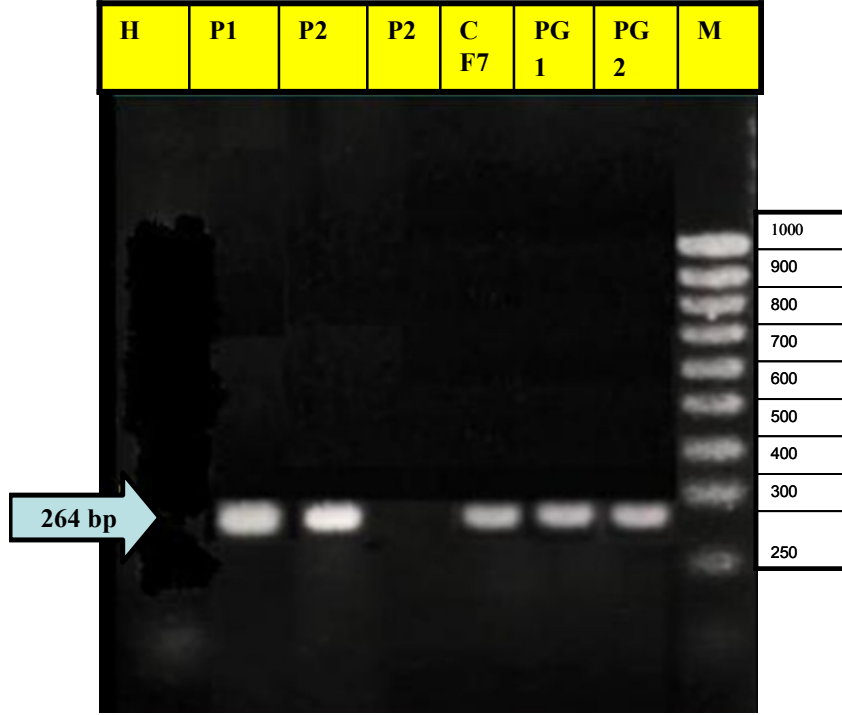
Şekil 4.59. Gravenstein Rellstab çeşidinden bir görüntü.

4.4.2. ASPV ve ASGV Hastalık Etmenlerinin Moleküler Karakterizasyonu

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında da yine biyolojik indeksleme çalışmalarında verilen izolatlar (Çizelge 4.17) kullanılmıştır. Bu çalışmadaki moleküler testler RT-PCR ve RFLP olmak üzere iki grupta yürütülmüştür. Bunların ilki teşhis amacıyla ve RFLP çalışmalarında kullanılmak amacıyla hastalık etmenlerinin RT-PCR yöntemiyle teşhis edilmesidir. Bu kapsamda ASGV ve ASPV için ikişer farklı primer seti ile RT-PCR çalışmaları yapılmıştır.

4.4.2.1. ASPV için Yapılan RT-PCR Çalışmaları

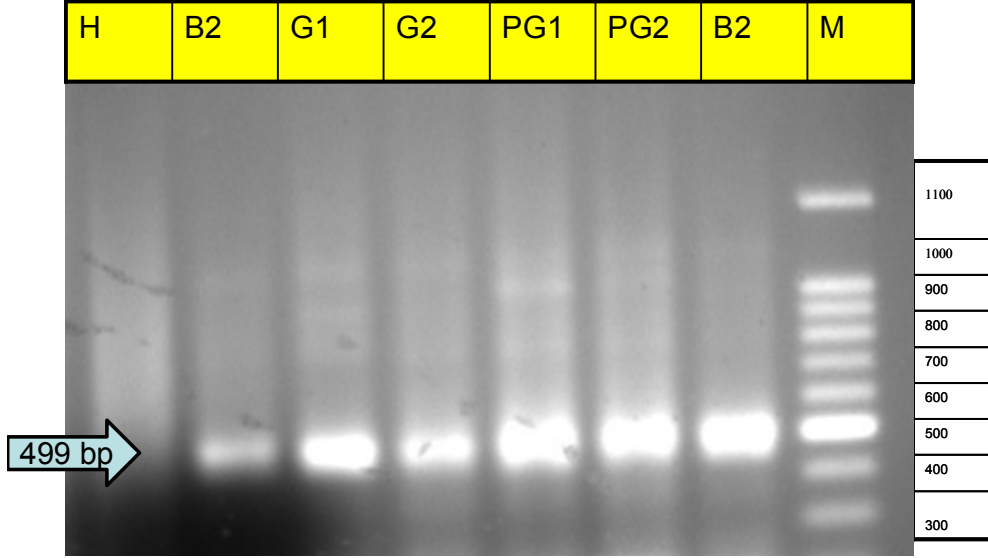
ASPV teşhisi için P1, P2, PG1, PG2 ve CF7 kodlu ağaçlardan alınan yaprak örnekleriyle Kundu (2002), tarafından önerilen phenol-chloroform ve LiCl (Lithium Chloride) esaslı ekstraksiyon metodu kullanılarak total RNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen bu total RNA'lar kullanılarak RT-PCR Kundu (2002)'ye göre yürütülmüş, ASPV-C ve ASPV-A primer çiftleri ile bant elde edilirken ASP-I ve ASP-II primer çiftleriyle herhangi bir bant elde edilememiştir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan ASPV izolatları yalnızca Jelkman ve Keim-Konrad (1997), tarafından önerilen ASP-C ve ASP-A primerleri ile çoğaltılabilmektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen 264 bp'lik DNA ürünü Agaroz jelde koşularak ethidium bromide ile boyanmış ve bantlar görüntülenememiştir (Şekil 4.65). Çalışmada kullanılan bütün izolatlar aynı primer çiftiyle çoğaltılmıştır. Şekilde görülen örneklerden CF-7 karakterizasyon çalışmalarında kullanılmayan fakat pozitif olduğu ELISA testi ile saptanmış olan bir örnek olup pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.60. ASP-C ve ASP-A primerleri (Jelkman & Keim-Konrad , 1997) ile elde edilen 264 bp'lik DNA bandına ait Agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Çalışmada kullanılan ASPV izolatlarının Jelkman ve Keim-Konrad (1997), tarafından geliştirilmiş primer çiftleriyle teşhis edilebilirken Kundu (2002) tarafından geliştirilmiş olan primer çiftleriyle teşhis edilememesi elde edilen izolatların Almanya DZMS'de bulunan ASPV izolatlarıyla yakın ilişkili olabileceği veya Kundu (2002) tarafından geliştirilen primer çiftlerinin performansının düşük olabileceği kanaatine varılmıştır. ASPV izolatlarının CP gen bölgesindeki genetik benzerlik oranlarının ASGV'ye oranla düşük olması sentezlenen primer çiftlerinin farklı izolatlarda çalışmaması sonucunu doğurabilmektedir.

Gang ve ark (2008) letent elma virüslerinde bu durumun özellikle konvansiyonel RT-PCR çalışmalarında görülebileceğini bunun bitkide bulunan bazı inhibitörlerin olabileceğini bildirmiştir. Bu sorunun internal kontrol kullanılan multiplex RT-PCR yöntemiyle aşılabileceğini bildirmiştir. Bitkiye ait mitokondriyal *nad5* gen bölgesini çoğaltan bu kontrolün birden fazla primer çifti ile kullanılması



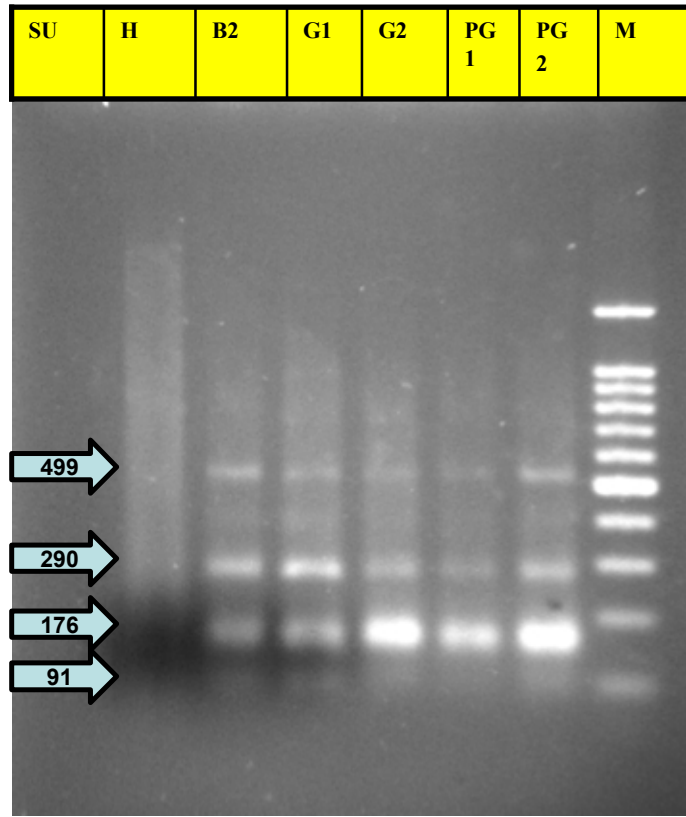
Şekil 4.62. ASGV-2/ASGV-U 499 bp. (James (1999) primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonucu elde edilmiş ASGV jell profilleri. **M**:Markır, **PG2** ve **PG1** (ASPV+ASGV) karışık enfeksiyon, **G1** ve **G2** ASGV tek enfeksiyon, **B2** pozitif kontrol, **H**:negatif kontrol.

4.4.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfizim) Çalışmaları

RFLP çalışmaları, karakterizasyon amacıyla seçilen (Çizelge 4.17) izolatlarla ve Çizelge 3.5'te belirtilen enzimler kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla firma (Fermantase) önerileri de dikkate alınarak RT-PCR sonucu elde edilen DNA ürünleri metoduna uygun olarak enzimlerle muamele edilmiştir. Kundu, (2002) tarafından önerilen metotla elde edilen ASPV DNA'larında RFLP amacıyla kullanılan (Hind II, Hind III, EcoRI, RsaI, AluI ve PstI) enzimlere karşı herhangi spesifik bir reaksiyon belirlenememiştir. Konuyla ilgili yapılan literatür araştırmasında bu amaçla yapılmış başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu konuda özellikle elde edilen DNA uzunluğunun 264 bp gibi küçük olması ve enzimlerin bu gen bölgesinde birçok yerde kesme yapması sonucu bantların çok kısa olabileceği ve bu nedenle RFLP çalışmalarında herhangi bir görüntü elde edilemediği düşünülmektedir.

ASGV izolatları için yapılan RFLP çalışmaları neticesinde yine Kundu (2002), tarafından önerilen metotla elde edilen ASGV DNA bantlarının HindII ve

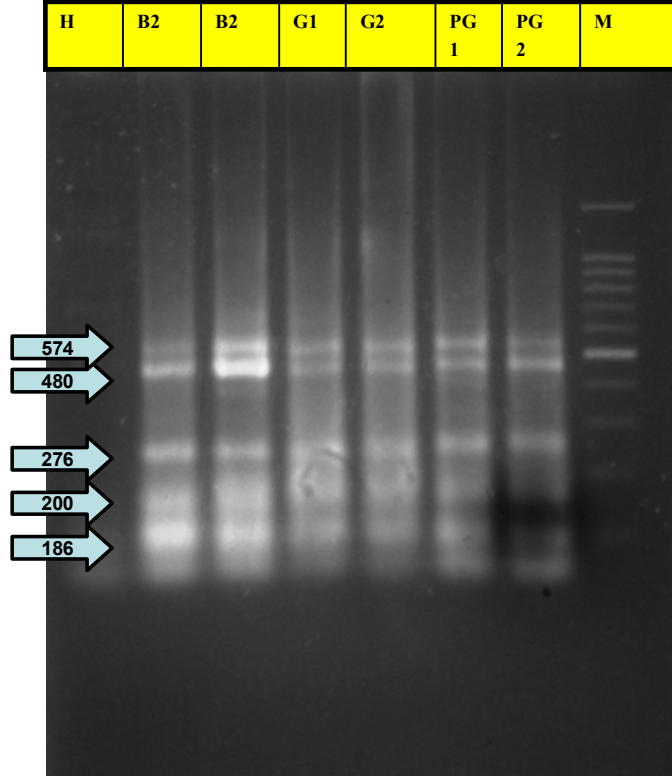
HindIII enzimleri tarafından kesildiği gözlenmiştir. ASGV bantları bu iki enzimin dışında başka bir enzim tarafından kesilmemiştir. Şekil 4.63’de görüldüğü üzere ASGV bantları Hind III tarafından 3 farklı noktadan kesilerek 91, 176 ve 290 bp bantlar halinde ayrılmışlardır. Fakat yapılan RFLP çalışmasında kullanılan izolatların tamamı aynı noktadan kesilmiş olup bu açıdan aralarında herhangi bir fark gözlenememiştir.



Şekil 4.63. ASGV-2/ASGV-U 499 bp. RT-PCR ürünün HindIII ile kesilmiş DNA profilleri. **M**:Markır, **PG2** ve **PG1** (ASPV+ASGV) karışık enfeksiyon, **G1** ve **G2** ASGV tek enfeksiyon, **B2** pozitif kontrol, **H**:negatif kontrol, **SU** kontrol.

ASGV izolatlarının HindII tarafından kesilmiş DNA profilleri Şekil 4.64’te verilmiştir. Bu çalışmada ASGV/4F ve ASGV/4R (Kummert ve ark. 1998) primerleri ile çoğaltılmış 574 bp.uzunluğundaki DNA bantlarının HindII tarafından 480, 276, 200 ve 186 bp’lik 4 band verecek şekilde farklı noktalardan kesildiği görülmektedir. Fakat bu enzim, çalışmada kullanılan bütün ASGV izolatlarını aynı noktadan

kesmiştir. Dolayısıyla çalışma boyunca karakterizasyon amacıyla kullanılan izolatların birbiriyle moleküler anlamda oldukça yakın olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.64. ASGV/4F ve ASGV/4R 574 bp. (Kummert ve ark. 1998). RT-PCR ürünün Hind II ile kesilmiş DNA profilleri. **M:**Markır, **PG2** ve **PG1** (ASPV+ASGV) karışık enfeksiyon, **G1** ve **G2** ASGV tek enfeksiyon, **B2** pozitif kontrol, **H:**negatif kontrol.

RFLP çalışmaları neticesinde RT-PCR sonucu elde edilen 499 bp'lik ASGV gen bölgesi HindIII tarafından üç kısımdan kesildiği, fakat 574 bp olarak çoğaltılan gen bölgesinin ise HindII tarafından 4 farklı noktadan kesildiği görülmüştür.

Bu çalışma sonucunda; elma ve armut izolatlarının aynı olduğu, bütün izolatların iki farklı enzimle aynı noktalardan kesilerek bir gruba girdiği sonucuna varılmıştır.

ASGV moleküler karakterizasyonu amacıyla ilk dönem yapılan çalışmalar

neticesinde SSCP analizleri sonucu ASGV izolatlarının 2 veya 4 gruba girdiği belirlenmiştir. Bu farklılıkları gösteren izolatların aynı ağaçta bulanabildiği fakat yoğunluklarının örneklerin alındığı yaprak ve dallara göre değiştiği bildirilmiştir (Magome ve ark, 1999). RFLP çalışmalarında kullanılan diğer enzimler çoğaltılan bu gen bölgelerini spesifik olarak kesmemiştir. Bu çalışma ASGV genomunda bazı farklılıklar olmasına rağmen büyük ölçüde homojen olduğunu göstermektedir. Vera ve ark. (1998) Avrupa'dan elde edilmiş ASGV izolatlarını bu çalışmada da kullanılan 4F ve 4R (574 bp) primerleri ile kısmı bir gen bölgesini RT-PCR ile çoğaltmış elde ettiği gen bölgesinin sekans analizlerini yapmıştır. 4F ve 4R primerleri kullanılarak elde edilen bu gen bölgeleri kendi içinde %98-100 oranında homoloji gösterirken Japonya'dan elde edilmiş ASGV ırklarıyla karşılaştırılığında ancak %80-85 oranında benzerlik göstermiştir. Bu çalışmayla elde edilen sonuçlara göre ülkemizde mevcut ASGV izolatları kendi aralarında Avrupa izolatlarına benzer şekilde yakınlık göstermiştir. Ülkemizde ithali yapılan elma ve armut çeşitlerinin çoğunlukla Avrupa'dan ithal edildiği düşünüldüğünde mevcut ASGV izolatlarının Avrupa izolatlarıyla bu karakter açısından uyumu doğal görünmektedir.

