



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NİN ÖNEMLİ ELMA YETİŞTİRİCİLİĞİ  
YAPILAN YÖRELERİNDE BAZI VİRÜS HASTALIKLARININ  
ELISA VE RT-PCR YÖNTEMİYLE TANILANMASI

YASEMİN ULUDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTAKYA

ŞUBAT-2007

Mustafa Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında, YLBK-0404 no'lu yüksek lisans öğrencisi Yasemin ULUDAĞ tarafından hazırlanan bu çalışma 01/02/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN

İmza

*K. Çağlayan*

Üye : Prof.Dr. Saadettin BALOĞLU

İmza

*S. Baloğlu*

Üye : Yrd.Doç.Dr. Çiğdem U. SERÇE

İmza

*Ç. Serçe*

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Kod No: **302**

İmza *Coskun Durgac*  
01/02/2007  
Yrd.Doç.Dr. Coskun DURGAÇ  
Enstitü Müdür Vekili

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Elma Mozaik Virüsü (ApMV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	4
2.2. Elma Klorotik Yaprak Leke Virüsü (ACLSV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	8
2.3. Elma Gövde Yivlenme Virüsü (ASGV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	12
2.4. Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (ASPV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Survey Çalışmaları .....	17
3.1.2. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar .....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Survey Çalışmaları ve Bitki Materyallerinin Toplanması.....	17
3.2.2. Bitki Materyalinin Muhafazası.....	18
3.2.3. ELISA Testinin Uygulanması.....	18
3.2.4. PCR Çalışmaları (Polymerase Chain Reaction= Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	19
3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu.....	19
3.2.4.2. Revers Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription).....	20
3.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	22
3.2.4.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Jel Elektroforez.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	25
4.1. Arazi Gözlemleri.....	25

	<b>Sayfa</b>
4.2. ELISA Testi Sonuçları.....	27
4.3 Örneklerin RT-PCR ile Testlenmesi ve ELISA Testi ile Kıyaslanması.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	44
EKLER.....	45
EK 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	45
EK 2. Nükleik Asit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	46
EK 3. Agarose Jel Elektroforez.....	47

## ÖZET

**BATI AKDENİZ BÖLGESİ'NİN ÖNEMLİ ELMA YETİŞTİRİCİLİĞİ  
YAPILAN YÖRELERİNDE BAZI VİRÜS HASTALIKLARININ ELISA VE  
RT-PCR YÖNTEMİYLE TANILANMASI**

Batı Akdeniz Bölgesi'nde 2005-2006 yıllarında yürütülen bu çalışmada Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma merkezinin damızlık blokları ile Korkuteli ilçesindeki bazı ticari elma bahçeleri Elma Mozaik Virüsü (*Apple Mosaic Virus*=ApMV), Elma Gövde Yivlenme Virüsü (*Apple Stem Grooving Virus*=ASGV), Elma Klorotik Yaprak Leke Virüsü (*Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*=ACLSV) ve Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (*Apple Stem Pitting Virus*=ASPV)'ne karşı ELISA ve RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. ASPV'ye karşı ticari antiserumun son yıllarda üretilmiş olması nedeniyle bu virüs sadece RT-PCR ile saptanmıştır. Arazi çalışmalarında sadece ApMV'nin tipik belirtileri olan yapraklarda mozaikleşme ve klorotik alanlar gözlenirken diğer virüslere ait hiçbir belirti saptanamamıştır. Toplanan 72 örneğin tamamı RT-PCR ile testlenmiş ve 29 örnek hem ELISA hem de RT-PCR ile testlenerek sonuçlar kıyaslanmıştır. ELISA testi ile bu örneklerin % 13.79'unun ApMV, % 31.03'ünün ASGV ve % 44.82'sinin ACLSV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. RT-PCR ile ise örneklerin % 40.28'inin ASGV, % 56.94'ünün ApMV, % 58.33'ünün ACLSV ve % 69.44'ünün ASPV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. ApMV, ACLSV ve ASGV açısından kıyaslanan 29 örneğin ELISA ile 16 tanesi en az bir virüs ile enfekteli bulunurken RT-PCR ile 28 bitki enfekteli olarak saptanmıştır.

Test edilen örneklerde en yaygın karışık enfeksiyon ACLSV+ASPV (% 44.44) olarak saptanırken bunu sırasıyla ApMV+ACLSV (% 38.89), ApMV+ASPV (% 37.5) ASGV+ASPV (% 33.33), ACLSV+ASGV (% 26.39) ve ApMV+ASGV (% 20.83) izlemiştir. ApMV+ACLSV+ASGV+ASPV dörütlü enfeksiyon oranı ise % 18.06 olarak saptanmıştır.

Bu çalışma elmalarda önemli dört virüs hastalığının Batı Akdeniz Bölgesi'nin çalışılan yörelerinde simptom göstermeyen ağaçlarda da çok yaygın olduğunu ve RT-PCR yönteminin bu virüslerin saptanmasında ELISA'ya göre çok daha başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

2007, 48 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Elma, ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV, RT-PCR, ELISA, Eğirdir, Korkuteli

## ABSTRACT

**IDENTIFICATION OF SOME VIRUS DISEASES IN IMPORTANT  
APPLE GROWING PROVINCES OF WEST MEDITERRANEAN REGION  
by ELISA and RT-PCR**

This study was conducted in Egirdir Horticulture Reserach Institute-Egirdir and commercial apple orchards in Korkuteli, located in West Mediterranean Region, in order to test *Apple Mosaic Virus*=ApMV, *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*=ACLSV, *Apple Stem Grooving Virus*=ASGV, *Apple Stem Pitting Virus*=ASPV by ELISA and RT-PCR. Because of commercial antisera has been recently produced against ASPV, the samples against to this virus were tested only by RT-PCR. During the field observations, only typical ApMV symptoms like mosaics and chlorotic spot on the leaves were recorded whereas not any symptoms for other three viruses were observed. Seventytwo samples were collected and all of them tested by RT-PCR whereas 29 samples out of 72 were tested both by ELISA and RT-PCR and the result were compared. ELISA result showed that that the infection rates for ApMV, ASGV and ACLSV were 13.79 %, 31.03 % and 44.82 %, respectively. When these samples were tested by RT-PCR the infection rates were 40.28 % for ASGV, 55.56 % for ApMV, 58.33 % for ACLSV and 69.44 % for ASPV. When 29 samples were compared by ELISA and RT-PCR for ApMV, ACLSV and ASGV, 16 samples were found to be infected by at least one virus by ELISA whereas 28 samples were infected when they were tested by RT-PCR.

The most common mix infections in tested samples were recorded as (44.44 %) ACLSV+ASPV, followed by ApMV+ACLSV (38.89 %), ApMV+ASPV (37.5 %), ASGV+ASPV (33.33 %), ACLSV+ASGV (26.39 %) and ApMV+ASGV (20.83 %), respectively. Mix infection rate of four viruses (ApMV+ACLSV+ASGV+ASPV) was 18.06 %.

By means of this research was revealed that, the most important four virus diseases are widespread and also have prevalent in symptomless plants in studied provinces of the West Mediterranean Region. Additionally RT-PCR method was proved to be more successful than ELISA to detect these viruses.