Magome ve ark. (1997), tarafından CTLV ile diğer ASGV ırkları arasındaki farkları ortaya koymak amacıyla, serolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda ASGV'nin turunçgil ırkı olarak bilinen CTLV'nin moleküler ve serolojik olarak farklılık göstermediği, fakat biyolojik özellikleri açısından fark gösterdiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada CP gen bölgesine ait sekans analizleri sonucunda ASGV için filogenetik gruplar oluşturulmuştur. Fakat bu gruplara konukçusundan bağımsız şekilde değişik turunçgil, elma ve armut izolatları girmiştir.

ASPV ve ASGV'nin moleküler karakterizasyonu üzerine Çek Cumhuriyeti'nde yapılan sekans ve filogenetik amaçlı çalışmalarda ASPV izolatlarının %100'e yakın seviyede homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. Buna karşın ASGV izolatlarının ise %94 ve %100 oranında homoloji gösterdikleri ve mevcut izolatların iki farklı grupta toplandığı belirlenmiştir (Kundu, 2008). Avustralya da yapılan benzer bir çalışmada ASPV izolatları arasında %98 homoloji

bulunurken ASGV izolatları arasındaki homoloji %90 olarak belirlenmiştir (Rodoni ve Constable, 2008). Latent hastalık etmenlerinin teşhisinde olduğu gibi karakterizasyonunda da mutlaka biyolojik test yöntemleri kullanılmalıdır. Özellikle sertifikasyon çalışmalarında biyolojik indeksleme yöntemi moleküler yöntemlerle kombine edilmelidir (Rodoni ve Constable, 2008). Ülkemizin üyesi bulunduğu EPPO tarafından hazırlanmış olan PM 4-27 nolu yumuşak çekirdekli sertifikasyon protokolünde de bu hastalıkların kesinlikle biyolojik indeksleme metodu ile teşhis edilmesi önerilmektedir (EPPO, 2009).

RT-PCR çalışmaları 264 bp'lik ASPV gen bölgesi ile yapılan RFLP çalışmalarında ise elde edilen gen bölgesinin herhangi bir enzimle kesilmediği ortaya konmuştur. ASPV genomunun yapılan çalışmalarda ASGV'ye oranla daha homojen olduğu önceki çalışmalarda ortaya konmuş olup bu çalışma sonucunda ülkemizdeki ASPV etmeninin de benzer özellikler taşıdığı belirlenmiştir.

4.5. Bazı Elma Çeşitlerinin ASPV ve ASGV Hastalık Etmenlerine Karşı Reaksiyonlarının Ölçülmesi

Bu çalışma ASPV ve ASGV hastalıklarının ülkemiz için önemli bir meyvecilik kolu olan elma yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan elma çeşitlerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmalar 2006, 2007 ve 2008 yılında yürütülmüş olup denemenin değerlendirilmesine esas gözlemler Aralık 2008 tarihinde yapılmıştır. Çeşit reaksiyon denemesinin değerlendirilmesi amacıyla inokule edilen fidanlardan sekiz farklı karakter açısından veriler alınmıştır. Bu sekiz karakterin altısı morfolojik (Gövde çapı, ağaç boyu, dal sayısı, toplam dal uzunluğu, ortalama dal uzunluğu, ortalama dal açısı), ikisi ise fiziksel karakterdir (Yaprak kuru ağırlığı, odun dokusu kuru ağırlığı).

Bu deneme sonucunda elde edilen veriler SPPS istatistik programında işlenerek değerlendirilmiştir. Denemede kontrol edilen karakterlere ait elde edilen verilerin ortalamaları Çizelge 4.21'de, ham veriler ve standart hataları ise EK 5'te verilmiştir.

Çizelge 4.21. Çeşit reaksiyon denemesinde elde edilen verilerin ortalaması.

Karakterler		Ölçülen Parametrelerin Ortalaması							
1. Çeşitler	2. Virüsler	Gövde çapı (mm)	Ağaç boyu (mm)	Dal sayısı (adet)	Top. dal uz. (mm)	Ort. dal Uz. (mm)	Dal açısı (A ⁰)	Odun kur. ağırl. (gr)	Yap kur. ağırl. (gr)
Jersey Mac	ASGV	15,34	150,25	12,00	274,25	24,27	55,50	5,81	4,15
	ASPV	15,47	163,50	12,50	302,25	24,55	52,00	5,85	3,90
	Kontrol	18,95	140,50	10,50	245,00	23,80	44,00	5,94	4,01
Golden	ASGV	16,39	181,50	15,25	678,75	45,55	64,50	5,81	4,03
	ASPV	16,10	190,00	13,50	633,25	49,50	61,50	5,66	3,90
	Kontrol	21,05	188,00	13,50	593,50	44,65	47,00	5,90	4,13
Summer Red	ASGV	14,68	172,25	9,25	408,75	46,56	71,25	5,92	3,85
	ASPV	14,28	173,00	11,00	382,50	39,52	63,00	5,87	3,86
	Kontrol	16,40	193,50	15,50	316,50	20,53	48,50	5,99	3,78
Granny Smith	ASGV	13,38	191,50	9,75	380,50	41,81	61,00	5,87	4,27
	ASPV	14,23	198,25	9,00	298,25	36,56	60,25	5,86	4,22
	Kontrol	18,67	159,00	12,50	359,50	16,96	45,50	5,94	4,44
Fuji	ASGV	15,85	159,35	15,00	503,00	33,72	60,75	5,95	4,39
	ASPV	14,60	173,00	13,33	485,66	35,90	59,66	5,88	4,04
	Kontrol	17,66	161,50	16,00	589,00	36,81	45,50	5,98	4,37
Starking	ASGV	14,41	119,50	19,00	118,50	6,35	50,00	6,05	4,36
	ASPV	15,13	118,25	12,50	165,50	13,83	49,00	5,96	4,16
	Kontrol	17,13	119,50	11,50	103,50	9,00	47,00	6,16	4,57
Vista Bella	ASGV	14,72	160,75	12,00	301,50	25,25	66,25	5,97	4,14
	ASPV	15,13	175,00	10,00	320,25	32,32	70,00	6,04	4,12
	Kontrol	17,44	180,50	9,00	394,50	44,35	49,50	6,09	4,41
Galaxy Gala	ASGV	14,57	175,00	17,25	482,75	28,20	63,00	5,84	4,20
	ASPV	14,45	190,00	18,50	591,50	32,07	63,25	5,72	4,16
	Kontrol	16,60	169,50	15,50	495,00	32,25	49,00	5,91	4,29
Ort.	ASGV	14,92	163,75	13,68	393,50	31,46	61,53	5,90	4,17
	ASPV	14,93	172,61	12,51	394,54	32,88	59,83	5,85	4,04
	Kontrol	17,99	164,00	13,00	387,06	28,54	47,00	5,99	4,25

4.5.1. Morfolojik Karakterlerle İlgili Sonuçlar

Gövde çapı;

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkiler iki yıllık vejetasyon sonunda aşu noktasının 2 cm üstünden dijital kumpasla ölçülerek gövde çapları belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucu elde edilen veriler SPSS istatistik programında değerlendirilmiştir. Gövde çapı varyans analiz sonuçları Çizelge 4.22’de verilmektedir. İstatistik analizleri sonucunda %5 güven aralığında ASPV ve ASGV virüs etmenlerinin elma çeşitlerinde kontrole göre istatistikî açıdan önemli oranda

gövde çapında daralmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkları gösteren grafik Şekil 4.65'te verilmiştir. Grafikten anlaşılacağı üzere Golden ve Granny Smith elma çeşitlerinde diğer çeşitlere oranla her iki virüsten de daha çok etkilenmiştir. ASPV ve ASGV virüslerinin gövde çapına etkileri arasında istatistikî açıdan bir farka rastlanmamıştır. Her iki etmen de elma bitkilerinde ortalama %17,1 oranında gövde çapında daralmaya neden olmuştur. Fakat EK.5.2'de verilen çizelgeden anlaşılacağı üzere virüs enfeksiyonundan en yüksek %23,1 ile Golden çeşidi etkilenirken, en düşük oranda ise %10,5 ile Summer Red elma çeşidi etkilenmiştir.

Çizelge 4. 22. Gövde çapı için varyans analiz tablosu

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	6,206	0,000
Virüsler	2	50,512	0,000
Virüs x çeşit	14	1,334	0,218
Hata	55		

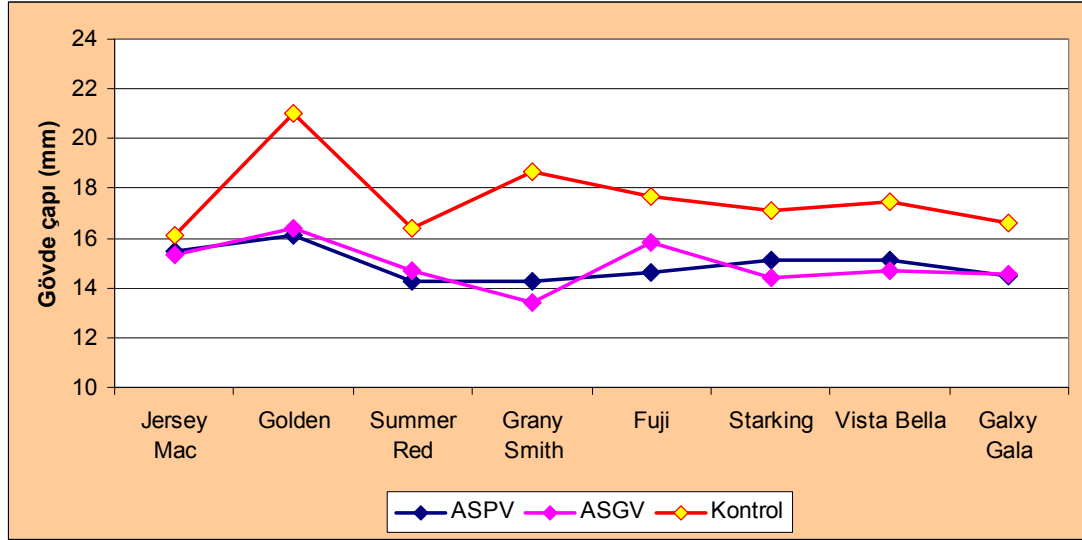
P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Varyans analizi tablosunda P önem değerine göre önemli bulunan virüsler için Duncan testi yapılmış ve Çizelge 4.23'ten de anlaşılacağı üzere virüslerin denemedeki elma çeşitlerine olan etkisinin aynı olduğu ve (a) grubuna girdikleri, negatif kontrol bitkilerinin ise (b) grubuna girdikleri görülmüştür.

Çizelge 4.23. Gövde çapı için yapılan Duncan testi.

Karakterler	Tekerrür sayısı	Ortalama gövde çapı (mm) ± SH
ASGV	32	14,92±0,22 a
ASPV	31	14,94± 0,19 a
Kontrol	16	17,99±0,45 b



Şekil 4.65. Çeşit reaksiyon denemesinde virüslerin gövde çapına etkileri.

Yapılan bu araştırmada ASPV ve ASGV virüslerinin gövde çapı üzerinde etkili olduğu, ayrıca ASPV'nin Granny Smith çeşidinde floem nekrozuna, ASGV'nin ise Starking çeşidinde dal şişkinliklerine neden olduğu gözlenmiştir.

Huniuda ve ark. (1983), Japonya'da bu konudaki en kapsamlı çalışmalardan birini yapmışlardır. Bu çalışmada Japonya'da yetiştirilen yerli 8 ticari elma çeşidi ve 7 farklı elma anacına ACLSV ve ASPV inokule ederek iki yıl süreyle gözlenmiştir. Denemede ağaç boyu, dal uzunluğu ve gövde çapı ölçülerek mümkün olan etkileri değerlendirilmiştir. Bu denemede ASPV'nin iki yılın sonunda anaçlarda önemli bir etkiye neden olmadığı, fakat çeşitlerin gövde çapında daralmalara yol açtığı, ayrıca bazı çeşitlerin boyunda kısalmalara neden olduğu tespit edilmiş ve ASPV'nin *Malus robusta* ve *Malus arnoldiana* üzerinde "stem pitting" belirtisi oluşturduğunu da bildirmişlerdir.

ABD'de yapılan bir araştırmada ACLSV, ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucunda özellikle Fuji ve Yataka elma çeşitlerinde gövde çapında sağlıklı olanlara oranla bir daralma gözleendiği rapor edilmiştir (Howell ve ark. 2002). Bu konuda yapılan en önemli çalışmalarından biri de ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının elma çeşitleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Maxim ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmadır. Eski Yugoslavya'da yapılan bu çalışmada ASGV'nin 2 yaşlı 14 farklı elma çeşidindeki etkileri ölçülmüş ve ASGV'nin gövde çapında ortalama

%13,7 oranında daralmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda verilen literatür bilgileri, bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerle benzerlik arz etmektedir. Yapılan bu araştırma çalışmaları ile latent olarak kabul edilen virüs hastalıklarının, çalışmanın yapıldığı çeşitlere veya ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte, değişen oranlarda konukçu bitkiler üzerinde etkili oldukları ortaya konmuştur.

Ağaç boyu;

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin toprak seviyesinden itibaren tepe noktasına kadar olan uzunluğu ölçülmüş, ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının bitki boyuna olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilerle yapılan varyans analiz testinde Çizelge 4.24'te görüldüğü gibi virüs hastalıklarının bitki boyları üzerinde iki yıllık vejetasyon süresi sonunda istatistikî olarak önemli bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Varyans analiz tablosunda çeşitler için elde edilen P değeri 0,000 olarak bulunmuştur. Bu değer çeşitler arasında boy farkı olduğunu gösterirken, virüsler ve virüs çeşit interaksyonu için elde edilen sıfırdan büyük P değerleri bu karakterlerin ağaç boyuna etki etmediğini ifade etmektedir. Ağaç boyu analizlerinde kullanılan ölçüm değerleri ve standart sapmaları EK.5.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. Ağaç boyu ölçümlerine ait varyans analiz tablosu

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	12,650	0,000
Virüsler	2	2,044	0,139
Virüs x çeşit	14	0,824	0,641
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının elma çeşitleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Maxim ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada ASGV'nin 2 yaşlı 14 farklı elma çeşidindeki etkileri ölçülmüş bu çalışmada Golden Delicious gibi bazı elma çeşitlerinde ağaç boyunun kısaldığı gözlenirken, James Grieve gibi bazı çeşitlerde ise önemli sayılacak bir etki tespit edilememiştir.