2007, 48 pages

**Key Words:** Apple, ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV, RT-PCR, ELISA, Egirdir, Korkuteli

## ÖNSÖZ

Yumuşak çekirdekli meyvelerde üretimi sınırlayan ve Avrupa ülkelerinin karantina listesinde yer alan önemli virüsler Elma Mozaik Virüsü (ApMV), Elma Klorotik Yaprak Leke Virüsü (ACLSV), Elma Gövde Yivlenme Virüsü (ASGV) ve Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (ASPV)'dir. Meyve ağaçlarında enfeksiyon yapan virüslerin tanılanmasında karşılaşılan en önemli sorunlardan bazıları; virüs konsantrasyonunun düşük olması, bir çok virüsün ağaçta düzensiz dağılımı ve ağaç dokusunda bulunan ve virüs gelişimini engelleyen fenolik bileşikler gibi maddelerin yoğun olarak bulunmasıdır. Bu olumsuz etkenlere ilaveten virüs semptomlarının diğer bazı etmenlerin neden olduğu belirtilerle (besin maddesi noksanlığı, böcek zararları, çevresel faktörler v.b.) sıkça karıştırılması ve bazı virüslerin ağaçlarda latent olarak bulunması da virüs tanısını zorlaştıran diğer faktörler arasındadır. Virüs hastalıkları ile etkin bir mücadele programının oluşturulabilmesi öncelikle virüslerin hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ile mümkündür. Yıllardan beri virüs tanısı amacıyla kullanılan biyolojik indeksleme yöntemi günümüzde hala yaygın olarak uygulanmakla birlikte zaman alıcı olması nedeniyle sınırlı olarak yada diğer tanı yöntemlerini desteklemek amacıyla kombineli olarak kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerden en yaygın kullanılanı ELISA ise gerek hassas gerekse hızlı bir tanı yöntemi olmasına karşın odunsu dokularda virüsün tanılanmasında bazen yanlış sonuçların alınmasına yol açmaktadır. Bu yöntemlerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla son yıllarda virüslerin tanılanmasında farklı PCR yöntemleri; hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ülkemiz elma yetiştiriciliği açısından önemli olan Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bazı damızlık ve ticari bahçeler, önemli dört virüs (ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV) hastalığına karşı ELISA ve RT-PCR ile testlenerek ülkemizin bu bölgesi hakkında bazı ön bulgular elde edilmiştir. Çalışmanın sınırlı olanaklarla yürütülmesi nedeniyle örnek sayısının bölgeyi tam olarak temsil etmemesine karşın çalışma sonucunda elde edilen yüksek enfeksiyon oranları son derece düşündürücüdür. Ülkemizdeki diğer elma damızlık merkezlerinin, gerek ülkemizde üretilen gerekse yurt dışından ithal edilen fidanların ve ticari bahçelerin güvenilir yöntemlerle testlenerek bu virüsler açısından ülkemizin genel ve kesin tablosunun çıkarılması önemli bir öncelik

olarak görülmektedir. Özellikle latent olarak bulunan ve üreticilerin fark etmesi oldukça zor hatta olanaksız olan bu virüs hastalıklarına karşı Tarım Bakanlığının acilen gerekli önlemleri alması zorunlu bir yaklaşım olacaktır. Bu çalışmada elde edilen veriler yakın gelecekte ülkemizde başlatılması acilen önerilen “Elma Sertifikasyon Programı” için önemli bir rehber niteliği taşımaktadır.

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, değerli fikir ve katkılarıyla ışık tutan ve yönlendiren danışman hocam, Sayın Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN’a (Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı Başkanı), laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan değerli hocalarım, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE ve Yrd.Doç.Dr. Mona GAZEL’e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana her konuda destek olan arkadaşım Zir.Müh. Şeyda ÖZDEMİR’e teşekkür ediyorum. Ayrıca tezimin her aşamasında ve hayatta beni her konuda destekleyen aileme sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
ApMV	<i>Apple mosaic virus</i>
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
ASPV	<i>Apple stem pitting virus</i>
bp	Baz çifti (base pair)
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorit (Calcium chlorite)
cDNA	Komplementer DNA (complementer DNA)
CP	Kılıf proteini (Coat protein)
°C	Santigrat derece
d <sub>2</sub> h <sub>2</sub> O	Çift destile su
Da	Dalton
DAS-ELISA	Double antibody sandwich-ELISA
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
ds-RNA	Çift sarmallı RNA (Double-stranded RNA)
dTTP	2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum bromid
EtOH	Ethanol
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IC	Immuno capture
KCl	Potasyum klorit
kDa	Kilo dalton
KOAc	Potasyum asetat

M	Molar
mg	Mili gram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mix	Karışım
ml	Mili litre
mM	Mili molar
µl	Mikro litre
NaI	Sodyum iyodür
NaCl	Sodyum klorür
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nano metre
nt	Nükleotid
ORF	Açık okuma ucu (Open reading frame)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Piko mol
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
RMV	<i>Rose mosaic virus</i>
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	Revers transkripsiyon
RT-PCR	Revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
S	Sedimentasyon katsayısı
TAE	Tris asetat EDTA
TSV	<i>Tomato streak virus</i>
UV	Ultraviyole
V	Volt

**ÇİZELGELER DİZİNİ****Sayfa**

Çizelge 3.1. ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV spesifik primer çiftleri.....	22
Çizelge 4.1. DAS-ELISA testi sonucunda belirlenen ApMV, ACLSV ve ASGV ile enfekteli örnek sayısı ve % enfeksiyon oranı.....	27
Çizelge 4.2. ELISA testi ile ApMV, ACLSV ve ASGV'ye karşı testlenen örneklerin absorbans değerleri (405 nm).....	28
Çizelge 4.3. Testlenen bitki materyallerinde RT-PCR testi ile belirlenen ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV ile enfekteli örnek sayısı ve % enfeksiyon oranı.....	31
Çizelge 4.4. Testlenen bitki materyallerinde RT-PCR testi sonucunda karışık enfeksiyon şeklinde belirlenen enfekteli bitki sayısı ve % enfeksiyon oranı.....	31
Çizelge 4.5. Testlenen bitki materyallerinde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV ile enfekteli örneklerin DAS-ELISA ve RT-PCR testi ile karşılaştırılması.....	32

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. Revers transkripsiyonun şematik olarak açıklaması.....	21
Şekil 3.2. PCR'ın şematik olarak açıklaması.....	23
Şekil 4.1. a-b) Isparta-Eğirdir ilçesindeki bir elma bahçesinde ApMV ile enfekteli olduğu saptanan 38 nolu ağaçtaki mozaik belirtileri ve kloroz c) Antalya-Korkuteli'nde bir elma bahçesinde ApMV ile enfekteli olduğu saptanan 4 nolu ağaçta özellikle bir bölümde yoğunlaşan mozaik belirtileri ve kloroz.....	26
Şekil 4.2. Araziden toplanan bazı elma örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri.....	35
Şekil 4.3. Araziden toplanan bazı elma örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri.....	36

## 1. GİRİŞ

Elma, çok geniş yayılma alanı gösteren ve değişik ekolojilerde üretimi yapılabilen bir türdür. Dünya elma üretimi yaklaşık 57 milyon ton civarındadır. Dünya’da en fazla üretim 19.5 milyon ton ile Çin’de gerçekleştirilmekte, ABD 5.1 milyon tonla ikinci sırada, Türkiye ise 2.5 milyon ton ile üçüncü sırada yer almaktadır. Yaklaşık 32 milyona varan meyve veren ağaç sayısı ile elmacılık ülkemizin önemli bir gelir kaynağı olup, büyük bir bölümü ülke içinde tüketilmektedir. Yaklaşık 24.658 tonu yurt dışına ihraç edilerek, 13.067.000 \$ gibi bir döviz girişi de sağlamaktadır. Ülkemizde elma yetiştiriciliği bakımından önemli bir potansiyele sahip olan Isparta ilinde üretilen elma toplam miktarın % 22’sini oluşturmaktadır. İldeki toplam 4.9 milyon meyve ağacının 3.2 milyonu yani % 65’i elma ağacından ibarettir. 490.000 ton yumuşak çekirdekli meyve üretiminin % 99’unu, tüm meyve üretiminin ise % 84’ünü elma oluşturmaktadır (ANONİM 2006a). 2004 yılı verilerine göre ise toplam yumuşak çekirdekli meyve üretimi 2.513.450 tondur. Elma 2.100.000 ton üretim ile yumuşak çekirdekli türler içinde birinci sırayı alırken bunu 320.000 ton ile armut, 80.000 ton ile de ayva izlemektedir (ANONİM, 2006b).