Dal sayısı;

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin ana gövdeleri üzerinden çıkan bütün dallar sayılarak ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının dal sayısına olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan sayımlar sonunda virüslerin denemede kullanılan elma çeşitlerinin dal sayısına olan etkisi, varyans analiz tablosunda virüsler ve virüs çeşit interaksiyonuna ait P değerlerinin sıfırdan büyük olarak hesaplanmasından dolayı etkisiz bulunmuştur. Yapılan sayımlara göre EK 5.4'te görüldüğü üzere ASGV ile enfekteli bitkilerde ortalama dal sayısı 13,68 çıkarken ASPV ile enfekteli bitkilerde ortalama dal sayısı 12,54 kontrol bitkilerinde ise ortalama dal sayısı 13,00 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre yapılan varyans analiz testinde Çizelge 4.25'te görüldüğü gibi hastalık etmenlerinin çeşitler üzerindeki etkisi istatistiki olarak önemsiz kabul edilmiştir.

Çizelge 4.25. Dal sayısı ölçümlerine ait varyans analiz tablosu

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	5,727	0,000
Virüsler	2	1,179	0,315
Virüs x çeşit	14	1,711	0,080
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Bu çalışmada ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının elma çeşitlerinin dal sayısı üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Bu konuda yumuşak çekirdekli meyvelerde daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat Jones (1980) ahududu üzerine yaptığı çalışmada Raspberry Bushy Dwarf (RBDV) ve Black Raspberry Necrosis (BRNV) virüs hastalıklarının ahududu dal sayısını azalttığını bildirmiştir. ASPV ve ASGV'nin ağaçlarda dal sayısı üzerine önemli bir etkisinin olmayacağı düşünülmekle birlikte bu yargının test edilmesi amacıyla daha uzun süreli denemeler kurulması gerektiği kanınca varılmıştır.

Toplam dal uzunluğu;

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin ana gövdeleri üzerinden çıkan bütün dallar ölçülerek ASPV ve ASGV hastalıklarının toplam dal uzunluğuna olan

etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan ölçümler sonucu virüslerin denemede kullanılan elma çeşitlerindeki dal uzunluğuna etkisi P değerinin sıfırdan farklı çıkmasından dolayı istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.26). Varyans analiz tablosundan anlaşılacağı üzere çeşitler arasında toplam dal uzunluğu açısından fark bulunmuş fakat bu farkların çeşitlerin kendi karakteristik özelliklerinde kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Toplam dal uzunluklarına ait ortalamalar ve standart hatalar EK 5.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.26. Toplam dal uzunluğuna ait varyans analiz tablosu.

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	19,123	0,000
Virüsler	2	0,046	0,955
Virüs x çeşit	14	0,576	0,872
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Çalışmada ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının elma çeşitlerinin dal uzunluğu üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Konuyla ilgili yumuşak çekirdekli meyvelerde daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla beraber Jones (1980), tarafından yapılan bir araştırmada Raspberry Bushy Dwarf (RBDV) ve Black Raspberry Necrosis (BRNV) hastalıklarının ahududunda dal uzunluğunu azalttığını bildirmiştir. ASPV ve ASGV'nin birlikte enfeksiyonu sonucunda dal uzunluğunu etkileyeceği düşünülmektedir. Bu yargının test edilmesi amacıyla daha uzun süreli denemeler kurulması bu sonuçların anlam kazanması açısından önemlidir.

Ortalama Dal uzunluğu;

Çeşit reaksiyon denemesinde yar alan bitkilerin dal boylarının ölçümü sonucu elde edilen toplam dal uzunlukları her bitkide tespit edilen dal sayısına bölünerek ortalama dal uzunluğu elde edilmiş ve bu veriler varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalama dal uzunluğuna ASPV veya ASGV hastalık etmenlerinin istatistiki olarak önemli sayılabilecek bir etkisi görülmemiştir (Çizelge 4.27). Ortalama dal uzunluğu ölçümleri sonucu elde edilen veriler EK5.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.27. Ortalama dal uzunluğuna ait varyans analiz tablosu

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	10,226	0,000
Virüsler	2	1,043	0,359
Virüs x çeşit	14	1,617	0,104
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Ortalama Dal açısı;

Çeşit reaksiyon denemesinde yer alan bitkilerin ana dallarının gövdeye yaptıkları açılar ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır. Bu ortalamalar üzerinden yapılan varyans analiz testi sonucunda (Çizelge 4.28) çeşitler, virüsler ve virüs x çeşit interaksiyonu P değerinin sıfır olmasından dolayı önemli bulunmuştur. En yüksek etkilenme oranı % 48,33 dal açısı genişlemesi ile Summer Red /ASGV karakterinde tespit edilmiştir. En düşük ise % 4,10 ile Starking/ASPV karakterinde görülmüştür. Bu konuda yapılan ölçümler sonucu elde edilen detaylı bilgiler EK5.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Dal açısı için varyans analiz tablosu

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	16,235	0,000
Virüsler	2	101,048	0,000
Virüs x çeşit	14	2,859	0,003
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Varyans analizi sonucu virüslerin etkili kabul edilmesinden sonra yapılan Duncan testi sonucu Çizelge 4.29’da görüleceği üzere ASPV biraz daha etkili olsa da ASGV ile aynı gruba (a) girerken, kontrol bitkileri farklı bir grup (b) oluşturmuştur.

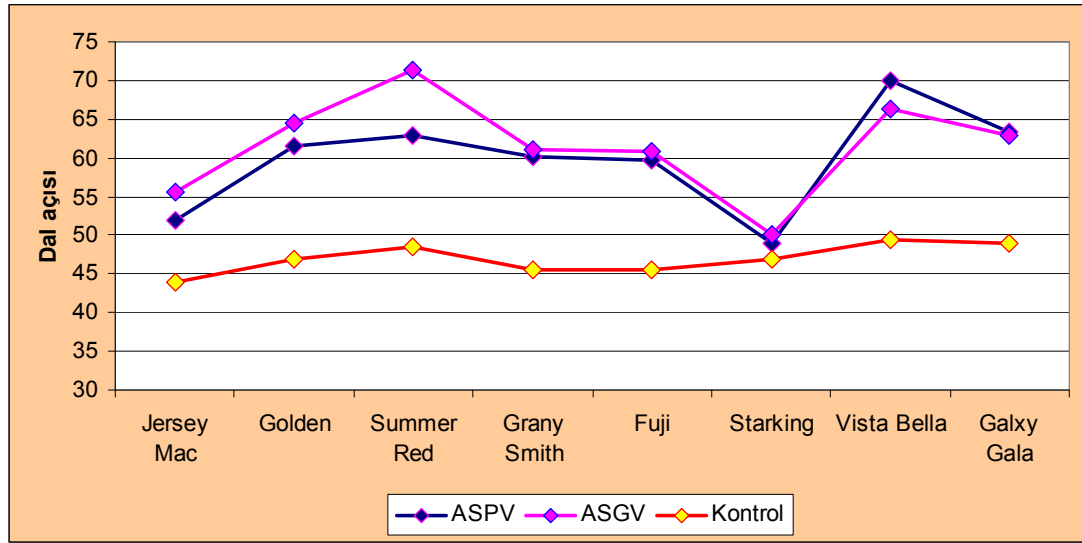
Çizelge 4.29. Dal açısına virüslerin etkisinin farkı için yapılan Duncan testi

Karakterler	Tekerrür sayısı	Ortalama dal açısı (A°) ± SH
ASGV	32	61,53±1,24 a
ASPV	31	59,83± 1,27 a
Kontrol	16	47,00±0,61 b

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Virüs hastalık etmenlerinin elma çeşitlerini farklı düzeyde etkilenmelerinden dolayı, çeşitlerin ortalama dal açıları üzerinde yapılan Duncan testi sonucu, çeşitler farklı gruplara girmiştir. Şekil 4.66. ve Çizelge 4.30'den anlaşılacağı üzere en çok etkilenen Summer Red ve Vista Bella elma çeşitleri olmuştur. Starking çeşidi ise virüslerden en az düzeyde etkilenmiş ve kontrolle aynı gruba (a) girmiştir, fakat düşük düzeyde de olsa, dal açılması görüldüğünden Starking/ASGV b ve c grubuna da girmiştir. Deneme sonucunda yapılan analizlerden çeşitlerin büyük çoğunluğunun b ve e grubuna girdiği görülmüştür. Çeşitlerin ASPV veya ASGV ile enfekteli olmaları gruplamayı değiştirmiş ve ASGV çeşitler üzerinde daha fazla dal açısı genişlemesine neden olmuştur. Yalnızca Vista Bella çeşidinde ASPV, ASGV'den daha fazla bir dal açılmasına neden olmuştur



Şekil 4.66. ASPV ve ASGV'nin çeşitler üzerindeki dal açısına etkisi.

Denemede yer elma çeşitlerinde ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu %29,16 oranında dal açısında genişlemeye neden olduğu, bu oranın ASGV bulaşık ağaçlarda %31,91, ASPV bulaşık ağaçlarda ise %27,29 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.30. Çeşitlerin dal açısı için yapılan Duncan testi sonuçları.

Karakter	a	b	C	d	e	f	g
Jerseymac Kontrol	44,0±0,00 (a)						
Granny S. Kontrol	45,5±0,49 (a)	45,5±0,49 (ab)					
Fuji Kontrol	45,5±1,50 (a)	45,5±1,50 (ab)					
Golden Kontrol	47,0±3,00 (a)	47,0±3,00 (ab)					
Starking Kontrol	47,0±0,00 (a)	47,0±0,00 (ab)					
Summer. R Kontrol	48,5±0,49 (a)	48,5±0,49 (ab)					
Starking ASPV	49,0±0,70 (a)	49,0±0,70 (ab)					
Galaxy G. Kontrol	49,5±1,00 (a)	49,5±1,00 (ab)					
Vista B. Kontrol	49,5±2,50 (a)	49,5±2,50 (ab)	49,5±2,50 (abc)				
Starking ASGV	50,0±0,40 (a)	50,0±0,40 (ab)	50,0±0,40 (abc)				
Jerseymac ASPV		52,0±3,62 (b)	52,0±3,62 (bc)				
Jerseymac ASGV			55,5±3,77 (c)	55,5±3,77 (cd)			
Fuji ASPV				59,6±1,45 (d)	59,6±1,45 (de)		
Granny S. ASPV				60,2±2,05 (d)	60,2±2,05 (de)		
Fuji ASGV				60,7±0,47 (d)	60,7±0,47 (de)		
Granny S. ASGV				61,0±0,57 (d)	61,0±0,57 (de)		
Golden ASPV				61,5±1,19 (d)	61,5±1,19 (de)		
Summer R ASPV					63,0±1,08 (e)		
Galaxy G. ASGV					63,0±1,47 (e)		
Galaxy G. ASPV					63,2±1,10 (e)		
Golden ASGV					64,5±2,46 (e)	64,5±2,46 (eg)	
Vista B. ASGV					66,2±2,28 (e)	66,2±2,28 (eg)	66,2±2,28 (gf)
Vista B. ASPV						70,0±0,81 (g)	70,0±0,81 (gf)
Summer R. ASGV							71,2±0,47 (f)

Yumuşak çekirdekli meyvelerde virüs hastalıklarının dal açısı üzerine olan etkisi konusunda yeterince bilimsel veri bulunmamaktadır. Ahman (1995), tarafından İsveç'te yapılan bir çalışmada Skane anacı üzerine aşılı Lobo elma çeşidinin latent virüslerin enfeksiyonu sonucunda dal açılarında bir genişlemeye neden olduğunu rapor etmiştir. Yaptığımız bu çalışmada ASPV ve ASGV'nin elmada dalların gövde ile yaptığı açının genişliğini etkilediği belirlenmiştir. Fakat bu durumun ilerleyen yıllarda nasıl devam edeceği ve dal açılmasının verim ve meyve kalitesi üzerine olan etkisi önemli bir araştırma konusu olduğu ve çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

4.5.2. Fiziksel Karakterlerle İlgili Sonuçlar

Yaprak kuru ağırlığı;

Denemede yer alan bitkilerden tesadüfi olarak alınan yaprak örnekleri üzerinden yapılan kuru ağırlık çalışması sonucunda, Çizelge 4.31'den ve EK 5.8'den anlaşılacağı üzere ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin yaprak kuru ağırlığına istatistiki olarak önemli bir etkiside bulunmadığı ortaya konmuştur.

Çizelge 4.31. Yaprak kuru ağırlığı varyans analiz tablosu.

Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	5,023	0,008
Virüsler	2	5,641	0,084
Virüs x çeşit	14	0,416	0,991
Hata	55		

P: Önem değeri

F: Hesap değeri

Odun dokusu kuru ağırlığı

Denemede yer alan bitkilerin dallarından kabuk dokusu sıyrılarak elde edilen odun dokusu kuru ağırlığına ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının etkisi varyans analizinde istatistiki olarak önemli bulunmuş olup, çeşitlerde virüslerden farklı oranlarda etkilenmiştir (Çizelge 4.32). Varyans analiz tablosunda virüslere ait 0,006 P değeri %5 hassasiyet derecesi için istenen 0,05 değerinden küçük olduğundan virüslerin bitki odun dokusu kuru ağırlığına etki ettikleri sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.32. Odun dokusu kuru ağırlığı için varyans analiz tablosu.

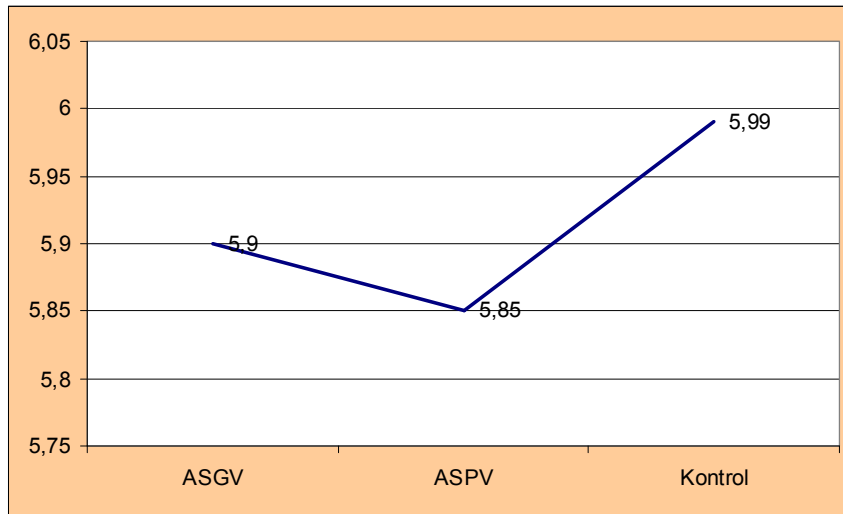
Karakterler	Serbestlik derecesi	F değeri	P
Çeşitler	7	5,023	0,000
Virüsler	2	5,641	0,006
Virüs x çeşit	14	0,416	0,963
Hata	55		

P: Önem değeri, F: Hesap değeri

Virüs hastalıklarının odun dokusu kuru ağırlığına olan etkisi belirlendikten sonra yapılan Duncan testi sonucu Çizelge 4.33'te görüldüğü üzere ASPV'nin odun dokusu kuru ağırlığını daha yüksek oranda düşürdüğü belirlenmiştir. Denemede yer alan kontrol bitkilerinin ortalama odun dokusu kuru ağırlığı 5,75 gr, ASPV ile enfekteli bitkilerin 5,85 ve ASGV enfekteli bitkilerin ortalaması 5,90 gr olarak belirlenmiştir. Buna göre ASPV %2,33, ASGV ise %1,50 oranında odun dokusu kuru ağırlığını azaltmıştır (Şekil 4.67). Çeşitlere ait ortalama ve standart hata değerleri EK 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.33. Odun kuru ağırlığında virüsler için yapılan Duncan testi.

Karakterler	N. tekerrür sayısı	Ortalama odun dokusu kuru ağırlığı (gr)
ASPV	31	5,85±0,025a
ASGV	32	5,90±0,028ab
Kontrol	16	5,99±0,017b

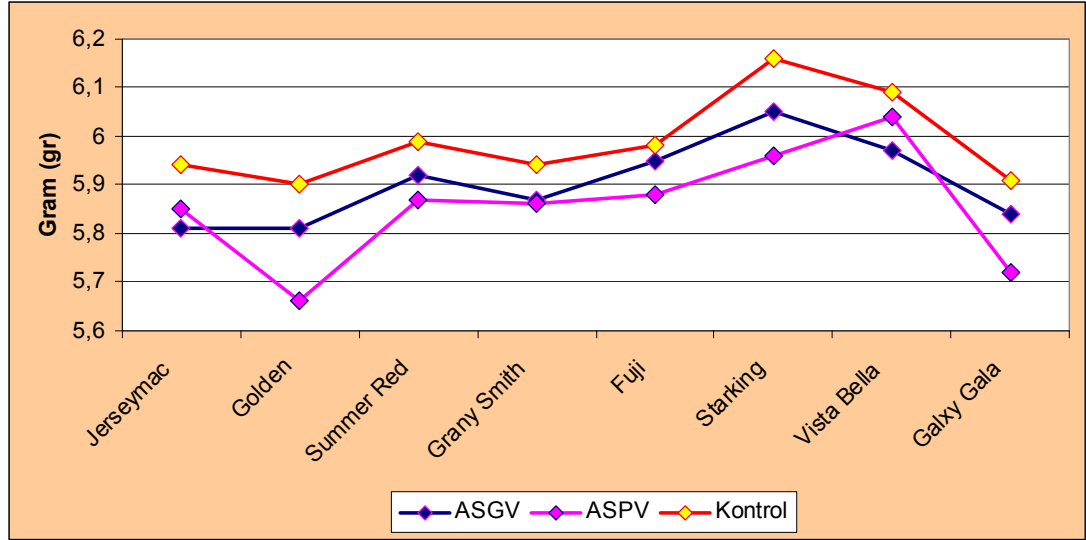
**Şekil 4.67.** Çeşit reaksiyon denemesinde virüslerin odun dokusu kuru ağırlığına olan etkisi.

Virüs enfeksiyonundan etkilenen bitkilerin nasıl bir dağılım gösterdiklerinin anlaşılması için çeşitler bazında Duncan testi yapılmıştır. Duncan testi sonucu oluşturulan dört farklı grupta, odun dokusu kuru ağırlığının azalması en çok Golden çeşidinde görülürken (a), Vista Bella ve Starking çeşitleri ise en az düzeyde (d) etkilenmiştir. Diğer çeşitler ise birbirine yakın gruplara girmişlerdir (Çizelge 4.34).

Çizelge 4.34. Çeşitlerde odun dokusu kuru ağırlığında oluşan değişikliklerin Duncan testine göre değerlendirilmesi.

Karakterler	Odun kuru ağırlık ortalaması (gr) + SH			
Golden	5,77±0,032(a)			
Galxy Gala	5,81±0,031(a)	5,81±0,031(ab)		
Jersey Mac	5,85±0,025(a)	5,85±0,025(ab)	5,85±0,025(abc)	
Grany Smith	5,88±0,075(a)	5,88±0,075(ab)	5,88±0,075(abc)	
Summer Red		5,91±0,033 (b)	5,91±0,033 (bc)	5,91±0,033(bcd)
Fuji			5,93±0,026 (c)	5,93±0,026(cd)
Vista Bela				6,02±0,043(d)
Starking				6,04±0,028(d)

Deneme bitkileri odun dokusu kuru ağırlıkları açısından karşılaştırıldığında, Şekil 4.73'te görüldüğü gibi virüsle enfekteli bütün bitkilerde bu değer kontrol bitkilerine göre düşük çıkmıştır. Vista Bella ve Jersey mac dışındaki bütün çeşitlerde ASPV, ASGV'ye oranla kuru madde ağırlığını daha fazla düşürmüştür. Yine Şekil 4.68'ten anlaşılacağı üzere Granny Smith çeşidi her iki virüsten eşit oranda etkilenmiştir. Fuji çeşidinin ASGV ile enfekteli bireyleri bu hastalık etmeninden fazlaca etkilenmemiş olup kontrol bitkilerine yakın bir değer vermişlerdir.



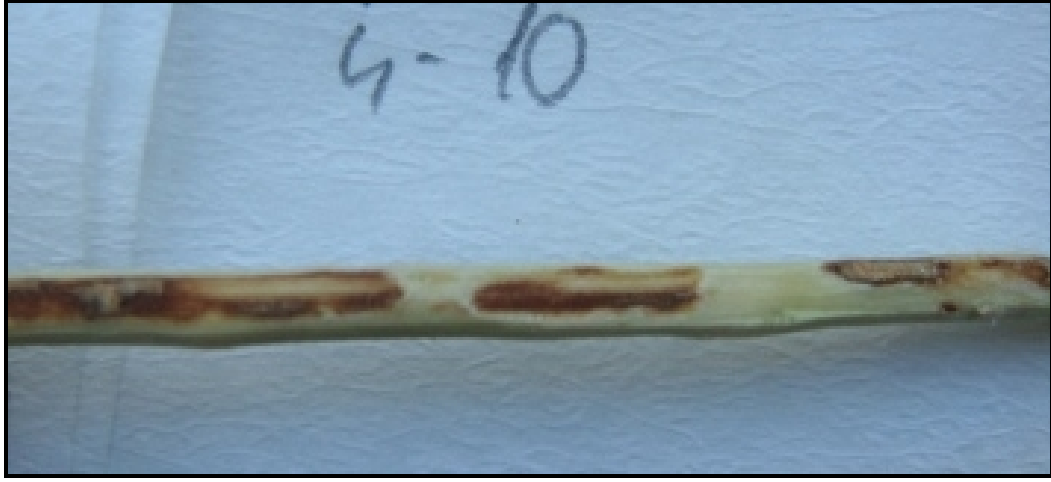
Şekil 4.68. ASPV ve ASGV'nin elma çeşitlerinin odun dokusu kuru ağırlığı üzerindeki etkisi.

Virüs hastalıklarının bitkilerin kuru ağırlıkları üzerine olan etkisi daha çok tek yıllık bitkilerde araştırılmıştır. Bu konuda yumuşak çekirdekli meyvelerde yapılmış özel herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Keeling, (1982) yılında yaptığı bir araştırmada Soya Mozaik Virüsünün (SMV) inokule edilmiş soya bitkilerinin kuru ağırlığında %38-59 oranında, toplam soya kök hacminde %18 oranında azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Manzanares ve ark. (1993) tarafından enginar bitkisinde yapılan araştırma çalışmasında bir ve birden fazla virüsle enfekteli bitkilerde kuru ve yaş ağırlığın önemli ölçüde azaldığı buna karşın % kuru madde oranının virüsle enfekteli bitkilerde daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada ise ASPV ve ASGV yapraklardaki % kuru madde oranına bir etkide bulunmazken, odun dokusundaki % kuru madde oranında ASPV'nin %2,33, ASGV'nin ise %1,50 oranında bir azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır. Bu azalmanın hastalık etmenlerinin daha çok odun dokusuna özelleşmesi ve ağacın beslenmesi üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Fakat bu ilişkinin tam olarak açıklanması için yeni araştırma çalışmalarına ihtiyaç vardır.

4.5.3. Çeşit Reaksiyon Denemesinde Yapılan Makroskobik Gözlemler

Çeşit reaksiyon denemesinde kullanılan bitkilerde yapılan ölçümler dışında bütün ağaçlar makroskobik olarak ta gözlenmiştir. Bu gözlemlerde ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu oluşan karakteristik belirtilerin bir çoğuna rastlanmıştır. Denemede yer alan 4 nolu Granny Smith çeşidinde Şekil 4.69’da görüldüğü gibi ASPV den kaynaklanan be bu etmene spsifik olan “sürgün nekrozları”nın oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil 7.69. Granny Smith çeşidine ait 10 nolu ağaçta ASPV enfeksiyonu sonucu meydana gelen sürgün nekrozu

Ayrıca denemedeki 6 nolu Starking elma çeşidinde ASGV enfeksiyonu sonucu bu hastalık etmeni için tipik belirti kabul edilen ve Şekil 4.70’te verilen sürgünlerde şişmeler (stem grooving) gözlenmiştir. Bu belirtiler, ASGV’nin indikatör bitki olan Virginia crab üzerinde de meydana getirdiği ve bu nedenle teşhise esas kabul edilen belirtilerdendir.

Çeşit reaksiyon denemesinde bu belirtilerin ortaya çıkması uygun ve yoğun inokulm verilmesi durumunda ticari çeşitlerin de ASPV ve ASGV’ye şiddetli tepikiler verebileceğini ve karakteristik belirtilerin ortaya çıkacağını ifade etmektedir. Japonya’da yapılan bir çeşit reaksiyon denemesinde de benzer şekilde ticari çeşitlerde stem pitting vb. belirtiler gözlenmiştir (Huniuda ve ark. 1983).



Şekil 4.70. Starking çeşidine ait 4 nolu ağaçta ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen sürgün şişkinliği (stem grooving) belirtisi.

Çeşit reaksiyon denemisinin önemli sonuçlarından biri de enfekteli ağaçlarda dal açılarının genişlemesi olmuştur. ASGV enfekteli Summer Red çeşidi bitkilerinde ortalama dal açısı 71.2° , kontrol bitkilerinde 48° olarak ölçülmüş ve %48,33 oranında bir dal açılması tespit edilmiştir (Şekil 4.71). Summer Red çeşidi yazlık bir çeşit olup denemdeki vejetasyon süresi en uzun olan çeşitlerden biridir, bu durumun bitkideki dal açısı genişlemesininin daha belirgin olmasına neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.71. Summer Red çeşidinde dal açılması.

Virüs enfeksiyonu sonucu odun dokusu kuru maddesinin azalması, dallarda yere doğru yatmalara neden olmuş ve bu nedenle daha fazla dal açısı genişlemesi gözlenmiştir. Denemede yer alan kontrol bitkilerinin ortalama dal açısı $47,00^{\circ}$ olarak ölçülmüş, buna karşın ASGV enfekteli bitkilerde bu değer $61,53^{\circ}$, ASPV enfekteli bitkilerde ise $59,83^{\circ}$ olarak tespit edilmiştir. Kontrol bitkisi olarak kullanılan sağlıklı Summer Red bitkilerinde normal gelişen dal açısı Şekil 4.72’de verildiği gibidir.



Şekil 4.72. Çeşit reaksiyon denemesindeki sağlıklı Summer Red kontrol bitkisinin dal açısı. ($48,5^{\circ}$ olarak ölçülmüştür.)

Virüs hastalıklarının bitkiler üzerindeki etkileri çeşit/anaç kombinasyonu ile yakın ilişkilidir. Yumuşak çekirdekli meyvelerde virüs hastalıklarının ticari çeşitlerde meydana getirdiği belirtilerin ve ekonomik zararın tespitine yönelik ilk çalışmalardan biri Hickey ve Sear (1975) tarafından Golden elma çeşidi üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada ACLSV ve ASPV’nin çöğür anaçları üzerine aşılı Golden çeşidinde gövde çapı, bitki bünyesindeki besin elementleri ve verim üzerine kayda değer bir etki yapmadığı rapor edilmiştir. Fakat geliştirilen yeni çeşit ve anaçların kullanıma sunulmasıyla birlikte bu çalışmalar devam etmiş ve virüs hastalıklarının anaç/çeşit kombinasyonuna bağlı olarak değişik oranlarda verim ve kalite kaybına neden olduğu belirlenmiştir.

Penrose ve ark. (1988) tarafından yapılan çalışmada üç farklı elma çeşidinin virüs ve fitoplazma ile enfekteli olan bireyleri virüsler açısından test edilmiş (virus tested) sertifikalı bireyleri bazı verim ve morfolojik ağaç kriterleri açısından karşılaştırılmıştır. Denemenin sonucunda Jonathan elma çeşidinde %56, Granny Smith'te %41 ve Richared Delicious çeşidinde ise virüs açısından test edilmiş materyale göre % 40 verim kaybı olduğunu gözlemişlerdir. Granny Smith ve Richared Delicious çeşitlerinin gövde çapları üçüncü yıldan itibaren enfekteli olanlardan daha fazla gelişirken, Jonathan çeşidinde bu fark dokuzuncu yılın sonunda gelişmiştir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada elma çeşitlerinin gövde çaplarında daralma olduğu belirlenmiş fakat çeşitlerin hastalık etmenlerinden etkilenme oranları yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde farklı çıkmıştır.

ABD'de ulusal meyve klon temizleme programı çerçevesinde yapılan bir araştırmada Fuji ve Yataka elma çeşitlerinde ACLSV, ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucu meydana gelen değişimler incelenmiştir. Howell ve ark. (2002), tarafından yapılan bu çalışmada, hastalık etmenlerinin meyvelerde erken olgunlaşmaya neden olduğu, enfekteli bitkilerin sağlıklılara oranla daha zayıf geliştiği ve gövde çapında sağlıklı olanlara oranla bir daralma gözlemlendiği, ayrıca ASPV ve ASGV enfeksiyonu sonucunda meyvelerdeki nişasta içeriğininin düştüğünü rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada hastalık etmenlerinin yaprak veya dallarda gözle görülebilecek bir renk değişimi veya bozulmaya neden olmadığı görülmüştür. Gella (1989) İspanya'da yaptığı bir çalışmada ASPV ve ASGV ile enfekteli Agua de Aranjues armut çeşidinin yalnızca ASPV'nin Pear Vein yellows (PVY) ırkı ile bulaştırıldığında şiddetli yaprak simptomsu verdiğini bunun dışında herhangi bir makroskobik belirti gözlemediğini rapor etmiştir. Fakat 5 yıllık denemenin sonunda kümülatif ürün miktarında düşüş olduğunu bildirmiştir. Fransa'da Lemoine ve Michelesi (1990) tarafından yapılan bir çalışmada PVY hastalık etmeni olan ASPV nin tek başına veya karışık enfeksiyon durumunda %10–15 oranında ağaçta bodurluk meydana getirdiği aynı zamanda %25–40 oranında verim kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar 14 yıl boyunca devam eden çalışmalarında armut çeşitlerinin bu hastalık etmeninden farklı düzeyde etkilendiklerini, Conferance armut çeşidinin Doyonne de Comice çeşidine oranla çok daha hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Dolayısıyla ülkemiz koşullarında da armut ve ayva çeşitleri bu hastalıklar açısından denenmeli ve hastalıkların verime olan etkileri araştırılmalıdır.

Ayrıca virüs hastalıklarının meyve rengi, içeriği, depo koşullarına dayanıklılığı ve meyve tadı üzerine olan etkileri de araştırma konusudur. Bu amaçla 1993 yılında ABD’de yapılan bir çalışmada Apple Green Crinkle Virüs hastalığının Granny Smith elma çeşidinde %22 oranında bodurluk, kabuk renginde koyulaşma, nem oranında düşme ve soğuk hava deposunda sağlıklı meyvelere oranla %30 oranından fazla kayba neden olduğu belirlenmiştir (Fridlund, 1987). Fakat ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının yumuşak çekirdekli meyveler üzerindeki bu etkilerine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Ülkemizde meyve yetiştiriciliğinin ihracata yönelik olması ve gelişen pazar talepleri meyvecilikte çeşit değişikliğine olan talebi artırmakta ve hızlandırmaktadır. Çeşit değişikliğinin mevcut ağaçlarda aşılama usulü ile yapılması latent kabul edilen bazı hastalık etmenlerinin ağaç ölümü ile sonlanabilecek zararlara yol açmasına neden olmaktadır. Örneğin Çin’de yapılan bir araştırma çalışmasında, çeşit değişikliği yapılan elma bahçesinde hastalık oranının %41 den %88’e çıktığı ve çeşit değişikliği yapılan bahçelerde 1-2 yıl içerisinde %15–70 oranında ağaç ölümü gözlemlendiği rapor edilmiştir (Zhi ve ark. 2002).