Kültür elması (*Malus communis* Lam.) yetiştiriciliği ülkemiz genelinde yapılmakta, ancak en uygun kültür merkezleri yabanisinin yayılma alanlarına paralel olarak Kuzey Anadolu’da bulunmaktadır. Karadeniz Kıyı Bölgesi, İç Anadolu ve Doğu Anadolu yaylaları arasındaki geçit bölgeleri ve son yıllarda Güneyde Göller Bölgesi elmanın önemli yetiştiricilik alanlarını oluşturmaktadır (ANONİM, 2006c).

Yetiştirilmesine ve tüketilmesine çok eski devirlerde başlanılan elma ılıman iklim meyveleri arasında başta gelmektedir. Kültür bitkilerinin orjini üzerinde çalışmalar yapan De Condolle 1883’de yayınladığı “Lorigine des Plantes Culturees” adlı eserinde bitkileri gruplandırarak elmayı 4000 yıldan fazla zamandan beri kültüre alınmış bitkiler arasında göstermiştir (ÖZBEK, 1978).

Yumuşak çekirdekli meyvelerde virüs, virüs benzeri ve fitoplazma hastalıklarının önemi büyüktür ve sayıları 40’ın üzerindedir (NEMETH, 1986). Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde (EPPO bölgesi) ise söz konusu hastalıkların sayısı elma ve armutlarda 20 civarındadır (ANONİM, 1992). Bu grup virüslerin bir kısmı genel olarak bitkide yapraklarda klorozlar, nekrozlar ve bitki büyümesinde duraklamaya, meyve verim ve

kalitesinde azalmaya sebep olarak ekonomik ömürlerinin azalmasına neden olurlar (NEMETH, 1986). Bununla birlikte bu meyve grubunu hastalandıran bazı virüsler ticari çeşitlerde gözle görülebilir semptom oluşturmazken sadece duyarlı konukçularda belirgin semptomlar oluşturmaktadır.

Yumuşak çekirdekli meyvelerde üretimi sınırlayan ve Avrupa ülkelerinin karantina listesinde olan dört önemli virüs bulunmaktadır. Bu virüsler: Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), Elma gövde yivlenme virüsü (*Apple stem grooving virus*, ASGV) ve Elma gövde çukurlaşma virüsü (*Apple stem pitting virus*, ASPV)'dür (MINK, 1989; DESVIGNES 1999). ApMV dışındaki üç virüs hastalığı ticari elma ve armut kültürlerinde çoğunlukla semptom oluşturmazlar. Bu nedenle de virüslerin yayılmasını önleme açısından bu virüslere karşı fidanların ve ağaçların testlenmesi son derece önemlidir. Yapılacak testlerde kalemler kadar anaç bitkilerin de test edilmesi gereklidir. Virüs hastalıkları ile mücadelede en etkili yöntemler; temiz materyal kullanmak, enfekteli ağaçların yok edilmesi, dayanıklı çeşit kullanmak, vektörlerle ve ara konukçularla mücadele etmektir. Mücadelede virüsün teşhisi en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Biyolojik indeksleme virüslerin tanınmasında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir yöntem olup mevsime bağlı ve zaman alıcıdır. Diğer bir yöntem olan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile virüslerin tespit edilmesi daha kısa sürede sonuç vermesi açısından daha elverişli olmakla beraber, bazı virüslere karşı henüz kullanımı sınırlıdır. Son yıllara kadar ASPV için ticari olarak üretilmiş bir antiserum bulunmazken (NEMCHINOV ve HADIDI, 1998); 2005 yılında Bioreba firması bu virüs için kit geliştirmiştir (ANONİM, 2005). Nükleik asit dizilerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması olan Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesinden sonra RT-PCR yöntemi meyve ağaçlarında hastalık yapan bitki patojeni virüslerin tanınmasında başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (SAIKI ve ark., 1985).

Ülkemizde uzun yıllardır elma ağaçlarında bazı zararlar gözlenmekle birlikte son yıllara değin virüs hastalıkları ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmamıştır. İç Anadolu Bölgesi'nde 1964 yılında meyve ağaçlarında virüs hastalıklarının belirlenmesi konusunda yapılan bir çalışmada elmalarda Green crinkle (Yeşil kırışıklık) ve Star crack (Yıldız çatlağı) hastalıkları semptomolojik olarak gözlenmiştir (SAHTİYANCI, 1964). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar da semptomoloji ve indekslemeyle sınırlı

kalmıştır (ÖZKAN ve KURÇMAN, 1976; NOGAY ve ark., 2001). Isparta yöresinde meyveleri küçülmüş bazı elma ağaçlarında simptomolojik gözlemler yapılarak alınan örnekler elektron mikroskobu ile incelenmiş ve biyolojik indekslemeler yapılmıştır. Bu örneklerde herhangi bir virüs veya fitoplazmaya rastlanmamıştır (ÇALI, 1992). Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'ndeki elma indikatörleri üzerine aşıl原因 bazı elma çeşitlerinin biyolojik indekslemesi sonucunda bu örneklerin bazılarının elma küçük meyvelilik hastalığı (apple chat fruit disease), elma yeşil kırışıklık hastalığı (apple green crinkle disease), armut taşlaşma hastalığı (pear stony pit disease) ve armut halkalı leke mozaik virüsü (*Pear ring pattern mosaic virus*) ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (NOGAY ve ark., 2001). Elma virüslerinin moleküler yöntemlerle tanımlanmasına yönelik ilk çalışma ÇAĞLAYAN ve ark. (2004) tarafından yapılmış ve 174 bitki örneği ELISA ve RT-PCR ile testlendiğinde elma ağaçlarının % 72.4'ünün en az bir virüs ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Isparta ilinde yapılan bir diğer çalışmada elma ağaçlarında klorotik mozaik belirtileri gözlenmiş ve bu örnekler DAS-ELISA testi ve RT-PCR ile testlenmiş ve 276 örneğin 82'si ApMV ile enfekteli bulunmuştur (YARDIMCI ve ark., 2006). Son bir yıl içinde bu çalışmalar büyük bir ivme kazanmış ve ülkemizin farklı bölgelerinden sonuçlar yayınlanmaya başlamıştır (ÇITIR ve İLBAĞI, 2006; YARDIMCI ve ark., 2006; BİRİŞİK ve ark., 2006; DURSUNOĞLU ve ERTUNÇ, 2006).

Bu çalışma ile ülkemizin önemli gen kaynaklarını içeren ve henüz testlenmemiş bir bölge olan Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki elma ağaçlarında görülen ve verimi önemli ölçüde etkileyen ApMV, ACLSV, ASGV'nin ELISA ve RT-PCR ile ASPV'nin ise sadece RT-PCR ile saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gerek damızlık bloklardaki yerli ve yabancı çeşitler, gerekse bu bölgede ticari olarak yetiştirilen çeşitler iki farklı teşhis yöntemi ile saptanarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Böylece bu bölgedeki önemli bazı yöreler için virüs hastalıklarının yaygınlık oranları belirlenerek olası bir sertifikasyon programında bu testlerin kullanım olanakları tartışılmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler yakın gelecekte ülkemizde başlatılması acilen önerilen "Elma Sertifikasyon Programı" için önemli bir rehber niteliği taşımaktadır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Elma Mozaik Virüsü (ApMV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar

ApMV'nin viral hastalık etmeni olarak ilk kez WHITE (1928) tarafından *Rosa* spp. (gül)'de; BRADFORD ve JOLEY (1933) tarafından *Malus domestica* (elma) bitkilerinde bildirildiği; hastalık etmeni böcekler ile ve olasılıkla tohum ile taşınmadığı; mekanik inokulasyon, aşı ve muhtemelen polen ile taşındığı ayrıca elma mozaik virüsünün en eski bilinen virüslerden biri olup, en yaygın olan elma virüs hastalığı olduğu belirtilmektedir (ANONİM, 2006d).