Ülkemizde modern meyvecilik tekniklerinin yayılması ve sık dikim (yarı veya tam bodur) bahçeciliğin giderek yaygınlaşması latent olarak kabul edilen ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının daha büyük ekonomik kayıplara neden olması sonucunu doğurabilir. Çünkü bu bahçelerde birim alanda daha fazla ağaç bulunmaktadır. Ayrıca sık dikim bahçecilikte meyveleri taşıyan dallar en fazla 3–4 yaşlı olmaktadır. Dal açısının genişlemesine ve odun dokusu kuru ağırlığının azalmasına neden olan bu hastalıklar modern bahçecilikteki aşırı meyve yükünü kaldıramayacak meyve dalı oluşmasına neden olacaktır. Meyve verimi, meyve kalitesi ve depo koşullarına dayanıklılık üzerine olumsuz etkisi olabilecek bu hastalıkların bütün yumuşak çekirdekli meyve türlerinde ve anaçlarında daha detaylı olarak araştırılması ve mücadelesine yönelik bulgular elde edilmesine ihtiyaç vardır.

5. SONUCLAR ve ÖNERİLER

Yumuşak çekirdekli meyvelerde görülen, daha çok gövde zararına neden olduğu bilinen ve latent olarak kabul edilen ASPV ve ASGV virüs hastalıklarıyla ilgili olarak yapılan bu çalışmada genel olarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Sürvey yapılan 5 ilde toplam 134 bahçeden 619 örnek alınmış ve bu örneklerin 114 adedi, yani %18,41'i ASPV ve/ya ASGV ile enfekteli bulunmuştur. Her iki hastalık etmeni de bütün illerde değişen oranlarda tespit edilmiştir.
2. Çalışmalar sırasında yumuşak çekirdekli meyve grubuna giren her üç türde de (elma, armut, ayva) hem ASPV hem de ASGV hastalık etmenlerine rastlanmıştır. Bu hastalık etmenlerinden ASPV örneklerin % 10,34.de, ASGV ise %5,49 oranında bulunmuştur. Ayrıca her iki hastalığın birlikte bulunduğu karışık enfeksiyon oranı ise %2,58 olarak belirlenmiştir.
3. Enfekteli örnekler dikkate alındığında hastalık etmenlerinden ASPV'nin en yoğun şekilde ayvada (%70,00), daha az yoğun olarak armutta (%66,67) ve en az ise elmada (46,88) bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca ASPV hastalık etmeninin özellikle ayvada ve armutta daha düşük bir oranda ise elmada bazı yaprak, meyve ve gövde belirtileri oluşturduğu ve bu belirtilerin bazı türlerde özellikle ayvada vejetasyon süresince görülebildiği belirlenmiştir.
4. ASPV'nin Anna gibi yazlık elma çeşitlerinde vejetasyonun daha uzun sürdüğü Adana gibi illerde enfekteli ağaçlarda daha çok belirti verdiği gözlenmiştir. Bunun asıl nedeninin hastalık etmeninin konukçu bünyesinde biyoreplikasyonu için gerekli olan çevre koşullarının daha uzun süre devam etmesidir. Bu nedenle vejetasyonu uzun süren bölgelerde yetiştirilen yazlık çeşitlerde hastalık etmeninin daha çok belirti gösterdiği belirlenmiştir.
5. ASPV'nin armut ve ayvada meyve deformasyonu, taşlaşma, küçük meyve vb. belirtilere neden olduğu, ayrıca armut yapraklarında lokal sarı lekeler ile yaprak arka damarında deformasyonlara neden olduğu belirlenmiştir. ASPV ve ACLSV'nin birlikte bulunması durumunda ayva yapraklarında şekil bozukluğu, ileri derecede mozaikler ve küçülme şeklinde belirtiler ortaya çıktığı gözlenmiştir.

6. Bu çalışmada ASPV virüsünün elma çekirdeğinde bulunabildiği ortaya konmuştur. Bu bulgu ASPV'nin neden meyve belirtisi oluşturduğunu da açıklamayı kolaylaştırmaktadır. Virüsün meyvede tespit edilmesi etmenin meyve dokusunda da zararlara neden olacağını göstermektedir.
7. ASGV'nin bulunma oranları yumuşak çekirdekli meyve türlerine göre büyük farklılar göstermemiştir. Enfekteli örnekler içindeki dağılımı ise ASPV'nin tersine en çok elmada (%39,06), daha sonra armutta (%20,00) ve en az ayva'da (%15,00) tespit edilmiştir.
8. ASGV için yapılan simptomatolojik gözlemlerde ise belirgin bir hastalık belirtisine rastlanmamış olmakla birlikte bir armut örneğinin yapraklarında meşe yaprağı simptomsu tespit edilmiştir.
9. ASGV'nin genel olarak ASPV'ye oranla daha az bulunduğu ve ASPV ile karışık bulunduğu durumlarda ASPV'nin neden olduğu hastalık belirtilerini artırdığı ortaya konmuştur.
10. Çalışma süresince yapılan sürveyler sonucunda Niğde ilinde elde edilen Amasya çeşidi elma örneklerinde herhangi bir ASPV veya ASGV enfekteliliği saptanmamıştır.
11. Her iki hastalık etmeninin teşhisinde kullanılan DAS-ELISA yönteminin daha başarılı olabilmesi için en uygun örnek alma zamanı, örnek muhafaza koşulları, DAS-ELISA yöntemi ve en uygun bitki dokusu belirlenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre serolojik testler için en uygun bitki dokusu olarak yaprak, en uygun örnek alma zamanı nisan-mayıs olduğu ortaya konmuştur.
12. Ayrıca yapılacak teşhis çalışmalarının süresi, örnek miktarı ve çalışmanın amacına göre değişik örnek muhafaza koşulları belirlenmiştir.
13. Dormant dönemde alınan örneklerin forse edilerek elde edilen taze yaprakların ELISA testlerinde kullanılabildiği ve bu yöntemin geniş alan sürvey çalışmalarında uygulanabilecek bir yöntem olduğu belirlenmiştir.
14. ASPV ve ASGV virüs hastalıklarının teşhisinde RT-PCR moleküler yönteminin uygulanabileceği ve hassas çalışmalarda özellikle bu metodun

tercih edilmesi gerekliliği ortaya konmuştur. Bu yöntemle dormnat dönemde bile bitkilerden ASGV ve ASPV pozitif sonuçlar alınabildiği saptanmıştır.

15. Sürvey çalışmaları sonucu elde edilen ASPV ve ASGV izolatları mekanik olarak otsu indikatörlere ve aşıyla odunsu indikatörlere başarılı bir şekilde taşınmış ve bu hastalık etmenlerine spesifik belirtiler gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda her iki hastalık etmeninin biyolojik yöntemlerle teşhis edilebildiği, fakat bu test çalışmalarının büyük işgücü ve fazla zaman gerektirdiği belirlenmiştir.
16. Elde edilen hastalık izolatlarının varsa aralarındaki moleküler ve biyolojik farklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler ışığında izolatlar arasında biyolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farkların daha çok izolatların elde edildiği konukçuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Mevcut bilgiler ışığında biyolojik karakterizasyon çalışmalarının latent olarak kabul edilen hastalık etmenlerinin karakterizasyonunda daha başarılı olduğu düşünülmektedir.
17. Çalışma kapsamında ASPV'nin özellikle ayvada meyvelerin pazar değerini önemli ölçüde düşürdüğü ve enfekteli ağaçların özellikle bazı fungal hastalık etmenlerine karşı daha duyarlı hale geldiği belirlenmiştir.
18. ASPV enfekteli ağaçların aynı zamanda ASGV veya ACLSV ile enfekteli olması durumunda hastalık belirtilerinin daha şiddetli seyrettiği belirlenmiştir.
19. Hastalık etmenlerinin bazı ticari elma çeşitlerine aşılınması yolu ile bu çeşitlerin ASPV ve ASGV virüs hastalıklarına olan tepkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin elma ağaçlarının gövde çaplarında daralmaya neden olduğu ve dalların ana gövdeye yaptığı açıda genişlemeye sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastalık etmenlerinin ağaçların odun kuru ağırlığında azalmaya neden olduğu ve özellikle ASGV'nin dalların dayanıklılığına olumsuz yönde etki ettiği belirlenmiştir. Bu denemede ticari bazı elma çeşitlerinin bilinenin aksine ASPV ve ASGV ye spesifik bazı belirtiler verdiğini ve ticari elma çeşitlerinin bu hastalık etmenlerinden etkilendiği ortaya konmuştur. Özellikle ASGV enfeksiyonu sonucunda Starking elma çeşidinde dallarda şişme (stem

grooving) Granny Smith çeşidinde ise ASPV enfeksiyonu sonucunda sürgün nekrozu (stem necrosis) meydana gelmiştir.

20. Çeşit reaksiyon denemesi ve arazi gözlemleri sonucu elde edilen bilgiler özellikle ASPV'nin neden olduğu ortaya konan ekonomik zarar göz önünde bulundurulduğunda bu hastalık etmenleriyle ilgili mücadele metotlarının da önemli olduğu görülmektedir. Bu hastalık etmenleriyle mücadele diğer viral etmenler gibi oldukça zordur. Özellikle hastalık belirtilerinin fidan aşamasında ortaya çıkmaması hastalığın fidanlıklarda eradikasyonunu zorlaştırmaktadır. Hastalıkla enfekteli fidanların dikiminden sonra üretici tarafından bahçede fark edilebilecek belirgin semptomlar oluşturmadığından hastalık etmenleri uzun yıllar bahçe içerisinde kalmaktadır.
21. Ayrıca elde edilen bulgular neticesinde bu hastalıkların doğada muhtemel vektörlerle yayılabilmesi sonucunda giderek artan, fakat üretici tarafından fark edilmeyen zararlara neden olabileceği tespit edilmiştir. Bu nedenle ASPV ve ASGV gibi latent kabul edilen virüs hastalıklarıyla mücadele, karantina ve sertifikasyon uygulamalarının sağlıklı bir şekilde yürütülmesiyle yapılabilir. Bu amaçla EPPO PM 4/27 (1) sertifikasyon protokolü uygulanmalıdır. Ayrıca bu virüslerden ari olarak tesis edilen bahçelerde yeni bulaşmalardan korunmak amacıyla bahçe içerisinde yapılan kültürel faaliyetlerde alet ve makinelerin temiz olmasına dikkat edilmelidir.
22. DAS-ELISA teşhis metodu hastalık etmenlerini teşhis etmekle birlikte, konukçu bitkilerdeki virüs titerinin düşük olması nedeniyle yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca bu test için kullanılan örnekler ancak kısa bir dönem aralığında alınabilmektedir. Dolayısıyla özellikle sertifikasyon ve karantina çalışmalarında ELISA ile birlikte biyolojik indeksleme ve moleküler tanı yöntemleri de kullanılmalıdır.

Bu çalışma kapsamında yukarıda kısaca özetlenen sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar ASPV ve ASGV virüsleri ile ilgili birçok yeni çalışma yapılması gereğini de ortaya koymuştur. Bu hastalık etmenlerinin daha detaylı olarak çalışılması ve mücadeleye esas teşkil edecek bilgilerin ortaya konması amacıyla bundan sonra

araştırılması önerilen başlıca konular ise aşağıda özetlenmiştir.

1. ASPV ve ASGV hastalık etmenlerinin DAS-ELISA yöntemiyle çok başarılı bir şekilde teşhis edilememe nedenlerinden biri bu etmenlerin bitkideki partikül sayısının az olması ise diğer bir neden de virüs partiküllerinin bitki içinde homojen dağılmamasıdır. Dolayısıyla bu hastalık etmenlerinin bitkilerin hangi kısımlarında daha çok bulunduğu tespit edilmesi gerekmektedir.
2. Çeşit reaksiyon denemelerinin armut ve ayva gibi diğer türlerde de yapılması gerekmektedir. Planlanacak yeni çeşit reaksiyon denemelerinde daha çok sayıda çeşit denemeye alınmalıdır. Ayrıca farklı anaç çeşit kombinasyonlarının bu hastalıkların belirtilerinin ortaya çıkmasına olan etkileri de araştırılmalıdır.
3. Yapılacak çeşit reaksiyon denemelerinin bitkilerde meydana gelecek meyve belirtilerinin gözlenebilmesi ve uzun yıllara yayılan ekonomik zararlarının ortaya konması için açık alanda ve uzun süreli olarak planlanması önerilmektedir.
4. Öncelikle ASPV olmak üzere her iki hastalık etmeni ile ilgili olarak doğal yayılma ve vektör çalışmaları yapılmalıdır. Bu hastalığın fungal bir vektörle veya kök kaynaşması yoluyla yayıldığı ortaya konulması sertifikasyon ve karantina uygulamalarının yeniden düzenlenmesi gerekli olacaktır.
5. ASPV'nin konukçu köklerinde bulunması nedeniyle bu hastalık etmeninin kök yapısına ve kök fonksiyonlarına olan etkisi araştırılmalıdır.
6. ASGV'nin varlığı turunçgillerde ve kivide rapor edilmiştir. Çalışma süresince yapılan gözlemlerde ülkemizde son yıllarda yumuşak çekirdekli meyvelerin turunçgil ve kivi yetiştiriciliği yapılan alanlarda da yapıldığı görülmüştür. Bu nedenle ülkemiz turunçgil ve kivi alanlarında ASGV'nin varlığının tespit edilmesi ve bu alanlarda yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğine olan etkisinin araştırılması gerekmektedir.
7. ASPV ve ASGV ile enfekteli ağaçların diğer fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerine karşı gösterdiği duyarlılık araştırılmalıdır. Böylece bu viral etmenlerin dolaylı zararında ortaya konulmuş olacaktır.

KAYNAKLAR

- AHMAN, G. , 1995. Viruses in apple. : Vaxtskyddsnötiser. 59 (2): 52-55.
- AKBAŞ, B., and İLHAN, D., 2005., Widespread Distribution of *Apple mosaic virus* on Apple in Turkey. Plant Disease 89 (9): 1010.
- AKBAŞ, B., and İLHAN, D., 2008. First Report of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* in Quince (*Cydonia Oblonga* Mill.) in Turkey. XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. Acta Horticulturae, 781: 161-165.
- ANONYMOUS., 2004. International Working Group on Fruit Tree Viruses, Detection of Virus and Virus-Like Diseases of Fruit Trees. Proc. XIX IS on Fruit Virus Diseases. Acta Horticulture. 657: 575p.
- ANONYMOUS., 2005. Catalog of virus taxonomy and nomenclature approved by the international Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>. 13.04.2009.
- AUDERGON J.M., and MORVAN G., 1990. A rapid method for assessing the sensitivity of apricot to plum pox virus. In Proceedings of the XXIII International Horticultural Congress. Florance, Italy: 46: 271-274.
- BİRİSİK, N., MYRTA., A., HASSAN, M., and BALOGLU, S., 2008. A Preliminary Account on Apple Viruses in Mediterranean Region of Turkey. XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. Acta Horticulturae, 781: 125-130.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALİMANS, M.M.M., JANSEN, C.I., WERTHEIM VAN DİLLEN, P.M.E., and VON DER NOORDA, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495-503.
- BORA, T., ve KARACA, İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı. No. 167. Ege Üniversitesi Matbaası: 8.s.
- BOS, L., 1999. Plant Viruses. Unique and intriguing pathogens. A textbook of plant virology. Backhuys Publishers. Laiden, The Netherlands. 358p.

- BOSCIA, D., A.M.D'ONGHIA, B. Di TERLIZZI, F. FAGIOLI and OSLER R., 1999. Accertamenti fitosanitari sul materiale di propagazione. Atti del Convegno Nazionale su Certificazione delle Produzioni Vivaistiche. Eds. V. Savino, P. La Notte, M. Saponari, L. Cavone, A. Bazzoni: 99-153.
- CAMPBELL, A.I., 1968. Heat sensitive of some apple viruses. *Togunsber. DAL. DDR. Berlin.* 97: 311-316.
- CANN, A., 1999. *Virus Culture: A Practical Approach*. Published by Oxford University Press: 243p.
- CARVO, L.M., and BARROS, M.T.F., 2001. The Use of A Simplified DAS-ELISA Procedure for Large-Scale Detection of *Apple Chlorotic Leaf Spot* And *Apple Stem Grooving Viruses* in Apple Trees Over Extended Sampling Periods. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Top Fruit Diseases. ISHS Acta Horticulturae 550.
- CEMBALI, T., FOLWELL, J., WANSSCHINIEDER, P., EASTWELL, C. K., HOWELL, W. E., 2003. Economic Implication of a Virus Program in Deciduous Fruit Tree in the US. *Crop Protection* 23; 1149-1156.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. of Gen. Virol.* 34: 475-483.
- CLARK, M.F. and BAR-JOSEPH, M., 1984. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. In: K. Maramorsh and H. Kaprowski (eds. *Methods in virology*. Academic press, New York, USA: 51-85.
- CLOVER, G.R.G., PEARSON, M.N., ELIOT, D.R., TANG, Z., SMALES, T.E., and ALEXANDER, J.R., 2003. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology*, 52 (3): 371.
- CROPLEY, R., 1968. Comparison of same apple latent virus. *Ann. Appl. Biol.* 61: 361-372.
- ÇAĞLAYAN, K., SERÇE, Ç.U., GAZEL, M., JELKMAN, W., 2006. Detection of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assay in Turkey. *Turk. J.of Agr. for.* 30: 241-246.
- ÇALI, S., 1992. Do Viruses and Mycoplasma Causes Small Sized Apple Fruit in

- Isparta. J. of Turkish Phytopatology. 21:87-99
- DE SEQUEIRA, O. A., 1965. Recent work on some sap-transmissible viruses from apple. II. Apple cucumber virus and C 36 virus. Zast. Bilja. 16: 257-250.
- , 1967. Studies on a virus causing stem grooving and graft union abnormalities in Virginia Crap apple. Ann. Appl. Boil. 60:59-66.
- DE SEQUEIRA O, A and LİSTER, R.M., 1969. Phytopatology. 59: 1740.
- DESVIGNES C.J., BOYÊ R., CORNAGGIA., GRASSEAU N., 1990. Maladies a virus des arbres fruiters. Citfl. Paris. 202p.
- DESVIGNES C.J., BOYÊ R., CORNAGGIA., GRASSEAU N., HURT, S., WTARWORTH, H., 1999. Virus Diseases of Fruit Trees. Citfl. Paris. 202p.
- DIJKAŠTRA J., and JAGER, C.P., 1998. Praktikal Plant Virology. Protocol and Exercises. Newyork. 458p.
- DI TERLIZZI B., 1998. Biological Diagnosis of Virus and virus-like diseases : a special referance to to stone fruit certification. Stone fruit viruses and certification in Mediterranean Contries : Problem and prospects. CIHEAM. Bari. *Optiones Méditerranéene.* B.19 :151-189.
- DURSUNOĞLU, S and ERTUNÇ, F., 2008. Distribution of Apple Mosaic Harvirus (ApMV) in Turkey. XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. ISHS Acta Horticulturae 781: 131-134.
- EASTWELL, K., 2008. Management of Viruses That Affect Fruit Trees. Washington StateUniversity. <http://www.prosser.wsu.edu/faculty/eastwell.html>. 12.12.2008.
- EPPO., 2009. Certification Schemes for Pathogen Tested Material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. <http://archives.eppo.org/EPPOStandards/certification.htm>. 24.02.2009.
- FAO., 2009. Statistical Databases, faostat-agriculture. <http://faostat.fao.org/faostat/=agriculture>. 04. 03. 2009.
- FRIDLUND, P.R., 1987. Infulance of Apple Green Crinkle Disease on the Quality of Granny Smith Apple. Plant Disease 71: 585-587.
- FRISON, E.A., and TAHER, M.M., 1991. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the

- Safe Movement of Citrus Germplasm. Food and Agricultural Organization of the United Nations & International Board for Plant Genetic Resources. Rome. (I). p50.
- FUNING, Q., MIN, Z., ZHONGWU, J. , QINGXIN, K., 2003. Study on the improved method for eliminating the latent viruses of apple trees. *China Fruits* 5: 30-32.
- GANG, B. M., JIAN-X. N., BUNKER M.M., PAN Z.L., ZHANG, H.P.,and ZHANG, L.X., 2008. Detection of three pear viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of an internal control. *Australasian Plant Pathology* 37: 117–122
- GALITELLI, D., and MINAFRA, A. 1994. Electrophoresis. Course on Plant Viruses Diagnosis. University of Cukurova, Dept. Plant Protection. Adana, Turkey. 89-114.
- GELLA, R., 1989. Effect of Some Virus Diseases on the Performance of Two Clones of 'Agua De Aranjuez' Pear.V International Symposium on Pear Growing. *ISHS Acta Horticulturae* 256: 137-142.
- GRIN'KO, N. N., 2008. Virus etiology of Chinese *Actinidia* dieback. *Zashchita i Karantin Rastenii*. 6:23-24.
- GUENGERICH , H.W., MILIKAN, D.F., 1956. Trnsmission of stem pitting in apple. *Plant. Dis.Reprt.* 40: 934-938.
- 1959. Reaction of ownroot trees of Spy 227 and Virginia Crab to infection with the stem pitting virus. *Plant. Dis.Reptr.* 254: 30-31.
- GUGERLI, P, and RAMEL, M.E., 2004. Production of Monoclonal Antibodies for The Serological Identification and Reliable Detection of *Apple Stem Pitting* and *Pear Yellow Vein Viruses* in Apple and Pear. XIX International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases.*ISHS Acta Horticulturae* 657: 59-69.
- GUOPING, W., NÍ, H., ZUNPING, Z., YIAFENG, D., GUANGRONG, X., and ZHENYING, Y., 1996. On the techniques for obtaining virus-free mother trees of apple. *Scientia Agricultura Sinica*: 29 (3):41-48.

- HANSEN, A.J., 1989. Chemotherapy of apple stem pitting and pear stony pit with ribavirin. XIVth International symposium on fruit tree virus diseases. ISHS. Acta Horticulturae. 235: 333.
- HERRON, C.M., and SKARIA, M., 2000. Further Studies on Citrus Tatter Leaf virus in Texas. Proceeding Conference of IOCV, Riverside (US). 14: 185-194.
- HICKEY, K.D., and SEAR, G.M., 1975. Growth Response to Latent Virus Infection of Apple Trees on Seedling Rootstocks. IX International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. ISHS Acta Horticulturae 44: 237-244
- HIRATA, H., LU, X., YAMAJI, Y., KAGIWADA, S., UGAKI, M., and NAMBA, S., 2003. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. Gen Virol (84): 2579–2583.
- HOWELL, W., EASTWELL, K., OPHARDT, D., 2002. Tree Vigor and Date of Fruit Maturity as Affected by Virus. Final Report of 4248 Organization Project.NRSP5.<http://jenny.tfrec.wsu.edu/wtfrc/PDFfinalReports/2002FinalReports/AppleHortPath/HowellVigor.pdf>.
- HUAIQIONG, L.,and RUXI, C., 1996. The identification of virus diseases for the leading pear cultivars grown in Sichuan. South China Fruits. 25 (4):44
- HUNIUDA, T., YOSHIDA, Y., and SANADA, T., 1983. The Disorder of Topworked of Apple Trees in Japan. III. The Effect of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple Stem Pitting Virus on Some Rootstocks and Malus Species. Bul. Fruit. Tree. Resc. Stn. V 10: 11-21.
- HOOPER, D.J., 1986. Extraction of free living stages from soil. In: Southey, J.F. (ed). Laboratory Methods for Work with Plant Soil Nematodes. Her Majesty's Stationary Office, London: 5-30.
- INOUE, N., MAEDA, T., and MITSUHATA, K., 1979. Citrus Tatter Leaf Virus Isolated from Lily. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 45:712-720.
- ISMAEIL, F.,AL-JABOR, K, MYRTA, A.,MANDO, M. J, AL-SAADOUN, E., HASSAN, M and AL-CHAABI, S., 2006. Viruses of pome fruit trees in Syria. EPPO Bulletin. Volume 36, p 65.

- JAMES, D., 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. J. Virol. Methods, 83:1-9.
- , 2001. Long Term Assessment of the Effects of *In Vitro* Chemotherapy as a Tool for Apple Stem Grooving Virus Elimination. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Top Fruit Diseases. Acta Horticulturae, 550: 559-462.
- JELKMANN, W., 1994. Nucleotide sequence of *apple stem pitting virus* and coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. J. Gen. Virolgy. 75: 1535-1542.
- JELKMANN, W., and KEIM-KONRAD R., 1997. Immuno captive polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for detection of *apple stem pitting virus*. J. Phytopathology., 145: 499-503
- JONES, A. T., 1980. Some Effects of Latent Virus Infection in Red Raspberry. II International Symposium on Small Fruit Virus Diseases. Acta Horticulturae, 95: 72-79.
- KAMBEROGLU, M.A., BALOGLU, S., YILMAZ, M.A., 1995. Meyer limon çeşidinde Turuncgil Tristeza (CTV) ve Turuncgil Tatter Leaf Virus (CTLV) hastalıklarının saptanması. 7. Congress of Phytopathology in Turkey, Adana (Turkey): 314-317.
- KEELING, B.L., 1982. Effect of Soybean Mosaic Virus on Root Volume and Dry Weight of Soybean plants. Crop Science Society of America. 22:629-630
- KEGLER, H., KLEINHAMPEL, H., VERDEREVSKAJA, T., 1976. Investigation on pear stony pit virus. Acta. Horticult. 67: 209-218.
- KHAN, J.A and DIJKSTRA, J., 2006. Handbook of Plant Virology. Food Products Press. New York, London, Oxford 452p.
- KINARD G.R., SCOTT S.W., BARNETT O.W., 1996. Detection of *apple chlorotic leaf spot* and *apple stem grooving* viruses using RT-PCR. Plant Disease, 80:616-621.

- KIRBY, M.J., GUISE, C.M., ADAMS, A.N., 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for apple stem grooving virus. *Journal of Virological Methods* 93 167–173.
- KLERKS, MM., LEONE, G., LINDER, J.L., SCHOEN, C.D., and HEUVEL von J.F.J.M., 2001, Rapid and Sensitive Detection of *Apple stemPittingVirus* in Apple Trees Throug RNA Amplification and Probing with Flourescant Molecular Beacons. *Pytopatology* 91 (11): 1085-1091.
- KOBS, G., 1998. Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. *Promega notes*.68:28. http://www.promega.com/pnotes/68/7381_28/7381_28_core.pdf. 28.04.2009.
- KOGANEZAWA, H., and YANASE H., 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent *Plant Dis.* 74:610
- KUMMERT, J., MORINHO, V.L.A, RUFFLARD, G., COLINET, D., LEPOIVRE, P., 1998. Sensitive detection of *apple stem grooving* and *apple stem pitting* viruses from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticult.*, 472 (1):97-104.
- KUNDU, J.K., 2001. To the diagnosis and distribution of the *apple stem pitting* virus in Czech Republik. *Acta Horticult.*, 550 (1): 277-280.
- , 2002. The application of RT-PCR Assay for the Detection of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Stem Grooving Virus* in Four Apple Cultivars. *Plant Protection Science*. Vol.38-1:13-17.
- , 2003. The Occurrence of *Apple Stem Pitting* and *Apple Stem Grooving* viruses Within Field-Grown Apple Cultivars Evaluated by RT-PCR. *Plant Protect. Sci.*39; 88-92.
- , 2008. Detection, Distribution and Genetic Diversities of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Stem Grooving Virus* in The Czech Republic. *Acta Horticult.*, 781: 143-149.
- KUNDU, J. K., SVOBODA, J., POLÁK, J., 2003. Detection of *Apple Stem Grooving Virus* in Different Tissue of Apple Trees Through The Year. *Plant Protect. Sci* (39): 93-96.
- KUNDU, J.K., DUCHÂCOVÂ, M., JOKES, M., 2006. Cytopatology of Apple Stem

- Pitting Virus in *Nicotiana Occidentalis* L. *Biologia*. Bratislava. 61(4): 469-471.
- LEMOINE, J., MICHELESI, J. C., 1990. Effects of Tree Virus Diseases on Three Pear Cultivars. *Scientia Horticulturae*. 44 (1-2): 69-81.
- , 1997. Incidence of a Contamination in a Pear Orchard. *Arboriculture Fruitiere*. 508: 35-40.
- LEONE, G., LINDNER, J.L., VAN DER MEER, F.A. , SCHOEN, C.D. , JONGEDIJK, G., 1998. Symptoms on Apple and Pear Indicators After Back-Transmission From *Nicotiana Occidentalis* Confirm The Identity of Apple Stem Pitting Virus With Pear Vein Yellow Virus.: XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. *ISHS Acta Horticulturae* 472: 61-65.
- LENZ, O., PETRZIK, K., SPAK, J., 2008. Investigating the Sensitivity of a Fluorescence-Based Microarray for the Detection of Fruit-Tree Viruses. *Journal of Virological Methods*, 148: 96–105.
- LISTER, R.M., BANCROFT, J.B., NADAKAVUKAREN, M.J., 1965. Some sap-transmissible viruses from apple. *Phytopathology*. 55:859-870.
- LISTER, R. M., 1970. CMI/AAB *Descriptions of Plant Viruses* 31.420.
- LOLIC, B., MYRTA, A., KRSTIĆ, U.B., 2007. Pome Fruit Viruses in Bosnia and Herzegovina. *Pesticidi i Fitomedicina* . 22(2): 165-172.
- MAGOME, H., YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI. T., ITO, T, and MIYAKAWA, T., 1997. Molecular Variability of the Genomes of the Capilloviruses, from Apple, Japanese Pear, European Pear and Citrus Trees. *Phytopatology*. 87: 389-396.
- MAGOME, H., YOSHIKAWA, N., and TAKAHASHI., 1999. Single-strand conformation polymorphism analysis of *Apple stem grooving capillovirus* sequence variants. *Phytopatology* 89:136-140.
- MANGANARIS G. A., ECONOMOU A. S. , BOUBOURAKAS I. N. AND. KATIS N. I, 2003. Elimination of PPV and PNRSV through termoterapi and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*. Volume 22 (3): 195-200
- MANZANARES, M.J., CORRE, J., SAINT, J.P.L., and HERVE, Y., 1993. Effects