YARWOOD (1955) Tulare elma mozaik virüsünün *Ilarvirus* grubunun 'A' serolojik alt grubuna dahil olduğunu ve elmalar üzerinde ApMV'nin oluşturduğu simptomlara benzer belirtiler oluşmasına rağmen akrabalığı olmadığını bildirmiştir (NEMETH, 1986).

Serolojik çalışmalar ApMV'nin, *Prunus Necrotic Ring Spot Virus* (Prunus Nekrotik Halkalı Leke Virüsü) ile akraba olduğunu göstermiştir (NEMETH, 1986).

FULTON (1968); SENEVIRATNE ve POSNETTE (1970) Elma mozaik virüsünün gül mozaik ve erik çizgililik virüs hastalıkları ile çok benzer olduğunu serolojik testler ile kanıtladıklarını bildirmişlerdir (NEMETH, 1986). MINK, (1992) PNRSV'nin güllerde neden olduğu RMV (*rose mosaic virus*) hastalığına ApMV'nin neden olduğunu bildirmiştir. ApMV'nin 19 familyadaki 65'den fazla bitki türünde hastalık meydana getirebileceği bildirilmiş ve virüsün Amerika, Yeni Zelanda ve Avustralya'da gül yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın olarak bulunduğu kaydedilmiştir (CONVERSE ve BARTLETT, 1979).

Virüsün farklı biyolojik özellikleri olduğu bilinen pek çok ırkı bulunduğu ve bunlar arasında da virulens ve otsu konukçu dizisi bakımından farklılıklar olduğu bildirilmiştir (NEMETH, 1986). Birch line pattern virus, birch ringspot virus, Dutch plum line pattern virus, European plum line pattern virus, hop A virus, horse chestnut yellow virus, rose mosaic virus olarak sinonimleri vardır (BRUNT ve ark., 1996).

BRUNT ve ark. (1996) etmenin doğal konukçuları arasında en önemlilerinin; *Malus domestica* (elma) ve *Malus* spp. olduğunu bunun dışında *Rosaceae* (gülgiller) familyasından pek çok türde ve şerbetçi otunda enfeksiyon yapabileceği; ApMV



partiküllerinin 25-29 nm çapında yuvarlak olduğu 117, 88 ve 95S sedimentasyon katsayılı virionların % 16 nükleik asit % 84 protein içerdiği, genomunun tek sarmallı olduğu ve *Bromoviridae* familyasının 3. alt grubu içerisinde *Ilarvirus* cinsinde yer aldığı kaydedilmektedir.

MEIJNEKE ve ark. (1963) bazı virüs hastalıklarının doğrudan doğruya meyvede zarar yapmasına karşın, bazılarının hem ağacın gelişmesine ve verimine hem de meyve kalitesine zarar verdiğini; elmada ApMV'nin ağacın büyümesini % 50, gelişmesini % 20 oranında geriletliğini, meyve verimini % 30 oranında düşürdüğünü ayrıca virüsün olumsuz etkisinin elma fidanlarının gelişmesinde de görüldüğünü bildirmişlerdir (ÖZKAN ve KURÇMAN, 1976). POSNETTE ve CROPLEY (1956) ApMV'nin ekonomik yönden meyve verimine etkisinin uzun yıllar göz ardı edildiğini ve uzun süreli yapılan çalışmalar sonucunda virulent ırkın ürünü % 30-40 oranında azalttığını ifade etmişlerdir (NEMETH, 1986). ApMV dışındaki (ACLSV, ASGV ve ASPV) virüslerin elmalarda karışık enfeksiyon şeklinde bulunmaları durumunda % 60'a kadar varan oranlarda verim azalmasına neden olabileceği ifade edilmektedir (CAMPBELL, 1963; ZAHN, 1996). SUTIC ve ark. (1999) ApMV'nin yumuşak çekirdekli meyve ağaçları ve gül çeşitlerinde enfeksiyon yaparak ürünün yaklaşık % 20'sinin kaybedilmesine neden olduğunu bildirmişlerdir.

BAUMANN (1972) ApMV belirtilerinin; elma çeşidi, virüs ırkı ve virulensi ile çevre şartlarına bağlı olarak yıldan yıla değiştiğini ve yapraklarda sarımsı beyaz lekelenmeler, halkalı lekeler, kapalı lekeler, damar bantlaşmaları şeklinde görüldüğünü; kuvvetli güneş ışığında yapraklarda nekrozların oluştuğunu; hastalığın yapraklarda küçük sarı noktalar halinde de görülebileceğini ve belirtilerinin genellikle yazın erken aylarında görülerek sıcaklığın yükselmesiyle maskelenebileceğini ifade etmiştir (ÖZKAN ve KURÇMAN, 1976). Mozaik semptomlarının virüs ırkına ve çeşitlerin duyarlılığına bağlı olarak hem şiddetinde hem de görünümünde büyük değişiklik gösterdiği ifade edilmektedir; ayrıca virüsün hassas çeşitlerde soluk sarı damar bantlaşması veya krem renkli beneklenme oluşturduğunu, zamanla bu belirtilerin küçük veya büyük lekeler veya halkalı lekeler meydana getirebileceğini ve bu belirtilerin ilk dönemlerinin yaprak bitlerinin beslenme zararından kaynaklanan mozaik lekeleri ile ya da iz element eksikliklerinden kaynaklanan renk değişiklikleri ile karıştırılabileceği belirtilmektedir (NEMETH, 1986). KEGLER (1959) inkübasyon periyodunun

enfeksiyonun meydana geldiği mevsime bağlı olduğunu; yaz aylarında tomurcuklanan bitkilerin sadece takip eden ilkbaharda simptom gösterebileceğini, genç elma fidanlarının ve bazı ticari çeşitlerin ise mayıs veya nisan aylarında enfeksiyonu takip eden birkaç hafta içerisinde simptom gösterebileceğini bildirmiştir (NEMETH, 1986). BRUNT ve ark. (1996) ApMV'nin elma türlerinde mozaik, sert çekirdekli meyve ağacı türlerinde nekrotik halkalı leke, şerbetçi otunda ise klorotik lekeler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

DE SEQUEIRA ve LISTER (1969) ApMV'nin latex test ile SENEVIRATNE ve POSNETTE (1970) agar jel difüzyon testi ile serolojik olarak tespit edilebileceğini; latex testi ile teşhisin yapılmasında optimum zamanın nisan başlarından haziran ortasına kadar olduğunu ve son zamanlarda ELISA testi için en iyi kaynağın mayıs ayında alınan çiçek ve yapraklar olduğunu ifade etmektedirler (NEMETH, 1986).

ApMV'nin moleküler seviyede karakterizasyonu çalışmalarında ALREFAI ve ark. (1994) *in vitro* koşullarda poliadenil bağladıkları ApMV RNA3'ünün oligo(dT) ve spesifik primerler kullanarak cDNA'sını elde etmişler; daha sonra plazmid vektörde klonlayarak ApMV subgenomik RNA4 nükleotid dizilerini açıklamışlardır. Araştırmacılar, RNA4'ün 666 nt'den oluşan bir açık okuma alanı (open reading frame; ORF) içerdiğini, 5' ucunda 55 nt, 3' ucunda ise 264 nt'i kapsayan transle edilmeyen bir bölgenin tespit edildiğini bildirmişlerdir

SANCHEZ-NAVARRO ve PALLAS (1994) ApMV'nin RNA4'ünün baz dizilerini klonlanmış cDNA'dan elde etmişler ve 891 nt uzunluğundaki kısmın protein kılıf (CP) genine karşılık geldiğini ve 226 amino asit kodlayabildiğini ayrıca bu bölgenin *alfalfa mozaik virus* (AIMV) ile *tütün çizgi virusu* (TSV)'ne analog olduğunu bildirmişlerdir.