- of Artichoke latent Virus and Broad Bean Virus Isolate FA on Components of Growth and Yield of Globe Artichoke. *Plant Pathology*. 42: 378-388.
- MARTELLI G.P., and JELKMANN W., 1998. Foveavirus, a new plant virus genus. *Arch. Virology*, 143:1245-1249.
- MATHIOUDAKIS, M. M., MALIOGKA, V. I., DOVAS, C. I., VASILAKAKIS, M., KATIS, N. I., 2006. First record of the *Apple stem pitting virus* (ASPV) in quince in Greece. *Journal of Plant Pathology* .88 (2): 225.
- MATHIOUDAKIS, M. M., CANDRESSE, T., KATIS, N.I., 2007. First Report of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Quince in Greece. *Disease notes. Plant Diseases V*. 91: p 462.
- MAXIM, A., ZAGRAI, L., ZAGRAI, I., ISAC, M., 2004. Studies on the Influence of Apple Stem Grooving Virus on Tree Growth of Various Apple Cultivars in the Nursery. XIX International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulture*. 657: 41-44.
- MAYO and BRUNT. 2006. Plant virus taxonomy (KHAN, J.A and DIJKSTRA, J.) *Handbook of Plant Virology*. Food Products Pres. New York, Oxford : 11-22.
- MENZEL, W., ZAHN, V., MAISS, E., 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA Compared for Detection of Four Apple Viruses. *Journal of Virological Methods*. 110: 153-157.
- MILNE, R.G., 1993. Electron Microscopy as a Powerful Tool for Detection and Identification of Plant Viruses. XI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. *ISHS Acta Horticulturae* 722: 37-40.
- MINOIU, N., VLADIANU, D., PATTANTYUS, K., CRACIUM, C., CRACIUM, V., PARNIA, P., STIRBAN, M., 1986. Investigations on Pear Vein Yellows In Nursery. XIII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. *ISHS Acta Horticulturae* 193: 77-82.
- MIYAKAWA, T., and ITO, T., 2000. Tatter leaf-Citrange Stunt. In. Timmer L.W., Garnsey, S.M. & Graham, J.H. (Eds). *Compendium of Citrus Diseases*, Second Edition. St. Paul (US). APS Press. P 128.
- MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., GHABRIAL S.A., JARSIV

- A.W., MARTELLI G.P., MAYO M.A., SUMBERS M.D., 1995. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer. Vienna. P 586.
- NEMETH M., 1986. Virus, Mycoplasma and Riketsia Diseases of Fruit Trees. Akademia Kiado. Budapest. 840p.
- NICKEL, O., FAJARDO, T.V.M., JELKMANN, W., 2001. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in Southern Brazil. *Fitopatol. bras.*, Sept, 26,(3): 655-659.
- OGOWA, M. J., and ENGLISH, H., 1991. Diseases of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. University of California. USA: s,74-84.
- OSVALDO L., GIAN P.A., VERA M., ADDOLARATO C., 2002. An Isolate of *Apple stem grooving virus* Associated with Cleopatra Mandarin Fruit Intumescence. *Fitopatol. bras*, 28 (1): 54-58.
- ÖZBEK, S., 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri). Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, , Adana. No: 128, Ders kitabı: 11
- ÖZKAN, M ve KURÇMAN, S., 1976. Orta Anadolu Elma Bahçelerinde Görülen Virüs Hastalıkları. *Bitki Koruma Bülteni*. 16 (2): 106-115
- PARK, H., YOON, J., KİM, H., and BAEK, K., 2006. Multiplex RT-PCR Assay for the Detection of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus in Infected Korean Apple Cultivars. *Plant Pathol. J.* 22(2) : 168-173.
- PENROSE, L.J., DAVIS, K.C., VALENTINE, B.J., 1988. Comparative performance of three apple clones derived from a virus-tested scheme, with clones infected with latent viruses and a mycoplasma. *Scientia Horticulturae*, 36(1-2): 55-65
- POLAK J., ZIEGLEROVA J., 2001. Distribution of *apple stem grooving virus* in apple trees in the Czeck Republic. *Plant Protect. Sci.*, 37: 1-4.
- POSNETTE, F. A., 1989. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectios Disorders. Cooperative Extension. Colloge of Agriculture and Home Economics. Wasgington State University. Pullman, Washington. p 330.
- PAUNOVIĆ, S., 1995. Double stranded RNA associated with fruit deformation of

- quince. *Acta Horticulturae*, 386:45-50
- PAUNOVIC, S., and RANKOVIC, M., 1998. Relationship Between Quince Fruit Deformation Virus And Some Pome Fruit Viruses. XVII International Symposium Virus And Virus-Like Diseases Of Temperate Fruit Crops. *Acta Horticulturae*, 472: 125-133.
- PAUNOVIC, S., and JEVREMOVIC, D., 2008. Comparative results of detection of pome fruit viruses by different methods.. Proceedings of XXVIII. International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulturae*, 781:147-153.
- PUPOLA, N., KÂLE, MOROCKO-BICEVSKA, I., 2008. Occurrence of Viruses in Apple and Pear Orchards in Latvia. Conference on “Sustainable Fruit-Growing: From Plant to Product” http://www.lvai.lv/Konference/pdf/D-Jurmala2008_labots.pdf. 01.06.2009.
- REBANDEL, Z., PRZYSIECKA, M., COFTA, H., 1990. The Effect of Some Viruses and Mycoplasmas on Growth and Yield of Jonathan Apple Trees. *Prace z Zakresu Nauk Rolniczych* .69:115-128.
- REFATTI, E., GIANNINI, M and PREVIATI, A. 1996. Analisi dello stato sanitario delle pomacee: Utilizzo di piante indicatrici micropropagate. *L'Info. Agr.* 37: 1-6.
- RODONI, B.C., and CONSTABLE, F.E., 2008. The Incidence and Strain Variation of *Apple Stem Grooving* and *Apple Stem Pitting Viruses* in Australian Pome Fruit. XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulturae*, 781: 166-171.
- ROTT, M.E., JELKMANN, W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of RNA extraction protocol. *Eur. j. Phytopathol.* 107, 411-420.
- ROISTACHER, C.N. (1991). Graft Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome (I). P 454.
- SCHWARZ K., JELKMANN W., 1998. Detection and characterization of European

- apple stem pitting virus* sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. Acta. Hort., 472: 75-85.
- SHIM, K. H., MIN, Y., HONG, S., KWON, M., KIM, D., KIM, M., CHOI, Y., LEE, S and YNAG, J., 2004. Nucleotid Sequences of a Korean Isolate of *Apple Stem Grooving Virus* Associated with Pear Black Necrotic Leaf Spot Disease on Pear (*Pyrus pyrifolia*). Moll. Cells. Vol. 18.(2): 192-199
- SHIM, K. H., HWANG, K.H., SHIM, C. K., SEUN, B.H., SON, S. W., KIM, D., CHOI, Y.M., CHUNG, Y., KIM, D.H., HYEOUNG, J.J., and SUK C.L., 2006a. The Pear Black Necrotic Leaf Spot Disease Virus Transmitted by *Tlaramoyces flavus* Displays Pathogenicity Similar to *Apple Stem Grooving Virus* Strains. Plant Path. J. 22(3): 255-259.
- SHIM, K. H., HWANG, K.H., SHIM, C. K., SEUN, B.H., SON, S. W., KIM, D., CHOI, Y.M., CHUNG, Y., KIM, D.H., HYEOUNG, J.J., and SUK C.L., 2006b. Ecopatological analyses of *Apple stem grooving virus*-K Harboring *Talaromyces flavus*. The plant Pathology Journal. 22 (3): 258-254.
- SKARIA, M., KAHLKE, C. J., GRACIA, S.N., and PREWETT, R., 1997. Virus-free Citrus Budwood Production and Tristeza Management Program in Texas Through Industry Partnership. Subtropical Plant Science, 49: 1-7.
- SÖKMEN, A. M., 2003. A Preliminary Study on Molecular Differentiation of Apple and Hazelnut Isolates of *Apple Mosaic Virus* (APMV). The J. of Turkish Phytopatology, 32 (3): 115-122.
- STOUFFER, R.F., 1989. Apple Stem Pitting. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectios Diseases. Cooperative Extension. College of Agriculture and Home economics. Wasgington State University. Pulman, Washington. 138-144.
- THOMSEN, A., 1989. Pear Stony Pit. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectios Diseases. Cooperative Extension. Colloge of Agriculture and Home economics. Wasgington State University. Pullman, Washington. 182-187.
- TÜİK., 2009. Tarımsal yapı, üretim ve değerleri.
<http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (01.06.2009)

- ÜLKÜMEN, L., 1938. Malatya'nın Mühim Meyve Çeşitleri Üzerinde Morfolojik, Fizyolojik ve Biyolojik Araştırmalar. Yüksek Ziraat Enstitüsü Çalışmaları, Sayı: 65, Ankara.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., and WICKNER, R.B., 2000. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. P 1161.
- VERA, L., MARINHO, A., KUMMERT, J., RUFFLARD, G., COLINET, D., and LEPOIVRE, P., 1998. Detection of Apple Stem Grooving Virus in Dormant Apple Trees with Crude Extracts as Template for One-Step RT-PCR. Plant Disease. Vol.82 (7): 785-790.
- WALSH, L.M., and BEATON, J.D., 1973. Soil Testing and Plant Analysis. Soil Sci. Soc. Of Am. Inc. Madison. Wisconsin. 512.
- WANG, Q., SHI, Y., YANG, J., SUN, Q., 1998. Detection of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus And Apple Stem Grooving Virus by Dot-Immunobinding Assay. ISHS Acta Horticulturae 472:13-17
- WATERWORTH, E. H., 1989. Virus Like Diseases of Quince. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectious Diseases. Cooperative Extension. College of Agriculture and Home economics. Washington State University. Pullman, Washington. 213-217.
- WELSH, M.F., and UYEMOTO, J.K., 1980. Differentiation of syndromes caused in apple by graft-transmissible, Xylem affected agents. Phytopathology, 70: 349-352.
- WELSH, M. F., and VAN DER MEER, F.A., 1989. Apple Stem Grooving. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectious Diseases. Cooperative Extension. College of Agriculture and Home economics. Washington State University. Pullman, Washington. 127-137.
- WOOD, G.A., 1996. Past and Present Status of Virus and Phytoplasma Diseases in Apple Rootstocks in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science .24 (2):133-141.

- WU, Y. Q., ZHANG, D.M., CHEN, S.Y., WANG, X.F., WANG, W.H., 2001. Comparison of Three ELISA Methods for the Detection of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple Stem Grooving Virus. XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops. Acta Horticulturae, 472: 28-32.
- WU, B. Z., SU, C.C, and JAN, F.J., 2006. Isolation and Characterization of *Apple Stem Grooving Virus* Causing Leaf Distorting on Pear in Taiwan. http://research.nchu.edu.tw/upfiles/ADUupload/oc_downmul2271354730.pdf . 01.06.2009.
- YANASE, H., 1983. Back-Transmission of Apple Stem Grooving Virus to Apple Seedlings and Introduction of Symptoms of Apple Topworking Disease in Mitsuba Kaido (*Malus Sieboldii*) and Kobano Zumi (*Malus Sieboldii* Var. *Arborescens*) Rootstocks. XII International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. Acta Horticulturae, 130: 117-122.
- YILMAZ, K, N, D., YANAR, Y., KADIOĞLU, İ.,YANAR, D., 2005. Tokat İli Elma Bahçelerinde *Apple Mozaik Virüsü* (ApMV)'nün Yayılış Durumunun Belirlenmesi. OMU Zir. Fak. Dergisi. 20(3): 12-15.
- YOSHIKAWA N., SASAKI E., KATO M., TAKAHASHI T., 1992. The nucleotide sequence of *apple stem grooving capillovirus* genome. Virology, 191: 98-105.
- YOSHIKAWA, N., MATSUDA, H., ODA Y., ISOGAI, M., TAKAHASHI, T., ITO, T., YOSHIDA, K., 2001. Genome Heterogeneity of *Apple Stem Pitting Virus* in Apple Trees. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Top Fruit Diseases. ISHS Acta Horticulture 550: 285-290.
- ZHI, L., JIXUAN, W., WANHE, S., BING, W., ZHAOGUO, T., 2002. Study on the damage to apple by topwork disease and the causes of it. China Fruits (4):1-14.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya ili Doğanşehir ilçesine bağlı Kurucaova kasabasında 1976 yılında doğdum. İlkokul ve ortaokul öğrenimimi Kurucaova kasabasında tamamladım. Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Malatya Ziraat Meslek Lisesinden 1995 yılında mezun oldum ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölünü kazanarak üniversite eğitimine başladım.

Ç.Ü. Zir. Fak. Bitki Koruma bölümünden 1999 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl yine Bitki Koruma bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladım ve 2000 yılında Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne atanarak Fitopatoloji şubesi, viroloji laboratuvarında göreve başladım.

CIHEM bursu ile 2001 yılında İtalya'ya giderek IAM-B enstitüsünde viroloji konusundaki mastır programını başladım ve mastırımı 2003 yılında bitiridim. Aynı tarihler arasında Çukuova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma ana bilim dalında yüksek lisans tez konum olan proje çalışmasında yürüterek sonuçlandırdım.

Halen Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Fitopatoloji şubesi, viroloji laboratuvarında araştırmacı olarak çalışmalarına devam etmekle birlikte aynı kurumda Müdür olarak görev yapmaktayım.

EKLER

EK 1. ELISA TESTİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

1. Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline-PBS) 1x, pH 7.4)

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KCl	0.2 g
NaN ₃	0.2 g
H ₂ O	1 L

2. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing buffer-W.B, pH 7.4)

PBS 1x	1L
Tween-20	0.5 ml

3. Örnek Ezme Tampon Çözeltisi (Extraction buffer-E.B, pH 7.4)

PBS 1x	1L
Polyvinilpirolidone	20.0 g
Tween-20	0.5 ml

4. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating buffer-C.B, pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.20 g
H ₂ O	1 L

5. Konjugate Tampon Çözeltisi (Conjugate buffer-Cj.B, pH 7.4)

PBS 1x	1L
Polyvinilpirolidone	20.0 g
Tween-20	0.5 ml
Bovine serum albumin (BSA)	2.0g

6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrate buffer-S.B, pH 9.8)

Diethanolamine	97 ml
NaN ₃	0.2 g
H ₂ O	1 L

NOT: Yukarıda yer alan bütün ölçüler 1 L saf suda hazırlanacak şekilde verilmiştir. Çözeltilerin pH'ları 0,1 N NaOH veya HCl kullanılarak ayarlanmıştır.

EK 2. TOTAL RNA ANALİZLERİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİ VE SOLUSYONLAR

1. Ekstraksiyon tamponu

Aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar 150 ml steril saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözülmüş ve pH'sı ayarlanarak 200 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 v/v oranında 2.B.Mercaptoethanol ilave edilmiştir. (100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH:7,0), 500 mM NaCl, 10 mM 2.B.Mercaptoethanol).

Tris- HCl	2.422 gr
EDTA	3,722 gr
NaCl	5,844 gr

2. %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

20 gr SDS tartılmış ve 80 ml steril saf su içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Daha sonra saf su ilave edilerek 100 ml tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3. 5 M Potasyum Asetat (CH₃COOK)

60 ml steril saf su içerisinde 49,07 gr potasyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4. 3M Sodyum Asetat (CH₃COONa)

60 ml steril saf su içerisinde 40,82 gr sodyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5. %70 lik ETOH

% 99 Ethanol'den 707 ml alınarak 293 ml saf su ilave edilmiş ve hazırlanan bu %70 ETOH 4 + °C'de kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

**EK 3. KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN
İZOLATLARIN KODLANMASI VE TANIMI**

Virüs	Örnek adı	İzolat adı	Konukçusu	Orijin
ASPV	CF-41	P1	Armut	Adana-Yüreğir
	ÇÜ-19	P2	Elma	Adana-Balcalı
ASGV	CF-42	G1	Armut	Adana-Yüreğir
	İO-54	G2	Elma	Adana-Yüreğir
ASPV+ASGV	CF-39	PG1	Armut	Adana-Yüreğir
	İO-50	PG2	Elma	Adana-Yüreğir
Aşağıdaki örnek yalnızca bazı moleküler çalışmalarda ASGV izolatı olarak kullanılmıştır.				
ASGV	BETA 2	B2	Elma	Adana-Karantina

EK 4. MOLEKÜLER ÇALIŞMALARDA KULLANILAN TAMPON

ÇÖZELTİLER

1. TAE buffer (Tris + Asetik asit+ EDTA) pH:8,3

50 X TAE 1 lt için.

242 gr Tris

57,1 ml Glical Asetik asit

100 ml EDTA (pH: 8,0)

2. TE Buffer (Tris +EDTA) pH:7,4

100 mM Tris (pH:7,4)

10 mM EDTA (pH) 8,0)

3. 0,5 M EDTA pH:8,0

186,1 gr /lt (Otoklav edilmeli)

4. 1 M Tris pH:8,0

121,1 gr tris/lt (Ooklav edilmeli)

5. % 20 SDS

200 gr SDS 900 ml suda 60-65 °C eritilir ve 1000 ml tamamlanır.