SHIEL ve ark. (1995) ApMV elma izolatlarının RNA3'ünün tüm nükleik asit dizisini açıklayarak 2056 nt uzunluğunda olduğunu ve iki ORF kodladığını bildirmişler; RNA3'ünün büyüklük ve genom organizasyonunun diğer *Bromoviridae* familyası üyeleri ile benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir.

SHIEL ve BERGER (2000) ApMV'nin RNA1 ve RNA2'sinin tüm nükleotid bazlarını belirlemişler ve karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar, ApMV RNA1'inin 3476 nt uzunluğunda olduğunu ve tek bir büyük ORF kodladığını, RNA2'nin ise 2979 nt uzunluğunda ve tek bir ORF kodladığını bildirmişlerdir. RNA1 ve RNA2'nin diğer

*ilarvirus*lerin baz dizilerine çok benzerlik gösterdiği ancak daha çok AIMV ile aynı baz dizilerine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

POSNETTE ve CROPLEY (1956); HOLMES (1960) ApMV'nin kontrolü için sağlıklı üretim materyali kullanılması gerektiğini; aşı kalemlerinin 36 °C sıcaklıkta 3 ile 10 hafta bekletilmesi durumunda bozulmadan kalarak virüs konsantrasyonunun azaldığını bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

KURÇMAN (1977) Türkiye'de kültür bitkilerinde bulunan virüs hastalıklarını incelemiş ve yaptığı çalışmalar sonucunda yumuşak çekirdekli meyve virüslerinden ApMV'nin elma ve armut çeşitlerinde bulunduğunu bildirmiştir.

SİPAHİOĞLU ve ark. (2001) Amerika, Yeni Zelanda ve Avustralya'da gül yetiştirilen alanlarda yaygın olan ApMV'nin Türkiye'de Doğu Akdeniz Bölgesi'nde kesme gül yetiştiriciliği yapılan bölgelerdeki yaygınlığı üzerine yapmış oldukları serolojik çalışmalarda testlenen örneklerin hiçbirinde ApMV enfeksiyonuna rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

ÇAĞLAYAN ve ark. (2004) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde testlenen 174 bitkide ApMV'nin koleksiyon bahçelerindeki yaygınlığını ELISA ile % 2.3, RT-PCR ile % 6.38 olarak bulmuşlardır. Buna karşı ticari bahçelerde ELISA ile hiçbir enfeksiyon saptanamazken RT-PCR ile % 10 oranında bulaşıklık saptamışlardır.

SÖKMEN ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada fındıkta ApMV semptomu göstermeyen bitkilerin ELISA da pozitif, semptomlu bitkilerin ise negatif sonuç vermesi sonucu DAS-ELISA yönteminin, yaprak örneklerinde virüsün saptanması açısından yeterince hassas bir yöntem olmadığını ifade etmişlerdir. Ayrıca Mayıs-haziran 2002-2003 döneminde Samsun'da fındık üretiminin yoğun olarak yapıldığı Çarşamba, Salıpazarı ve Terme ilçelerine bağlı 28 köyde toplam 62 bahçede ApMV ile bulaşıklık durumunun belirlenmesi için 10 ocakta topladıkları 620 örneği DAS-ELISA yöntemi ile test etmişler ve örneklerin ilçelere göre % 10-18.3 arasında değişen oranlarda ApMV ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir.

DURSUNOĞLU ve ERTUNÇ (2006) ApMV'nin teşhisi amacıyla Türkiye'de farklı bölgelerden aldıkları elma, armut ve ayvaların yaprak ve sürgün örneklerini DAS-ELISA yöntemiyle testlemişler ve örneklerin % 29.75'inin ApMV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır.

SÖKMEN ve ark. (2006) fındık ve farklı yabancı otlardan *Scandix sp.*(venüs tarağı), *Artemisia vulgaris L.* (adi pelin), *Campanula sp.* (çañçiçeğı), *Galeopsis sp.*, *Salvia verbenaca L.* (çimen adaçayı), *Prunella sp.* (dağ eriğı), *Clematis vitalba L.* (ak asma) ve *Rubus canencens L.* (böğürtlen) elde edilen ApMV izolatlarını fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisine inokule ederek sakladıklarını ve örneklerden izole ettikleri RNA'ları RT-PCR ile testlediklerinde beklendiğı şekilde 620 bp büyüklüğünde bantlar elde edildiğini ve karakterizasyonlarını yaptıklarını bildirmişlerdir.

## 2.2. Elma Klorotik Yaprak Leke Virüsü (ACLSV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar

ACLSV elmalarda tanımlanan ilk latent virüs olup, LUCKWILL ve CAMPBELL (1959) tarafından İngiltere'de *Malus platycarpa line pattern virus* olarak adlandırılmıştır; MINK ve SHAY (1959) ABD'de virüsün elma klorotik yaprak leke olarak bilindiğini ve Rus elma anaç klonlarında (R12740-7A) virüs simptomlarının görüldüğünü; CROPLEY ve ark. (1963) ise ACLSV'nin ayva anaçlarında mozaik belirtileri oluşturduğunu bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

ACLSV viral hastalık etmeni olarak ilk kez *Syringa vulgaris* (leylak) bitkisinde BRUNT (1978) tarafından bildirilmekte; en önemli belirtilerinin bitki üzerinde klorotik lokal lezyonlar meydana gelmesi ve bu lekelerin zamanla birleşerek daha büyük lekeler oluşturup hat şekline dönüşmesi olduğu belirtilmektedir (ANONİM, 2006e).

Virüs saflaştırılmasında en uygun method 1971'de LISTER ve HADIDI tarafından bildirilmiş, ancak 1973'de DUNEZ ve ark. *Prunus* türlerindeki izolatların saflaştırılmasında bazı değişiklikler yaptıklarını belirtmişlerdir (NEMETH, 1986).

CHAIRES ve LISTER (1973) biyolojik ve serolojik özellikler bakımından ACLSV'nin 2 elma ve 1 şeftali izolatında farklı olduğunu, YANESE ve ark. (1975) farklı tipteki ACLSV izolatlarının Hopa ve Maruba anaçları üzerinde simptom göstermediğini; MARENAUD ve ark. (1976) ise farklı gruptaki izolatlarla çalıştıklarını ve ACLSV izolatlarının otsu ve odunsu konukçular üzerinde serolojik olarak karakteristik simptomlar meydana getirdiğini; DETIENNE ve ark. (1980) da 13 farklı meyve türündeki 9 farklı ırkı izole edip çalıştıklarını ve ACLSV izolatları arasında zayıf serolojik ilişki olduğunu ELISA testi ile saptadıklarını bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

LISTER (1970) ACLSV'nin doğal konukçularının çoğunun *Rosaceae* (gülgiller) familyasına ait olduğunu, yumuşak çekirdekli meyvelerden doğal konukçuları arasında *Cydonia oblonga* (ayva), *Malus pumila* (cennet elması), *Mespilus germanica* (muşmula) ve *Pyrus communis* (armut) bulunduğunu; sert çekirdekli meyvelerden doğal konukçuları arasında *Prunus armeniaca* (kayısı), *P. avium* (kiraz), *P. cerasus* (vişne), *P. cerasifera* (kırmızı erik), *P. domestica* (erik), *P. persica* (süs şeftalisi) ve *P. salicina* (japon eriği) bulunduğunu; diğer konukçuları arasında ise *Amelanchier canadensis* (taş armudu), *Chaenomeles* sp.(çiçek açan ayva bahardalı çalı), *Crateagus monogyna* (alıç), *C. ozyacantha* (fil bahar), *Prunus spinosa* (çakal eriği) ve *P. tomentosa* (çalı vişne) olduğunu ifade etmiştir (SUTIC, 1999).