6. TBE (Tris + Borik asit + EDTA) pH:8,3

108 gr tris

55 gr Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

7. Kristal Fenolun Saturasyonu

Kristal fenole 0,5 M Tris (pH: 7,4) ilave ederek 40 °C su banyosunda kristaller eriyene kadar bekletilir. Eriyen fenolu steril benchte bekleterek suyun üste çıkması beklenir ve bu faz alınarak eşit hacimde 0,1 M Tris (pH: 7,5) ilave edilerek +4 °C'de muhafaza edilir.

**EK 5. ÇEŞİT REAKSİYON DENEME SONUÇLARININ İSTATİSTİKİ
DEĞERLENDİRMELERDE KULLANILAN VERİLER**

1. VERİ GİRİŞ TABLOSU ÖZETİ

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Elma cesitleri	1	Jersey mac	10
	2	Golden	10
	3	Summer red	10
	4	Grany smith	10
	5	Fuji	9
	6	starking	10
	7	Vista bella	10
	8	Galaxy gala	10
Virus cesitleri	1	ASGV	32
	2	ASPV	31
	3	Kontrol	16

EK 5.**2. DEĞERLERİN ORTALAMASI: GÖVDE ÇAPI****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: GOVDECAP

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	15,3425	1,5014	4
	ASPV	15,4700	,8281	4
	Kontrol	18,9450	1,6617	2
	Total	16,1140	1,8753	10
Golden	ASGV	16,3975	,7367	4
	ASPV	16,1000	,7649	4
	Kontrol	21,0650	3,5285	2
	Total	17,2120	2,4296	10
Summer red	ASGV	14,6800	1,3629	4
	ASPV	14,2825	1,2958	4
	Kontrol	16,4000	,1838	2
	Total	14,8650	1,3683	10
Grany smith	ASGV	13,3825	,6799	4
	ASPV	14,2325	1,4302	4
	Kontrol	18,6750	,7849	2
	Total	14,7810	2,2972	10
Fuji	ASGV	15,8500	1,0485	4
	ASPV	14,6033	1,2050	3
	Kontrol	17,6600	,2546	2
	Total	15,8367	1,4782	9
starking	ASGV	14,4125	,1464	4
	ASPV	15,1325	,8717	4
	Kontrol	17,1350	3,536E-02	2
	Total	15,2450	1,1696	10
Vista bella	ASGV	14,7275	,3425	4
	ASPV	15,1300	,7571	4
	Kontrol	17,4450	,5586	2
	Total	15,4320	1,1943	10
Galaxy gala	ASGV	14,5700	1,3832	4
	ASPV	14,4500	,7944	4
	Kontrol	16,6000	,7071	2
	Total	14,9280	1,2975	10
Total	ASGV	14,9203	1,2581	32
	ASPV	14,9355	1,0895	31
	Kontrol	17,9906	1,8186	16
	Total	15,5481	1,8045	79

EK 5.**3. DEĞERLERİN ORTALAMASI: AĞAÇ BOYU****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: AGACBOY

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	150,2500	16,8201	4
	ASPV	163,5000	11,7898	4
	Kontrol	140,5000	14,8492	2
	Total	153,6000	15,8689	10
Golden	ASGV	181,5000	11,9583	4
	ASPV	190,0000	6,0553	4
	Kontrol	188,0000	19,7990	2
	Total	186,2000	10,9727	10
Summer red	ASGV	172,2500	25,7601	4
	ASPV	173,0000	6,4807	4
	Kontrol	193,5000	6,3640	2
	Total	176,8000	17,8126	10
Grany smith	ASGV	191,5000	44,2455	4
	ASPV	198,2500	25,3163	4
	Kontrol	159,0000	35,3553	2
	Total	187,7000	35,2705	10
Fuji	ASGV	159,2500	6,0759	4
	ASPV	173,0000	23,5160	3
	Kontrol	161,5000	7,7782	2
	Total	164,3333	14,2390	9
starking	ASGV	119,5000	5,0000	4
	ASPV	118,2500	4,6458	4
	Kontrol	119,5000	4,9497	2
	Total	119,0000	4,3205	10
Vista bella	ASGV	160,7500	19,2765	4
	ASPV	175,0000	23,0072	4
	Kontrol	180,5000	3,5355	2
	Total	170,4000	19,3689	10
Galaxy gala	ASGV	175,0000	9,3095	4
	ASPV	190,0000	21,3542	4
	Kontrol	169,5000	9,1924	2
	Total	179,9000	16,4415	10
Total	ASGV	163,7500	28,1219	32
	ASPV	172,6129	28,2414	31
	Kontrol	164,0000	26,7208	16
	Total	167,2785	27,8747	79

EK 5.**4. DEĞERLERİN ORTALAMASI: DAL SAYISI****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: DALSAYI

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	12,0000	2,8284	4
	ASPV	12,5000	1,7321	4
	Kontrol	10,5000	2,1213	2
	Total	11,9000	2,1833	10
Golden	ASGV	15,2500	5,2520	4
	ASPV	13,5000	3,6968	4
	Kontrol	13,5000	3,5355	2
	Total	14,2000	3,9944	10
Summer red	ASGV	9,2500	2,8723	4
	ASPV	11,0000	3,5590	4
	Kontrol	15,5000	,7071	2
	Total	11,2000	3,5839	10
Grany smith	ASGV	9,7500	4,0311	4
	ASPV	9,0000	3,5590	4
	Kontrol	12,5000	,7071	2
	Total	10,0000	3,3993	10
Fuji	ASGV	15,0000	2,1602	4
	ASPV	13,3333	1,1547	3
	Kontrol	16,0000	,0000	2
	Total	14,6667	1,8028	9
starking	ASGV	19,0000	2,1602	4
	ASPV	12,5000	3,3166	4
	Kontrol	11,5000	,7071	2
	Total	14,9000	4,2282	10
Vista bella	ASGV	12,0000	3,1623	4
	ASPV	10,0000	1,6330	4
	Kontrol	9,0000	1,4142	2
	Total	10,6000	2,4585	10
Galaxy gala	ASGV	17,2500	2,2174	4
	ASPV	18,5000	3,1091	4
	Kontrol	15,5000	3,5355	2
	Total	17,4000	2,7568	10
Total	ASGV	13,6875	4,3879	32
	ASPV	12,5161	3,7936	31
	Kontrol	13,0000	2,8983	16
	Total	13,0886	3,8835	79

EK 5.**5. DEĞERLERİN ORTALAMASI: TOPLAM DAL UZUNLUĞU****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: TDALUZ

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	274,2500	79,2354	4
	ASPV	302,2500	40,5329	4
	Kontrol	245,0000	4,2426	2
	Total	279,6000	56,1173	10
Golden	ASGV	678,7500	261,5204	4
	ASPV	633,2500	75,9885	4
	Kontrol	593,5000	82,7315	2
	Total	643,5000	163,2096	10
Summer red	ASGV	408,7500	72,6653	4
	ASPV	382,5000	124,2860	4
	Kontrol	316,5000	62,9325	2
	Total	379,8000	92,8186	10
Grany smith	ASGV	380,5000	141,5968	4
	ASPV	298,2500	124,4438	4
	Kontrol	359,5000	289,2067	2
	Total	343,4000	150,7118	10
Fuji	ASGV	503,0000	49,0782	4
	ASPV	485,6667	164,6096	3
	Kontrol	589,0000	24,0416	2
	Total	516,3333	97,5256	9
starking	ASGV	118,5000	37,5633	4
	ASPV	165,5000	47,1911	4
	Kontrol	103,5000	26,1630	2
	Total	134,3000	45,2009	10
Vista bella	ASGV	301,5000	90,6146	4
	ASPV	320,2500	35,2550	4
	Kontrol	394,5000	3,5355	2
	Total	327,6000	66,8883	10
Galaxy gala	ASGV	482,7500	81,2173	4
	ASPV	591,5000	108,7704	4
	Kontrol	495,0000	62,2254	2
	Total	528,7000	97,5512	10
Total	ASGV	393,5000	193,1089	32
	ASPV	394,5484	175,7661	31
	Kontrol	387,0625	183,0244	16
	Total	392,6076	182,0798	79

EK 5.**6. DEĞERLERİN ORTALAMASI: DAL UZUNLUĞU****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: ORTDUZ

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	24,2750	10,7810	4
	ASPV	24,5500	4,8556	4
	Kontrol	23,8000	5,2326	2
	Total	24,2900	7,0518	10
Golden	ASGV	45,5500	11,2417	4
	ASPV	49,5000	14,8299	4
	Kontrol	44,6500	5,5861	2
	Total	46,9500	11,1283	10
Summer red	ASGV	46,5675	11,5529	4
	ASPV	39,0525	18,5182	4
	Kontrol	20,5300	4,9922	2
	Total	38,3540	16,1977	10
Grany smith	ASGV	41,8150	12,4792	4
	ASPV	36,5600	21,0537	4
	Kontrol	16,9600	7,1276	2
	Total	34,7420	17,2996	10
Fuji	ASGV	33,7275	2,5709	4
	ASPV	35,9067	9,8091	3
	Kontrol	36,8100	1,4991	2
	Total	35,1389	5,3600	9
starking	ASGV	6,3500	2,4529	4
	ASPV	13,8375	4,6607	4
	Kontrol	9,0000	2,8284	2
	Total	9,8750	4,7756	10
Vista bella	ASGV	25,2500	4,9917	4
	ASPV	32,3250	3,4364	4
	Kontrol	44,3500	6,5761	2
	Total	31,9000	8,4396	10
Galaxy gala	ASGV	28,2000	5,5251	4
	ASPV	32,0750	4,8023	4
	Kontrol	32,2500	3,3234	2
	Total	30,5600	4,8188	10
Total	ASGV	31,4669	14,8991	32
	ASPV	32,8813	14,7446	31
	Kontrol	28,5438	13,1332	16
	Total	31,4299	14,4068	79

EK 5.**7. DEĞERLERİN ORTALAMASI: DAL AÇISI****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: ORTDACI

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	55,5000	7,5498	4
	ASPV	52,0000	7,2572	4
	Kontrol	44,0000	,0000	2
	Total	51,8000	7,4952	10
Golden	ASGV	64,5000	4,9329	4
	ASPV	61,5000	2,3805	4
	Kontrol	47,0000	4,2426	2
	Total	59,8000	7,7143	10
Summer red	ASGV	71,2500	,9574	4
	ASPV	63,0000	2,1602	4
	Kontrol	48,5000	,7071	2
	Total	63,4000	8,8719	10
Grany smith	ASGV	61,0000	1,1547	4
	ASPV	60,2500	4,1130	4
	Kontrol	45,5000	,7071	2
	Total	57,6000	6,8508	10
Fuji	ASGV	60,7500	,9574	4
	ASPV	59,6667	2,5166	3
	Kontrol	45,5000	2,1213	2
	Total	57,0000	6,7268	9
starking	ASGV	50,0000	,8165	4
	ASPV	49,0000	1,4142	4
	Kontrol	47,0000	,0000	2
	Total	49,0000	1,4907	10
Vista bella	ASGV	66,2500	4,5735	4
	ASPV	70,0000	1,6330	4
	Kontrol	49,5000	3,5355	2
	Total	64,4000	8,6049	10
Galaxy gala	ASGV	63,0000	2,9439	4
	ASPV	63,2500	2,2174	4
	Kontrol	49,0000	1,4142	2
	Total	60,3000	6,3430	10
Total	ASGV	61,5313	7,0390	32
	ASPV	59,8387	7,0904	31
	Kontrol	47,0000	2,4495	16
	Total	57,9241	8,4531	79

EK 5.**8. DEĞERLERİN ORTALAMASI: YAPRAK KURU AĞIRLIĞI****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: YAPKA

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	4,1525	,1187	4
	ASPV	3,9050	,2402	4
	Kontrol	4,0100	,2970	2
	Total	4,0250	,2177	10
Golden	ASGV	4,0300	,1663	4
	ASPV	3,9050	,3142	4
	Kontrol	4,1350	9,192E-02	2
	Total	4,0010	,2270	10
Summer red	ASGV	3,8525	,1413	4
	ASPV	3,8650	,3369	4
	Kontrol	3,7800	,2970	2
	Total	3,8430	,2354	10
Grany smith	ASGV	4,2750	,4685	4
	ASPV	4,2225	,2568	4
	Kontrol	4,4400	,4808	2
	Total	4,2870	,3577	10
Fuji	ASGV	4,3900	,4216	4
	ASPV	4,0400	,1510	3
	Kontrol	4,3700	,6081	2
	Total	4,2689	,3849	9
starking	ASGV	4,3600	,5975	4
	ASPV	4,1650	,3602	4
	Kontrol	4,5750	3,536E-02	2
	Total	4,3250	,4338	10
Vista bella	ASGV	4,1475	,1994	4
	ASPV	4,1250	,2247	4
	Kontrol	4,4100	,0000	2
	Total	4,1910	,2086	10
Galaxy gala	ASGV	4,2025	,1372	4
	ASPV	4,1600	,2728	4
	Kontrol	4,2900	,1980	2
	Total	4,2030	,1948	10
Total	ASGV	4,1763	,3357	32
	ASPV	4,0487	,2808	31
	Kontrol	4,2513	,3441	16
	Total	4,1414	,3229	79

EK 5.**9. DEĞERLERİN ORTALAMASI: ODUN DOKUSU KURU AĞIRLIĞI****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: ODUNKA

Elma cesitleri	Virus cesitleri	Mean	Std. Deviation	N
Jersey mac	ASGV	5,8175	2,217E-02	4
	ASPV	5,8500	,1074	4
	Kontrol	5,9450	4,950E-02	2
	Total	5,8560	8,195E-02	10
Golden	ASGV	5,8150	3,697E-02	4
	ASPV	5,6650	4,203E-02	4
	Kontrol	5,9000	2,828E-02	2
	Total	5,7720	,1034	10
Summer red	ASGV	5,9200	,1294	4
	ASPV	5,8775	8,655E-02	4
	Kontrol	5,9900	9,899E-02	2
	Total	5,9170	,1051	10
Grany smith	ASGV	5,8750	,3215	4
	ASPV	5,8650	,2063	4
	Kontrol	5,9400	,2546	2
	Total	5,8840	,2382	10
Fuji	ASGV	5,9525	2,217E-02	4
	ASPV	5,8867	,1305	3
	Kontrol	5,9850	2,121E-02	2
	Total	5,9378	7,839E-02	9
starking	ASGV	6,0525	4,646E-02	4
	ASPV	5,9675	7,455E-02	4
	Kontrol	6,1600	,0000	2
	Total	6,0400	9,043E-02	10
Vista bella	ASGV	5,9750	,1601	4
	ASPV	6,0450	,1509	4
	Kontrol	6,0950	7,071E-03	2
	Total	6,0270	,1361	10
Galaxy gala	ASGV	5,8450	8,226E-02	4
	ASPV	5,7250	6,856E-02	4
	Kontrol	5,9100	,0000	2
	Total	5,8100	9,899E-02	10
Total	ASGV	5,9066	,1469	32
	ASPV	5,8594	,1565	31
	Kontrol	5,9906	,1144	16
	Total	5,9051	,1511	79