SAKSENA ve MINK (1969); KEGLER (1977) otsu konukçu bitkiler arasında; *Beta vulgaris flavescens*, *Chenopodium album* (sirken), *C. amaranticolor* (kırmızı kazayağı), *C. botrys* (kazayağı), *C. quinoa* (ak kazayağı), *C. rubrum*, *Cucumis sativus* (hıyar), *Nicotiana tabacum* (tütün), *Petunia hybrida* (petunya), *Phaseolus vulgaris* (fasulye) ve *Pisum sativum* (bezelye) olduğunu ifade etmişlerdir (NEMETH, 1986).

CADMAN (1965); LISTER ve ark. (1965) yaptıkları çalışmalar sonucunda ACLSV'nin sadece yumuşak çekirdekli meyveleri etkilemediği aynı zamanda sert çekirdekli meyvelerde de hastalık oluşturabildiğini bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

GILMER ve MINK (1971); MINK ve ark. (1971) bazı latent ACLSV izolatlarının *Malus* türleri üzerinde simptom göstermezken *Chenopodium quinoa* indikatörleri üzerinde simptom gösterebileceğini bildirmişlerdir (NEMETH, 1986). DESVIGNES ve ark. (1991) ACLSV'nin indikatör bitkilerden *Chenopodium amaranticolor* (kırmızı kazayağı) ve *C. quinoa* (ak kazayağı) da lokal yaralar ve sistemik lekeler; *Phaseolus vulgaris* cv. *Top crop* da kahverengi–mor lokal yaralara, *Prunus persica* (cv Elberta ya da GF 305) ve *P. tomentosa* (çalı vişne) fidelerinde koyu yeşil çökük beneklenme belirtilerine, *Cydonia vulgaris* C 7/1 de klorotik yaprak lekesi belirtilerine, deformasyonlara ve damarlarda şişkinliklere neden olduğu ayrıca *Pyronia veitchii* çeliklerinin ACLSV'nin ırklarına hassas olduğu ifade edilmektedir (SUTIC, 1999).

LUCKWILL ve CAMPBELL (1963) İngiltere'de yaptıkları çalışmalarda elma anaç klonlarında virüsün bulunduğunu ayrıca M2, M4, M7, M9 ve M15 anaçlarının virüsle tamamen enfekteli olduğunu diğerlerinin (M1, M12 ve M16) ise kısmen

enfekteli olduğu ve M26 anacında herhangi bir enfeksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir (SUTIC, 1999).

MARENAUD ve ark. (1976) ACLSV'nin farklı konukçularda farklı simptomlar meydana getirdiğini ve bazı ACLSV ırklarının tüm konukçuları enfekte edebilirken bazılarının ise elmadan sert çekirdekli meyve ağaçlarına zor taşındığını bildirmişlerdir. Irk düzeyindeki gruplandırmalarda da hem konukçulardaki simptom gelişimini hem de serolojik akrabalıkları dikkate aldıklarını bildirmişlerdir (SUTIC, 1999).

LISTER ve BAR-JOSEPH (1981) ACLSV virionlarının ipliksi, çok kıvrımlı, radyal simetrik olduğunu; partiküllerin büyüklüğünün izolata, konukçu bitkiye ve diğer teknik faktörlere bağlı olduğunu ayrıca uzunluğunun 700-825 µm, genişliğinin 12 µm olduğunu bildirmektedirler (NEMETH, 1986). LISTER (1970) ACLSV partiküllerinin 600 x 12 nm olduğunu; GERMAN ve ark. (1991) 720–740 x 12 nm büyüklüğündeki iplikçiklerden meydana geldiğini; çökelme katsayısının 96 S olduğunu, DELBOS ve DUNEZ (1988) tek polipeptid içeren protein kılıfın 23.5 kDa ağırlığında olduğunu; GERMAN ve ark. (1991) tek sarmallı RNA'ya sahip 7555 nükleotidden ve 2500 kDa ağırlığında olduğunu, LISTER ve BAR-JOSEPH (1981) ise 2200–2400 kDa ağırlığında olduğunu ifade etmişlerdir (SUTIC, 1999).

CROPLEY (1968) mekanik taşınmada meyvelerin, GILMER ve MINK (1971) ise çiçek taç yapraklarının yapraklardan daha iyi inokulum kaynağı olduğunu ayrıca kambiyal dokuların da inokulum kaynağı sayıldığını bildirmişlerdir (NEMETH, 1986). MC CRUM (1965) komşu ağaçlar arasında virüsün yayılmasının kök kaynaşması ile veya yaprak sürtünmesi ile meydana gelen mekanik yaralanmalar sonucunda olduğunu ifade etmektedir (NEMETH, 1986). ACLSV'nin yayılma koşullarının incelendiği ancak taşınma şeklinin henüz bilinmediğini; FRITZCHE ve KEGLER (1968) virüsün Eudorylamoid nematodlar ile taşındığını, SUTIC (1981) ise virüsün *Myzus persicae* (Şeftali yaprak biti) ile taşındığını bildirmektedirler (SUTIC, 1999). FRINDLUND (1973) ACLSV'nin bir odunsu bitkiden diğerine göz aşısıyla rahatlıkla taşınabildiğini ancak enfekteli ağaçlarda eşit dağılım göstermediğini; FRINDLUND (1983) kısa aşı kalemlerinin (5-10 tomurcuk uzunluğunda) genellikle sistemik enfeksiyonlara sebep olduğunu daha uzunlarının (20-40 tomurcuk uzunluğunda) ise uç kısımlara doğru sağlıklı tomurcuklar içerdiğini, bu nedenle de inokulasyonlar için kısa kalemlerin daha uygun olacağını ve kalemin alt kısmında bulunan gözlerin veya kabuk parçalarının

alınarak indikatör bitkilere aşılama yapılması gerektiğini bildirmiştir (NEMETH, 1986). DELBOS ve DUNEZ (1988) ACLSV'nin odunsu bitkilerden otsu bitkilere genç yapraklar, meyveler, tomurcuklar ve bitki öz suyu ile mekanik olarak taşınabileceğini, ayrıca meyve ağaçlarındaki enfeksiyonun belirlenmesinde gerek arazi koşullarında gerekse araştırma amaçlı kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (SUTIC, 1999).

LISTER ve BAR-JOSEPH (1981); THOMAS (1983) bentonit yardımıyla saflaştırılmış *Chenopodium quinoa* (ak kazayağı) öz suyunda virüsünün ömrünün 20 °C'de 1 gün ve +4 °C'de 10 gün olduğunu, termal inaktivasyon noktasının 52-55 °C, son sulandırma noktasının  $10^{-4}$  olduğunu bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

SAKSENE ve MINK (1969) elma çiçek taç yapraklarından aldıkları materyallerde virüsün tespit edilebilmesi için halka çökme testini, LISTER ve HADIDI ise (1971) gel düfüzyon testini kullanmışlar; ayrıca KERLAN ve ark. (1981) immunosorbent elektron mikroskopunun ELISA'ya benzer hassas bir metot olduğunu ifade etmişlerdir (NEMETH, 1986).

CAMPBELL ve BEST (1964) virüsten ari materyallerin çoğaltma amacıyla kullanılması gerektiğini ve bu tür materyallerin elde edilebilmesi için de bitki parçalarının 37-38 °C sıcaklığa maruz bırakılması gerektiğini ve en iyi sonucun sürgün ucu aşılama yapılarak alınabileceğini belirtmişlerdir (NEMETH, 1986).

CIESLINSKA ve RUTKOWSKI (2006) ACLSV ile enfekteli olan ve M9 anacı üzerine aşılama yapılan "*Sampion*" ve "*Golden delicious*" elma çeşitlerini sağlıklı olanlara göre değerlendirdiklerinde verim azalması saptadıklarını ve M26 anacı üzerine aşılama yapılan sağlıklı veya enfekteli ağaçların meyvelerinde önemli bir fark bulunmadığını, ayrıca anaçlardan bağımsız olarak meyve ağırlığı sağlıklı ağaçlarda enfekteli olanlara göre daha fazla bulunduğunu ifade etmişlerdir.

ÖZDEMİR ve KAYA (2006) İzmir'de yaptıkları bir çalışmada sertifika ve karantina programları çerçevesinde ithal ettikleri örneklerden 114 tanesini farklı virüslere karşı ELISA ile testlediklerini belirtmişlerdir. 26 elma anacı ve 17 aşılama yapılmış bitkiyi ApMV ve ACLSV'ye karşı; 5 armut anacı ve 6 aşılama yapılmış bitkiyi ise ACLSV'ye karşı testlediklerinde örneklerin tümünün testlenen virüsler açısından temiz bulduklarını bildirmişlerdir.

ÇITIR ve İLBAĞI (2006) DAS-ELISA testi sonucunda 4 tane *M. pumila* (cennet elması) ağacından bir tanesini ACLSV ile bir tanesini de ApMV ile enfekteli

bulduklarını bildirmişler, ayrıca ApMV'nin kültür bitkileri dışında böğürtlen, muşmula ve alıçda da bulunduğunu belirterek Tekirdağ yöresi için potansiyel inokulum kaynakları olduklarını ifade etmişlerdir.

### 2.3. Elma Gövde Yivlenme Virüsü (ASGV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar

ASGV viral hastalık etmeni ilk olarak *Malus sylvestris* cv. Virginia Crab elma ağacında LISTER ve ark. (1965) ve DE SEQUEIRA (1965) tarafından bildirilmekte; mekanik inokulasyon, aşı ve *Chenopodium quinoa* bitkisinin tohumları (%10-20) ile taşınabildiği; hastalık belirtilerinin Virginia Crab elma ağacının gövdesinde yivlenme ve aşı yerlerinde anormal oluşumlar şeklinde görüldüğü, ayrıca viral etmenin tütün ve fasulye bitkilerinde de hastalık meydana getirebileceği bildirilmektedir (ANONİM, 2006f).

Patojen aynı yıl içerisinde iki farklı isimle tanımlanmaktadır; LISTER ve ark. (1965) *Chenopodium quinoa*'yı kullanarak elma latent tip 2 (C-431 izolat) ismini kullanmışlar; DE SEQUEIRA (1965) otsu bitkilerden *Nicotiana glutinosa* ve *C. quinoa* ile Virginia Crab elma indikatörlerine aşılıyarak ve ASPV'den ayırt etmek için E36 virüs kodunu kullanmışlardır; daha sonra DE SEQUEIRA ve POSNETTE (1969) ise elma gövde yivlenme virüsü (*Apple stem grooving virus*) ismi ile adlandırdıklarını; DE SEQUEIRA ve LISTER (1969)'da elma latent tip 2 olarak tanımladıklarını; WATERWORTH ve GILMER (1969) ABD'de *Chenopodium quinoa*'da bilinen koyu yeşil epinasty virüsün gövde yivlenme virüsü olduğunu bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

ASGV'nin konukçu bitkileri arasında; *Malus pumila* (cennet elması), *M. sylvestris* (elma) ve *Pyrus communis* (armut) bulunmakta, VAN DER MEER (1975, 1976) diğer konukçu bitkileri arasında odunsu bitkilerden; *Aronia melanocarpa*, *A. prunifolia*, *Cotoneaster bulata*, *C. simonsi*, *C. acutifolia*, *C. dielsiana*, *Sorbus aucuparia* (yabani üvez) ve *Pyronia veitchii*'nin bulunduğunu; LISTER ve ark. (1965); WATERWORTH ve GILMER (1969) otsu konukçu bitkiler arasında; *Amaranthus retroflexus* (kırmızı köklü tilki kuyruğu), *Ammi majus* (büyük kürdanotu), *Antirrhinum majus* (aslan ağzı), *Chenopodium amaranticolor* (kırmızı kazayağı), *C. quinoa* (ak kazayağı), *Cucumis sativus* (hıyar), *Cucurbita maxima* (bal kabağı), *Gomphrena globosa* (medine çiçeği),



*Nepeta cataria* (kedi nanesi), *Nicotiana glutinosa* (tütün), *N. rustica* (maraş otu), *Phaseolus vulgaris* (fasulye), *Sesbania sp.*, *Tetragonia expansa* (Yeni Zelanda ıspanağı), *Torenia fournieri* ve *Vigna sinensis* (börülce) bulunduğunu, simptom göstermeyen konukçuları arasında; *Datura stramonium* (boru çiçeği), *Nicotiana clevelandii* (tütün), *N. tabacum* (tütün) ve *Petunia hybrida* (Petunya) bulunduğunu bildirmektedirler (NEMETH, 1986).

ASGV'nin ticari elma anaç ve çeşitlerinde latent enfeksiyonlara sebep olduğu ve sadece indikatör bitkilerde simptom gösterdiği, Virginia Crab'da sebep olduğu simptomlardan sonra ASGV adını aldığı; aşılamaı takiben ikinci yazın sonunda enfekteli Virginia Crab elma ağacının gövde çapının azalarak gövdede çukurlaşmaların olduğu, ayrıca aşı noktasından kabuk kaldırıldığında uzunlamasına çukurların göze çarptığı; E36 virüs ırkında aşı noktasında şişkinlik belirtilerinin görüldüğü, kabuk dokusunda düz, bunun altındaki odun dokusunda ise çökük ve düz alanların oluştuğu; enfekteli sürgünlerin normal sürgünlere göre daha geniş açılı ve dikeye yakın olduğu ve normal sürgünlerde aç 33-39° iken enfekteli olanlarda 53-65° olduğu; fidanların aşı birleşim noktasından kolayca kırılabilceği bildirilmektedir (NEMETH, 1986). Floem ve ksilemin nekrozlaşmasından dolayı aşı birleşim noktasının hemen üstünde kahverengi bir hat oluşmakta ve bu simptomlara dayanarak bazı Amerikalı araştırmacılar 'kahverengi hat' virüs hastalığı olarak adlandırmışlardır. Ayrıca C-431 ırkının sadece gövde çukurlaşmalarına sebep olduğu, kahverengi hat oluşturmadığı ve bazı virüs izolatlarının Virginia Crab'dakine benzer simptom meydana getirmeyken *Chenopodium quinoa* indikatör bitkisinin kullanılması ile saptanabileceği ifade edilmektedir (NEMETH, 1986). YANASE (1983) latent virüslerin tek başına ticari elma çeşitlerindeki öneminin henüz bilinmediğini bildirerek ASGV'nin *Malus sieboldii* ve *M. arborescens* üzerine yapılan inokulasyonlarda ağaçların ölüme yaklaşmasına sebep olduğunu ifade etmiştir (NEMETH, 1986).

ASGV'nin bir odunsu bitkiden diğerine göz aşısı ve yonga aşı ile taşınabileceği; inokulumun köklerden alınmasıyla simptomların daha iyi gözlenebileceği ve virüsün Virginia Crab elma ağacında sistemik enfeksiyon meydana getirmediği, bu nedenle de teşhisinde enfekteli sürgünlerin aşılamaı ile yapılması gerektiği ifade edilmiştir (NEMETH, 1986).

Bentonit yardımıyla saflaştırılmış *Chenopodium quinoa* öz suyunda virüsün ömrünün 20 °C'de 2 gün ve 4 °C'de 27 gün olduğu; termal inaktivasyon noktasının 60-63 °C ve son sulandırma noktasının  $10^{-4}$  olduğu; virionların ipliksi, çok kıvrımlı 600-700 x 12 nm büyüklüğünde, sedimentasyon katsayısının 112S olduğu bildirilmektedir (NEMETH, 1986).

Elma virüslerinin teşhisinde ELISA ve biyolojik indekslemenin bazı dezavantajlarının olduğu ve bu nedenle de RT-PCR tekniğinin ASGV, ApMV, ACLSV ve ASPV'nin teşhisinde başarıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (JELKMANN, 1994; MACKENZIE ve ark., 1997). MASSART ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada ASGV, ApMV, ACLSV ve ASPV'yi saptamak için duplex RT-PCR protokolünü geliştirmişler ve normal RT-PCR yöntemi ile kıyaslamışlardır. Her iki testte de virüs RNA'sının  $10^6$  kez seyreltildiğinde bile saptanabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca enfekteli bir örneğin 79 tane sağlıklı örnekle karıştırılıp duplex protokole göre testlenmesi durumunda başarılı bir şekilde saptanabildiğini ve normal RT-PCR protokolü ile % 96 oranında bir benzerlik olduğunu ifade etmişlerdir.

CAMPBELL (1968) ASGV'nin kontrolünde sağlıklı üretim materyali kullanılması gerektiğini ve sürgünlerden virüsün elemine olabilmesi için birkaç hafta 37 °C sıcaklıkta tutulması gerektiğini ileri sürmüştür (NEMETH, 1986).

ÇAĞLAYAN ve ark. (2004) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde özellikle simptomsuz ağaçlarda elma virüslerinin oldukça yaygın olduğunu RT-PCR yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada ilk kayıt olarak bildirmişlerdir. Dört önemli elma virüsünün yaygınlığını RT-PCR yöntemi ile belirleyerek hastalığın damızlık materyallerle kurulan çeşit bahçelerinde yaygınlık oranının % 70.21 olduğunu, ticari bahçelerde ise bu oranın % 75 olduğunu belirtmişlerdir (ÇAĞLAYAN ve ark., 2006).

BİRİŞİK ve ark. (2006) Adana, Kahramanmaraş, Antalya ve Osmaniye bölgelerindeki 93 bahçedeki 9 çeşitten toplam 338 örneği rastgele topladıklarını ve örnekleri ELISA, biyolojik indeksleme ve RT-PCR ile testlediklerini bildirmişlerdir. Tüm örnekleri ApMV, ASGV ve ACLSV için ELISA testine tabi tuttuklarını ve test sonucunda enfeksiyon oranını % 36 bulduklarını belirtmişlerdir. ELISA testi sonucunda ACLSV % 18, ASGV % 12 ve ApMV % 4, karışık enfeksiyonu ise % 5 oranında bulduklarını ve Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki elma ağaçlarında virüs enfeksiyonunun yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir.

#### 2.4. Elma Gövde Çukurlaşma Virüsü (ASPV) İle İlgili Yapılan Çalışmalar

ASPV viral hastalık etmeni ilk olarak SMITH (1954) tarafından *Malus sylvestris* bitkisinde bildirilmiştir ve hastalık etmeninin böcekler ile taşınmadığı mekanik inokulasyon ve aşı ile taşınabildiği ayrıca tohum, polen ve bitkilerin birbirine teması ile de taşınmadığı bildirilmektedir; ayrıca *Malus sylvestris* ticari çeşitlerinin Virginia Crab ve *M. sieboldii* gibi duyarlı anaçlara aşılınmaları sonucunda geriye doğru zayıflama gösterdiği, *Malus sieboldii* de geriye doğru ölüm ve iç kabuk nekrozlarının meydana geldiği; *Malus sieboldii* var. *arborescens* yapraklarında ise epinasti ve iç kabuk kararmalarının meydana geldiği ifade edilirken virüsün Avrupa ülkelerinin birçoğunda bildirildiği belirtilmektedir (ANONİM, 2006g).

Hastalık ilk defa Amerika'da bu yüzyılın ilk yarısında bazı soğuğa tolerant anaçlarda görülmüştür; Virginia Crab üzerine aşılana ağaçların kısa bir süre içerisinde ölmeye başladığı, gövde üzerinde ilk kez görülen derin çukurların ilk önceleri aşı kalem uyumsuzluğundan kaynaklandığı düşünülmüş, ancak patojenin sürgün ve kabuk dokularının aşılansıyla taşımının gerçekleştiği görüldüğünde bunun virüs karakterinde olduğunu bildirmişlerdir (NEMETH, 1986).

ASPV'nin doğal konukçu bitkileri arasında; *Malus pumila* (cennet elması), *M. Sieboldii*, *M. Sieboldii* var. *arborescens*, *M. Sylvestris* ve *Pyrus communis* (armut) olduğu; Cüce Crab tipi *Malus sylvestris* anaçlarının Red River Crab, Beauty Crab, Robin Crab, Sugar Crab, Columbia Crab olduğu ve bu anaçların virüse çok hassas olduğu ifade edilmiştir (NEMETH, 1986).

ASPV'nin, virüs/virüs benzeri ve fitoplazma hastalıklardan ApMV, elma çoklu sürgün (apple proliferation), elma küçük meyvelilik hastalığı (apple chat fruit), elma yeşil kırışıklık (apple green crinkle) hastalığı ve elma lastiksi gövde (apple rubbery wood) hastalığı gibi meyve küçülmesine neden olduğu bildirilmektedir (NEMETH, 1986).

YANASE ve ark. (1975) *Malus sieboldii* ve *M. sieboldii* var. *arborescens* anaçları üzerinde çoğaltılan elma ağaçlarına tekrar aşılama yapıldığında bazı ağaçların ölüme yaklaştığını bildirerek, 'top-working' hastalığı adını vermişlerdir (NEMETH, 1986).

YANASE (1983) son zamanlarda yaptığı çalışmalarda iki anaç çeşidinin aşı birleşim noktasında görülen nekroz ve ölümlere ASPV'nin neden olduğunu ayrıca ASPV'nin sadece Virginia Crab anacı üzerine aşılı olan ağaçlarda dikkate değer zarar meydana getirdiğini, hatta ağaç ölümlerine sebep olduğunu belirterek Crab tipi anaçlar üzerine aşılı olmayan ağaçlarda simptom görülmediğini, çünkü ticari çeşitler ve diğer anaç çeşitlerin virüs tarafından latent olarak enfekteli olduğunu ifade etmektedir (NEMETH, 1986).

RICH (1967) ASPV'nin meyve bahçelerinde komşu ağaçlar arasında kök kaynaşmasıyla taşınabildiğini; kalem ve göz aşısı ile yayıldığını ve inkübasyon periyodunun 1 yıl olduğunu belirtmiştir (NEMETH, 1986).

Çekoslovakya elma bahçelerindeki ASPV ve ASGV ile enfekteli elma ağaçları tek basamak RT-PCR yöntemiyle testlendiğinde ASPV ile bulaşıklık oranı % 28, ASGV ile % 44 olarak bulunmuştur. Karışık enfeksiyon oranı % 17 olarak belirlenmiştir. Bu virüslerin teşhisi için en iyi materyalin yaprak dokusu, dormant tomurcuk yada çiçeklenme dönemindeki yapraklar olduğu ifade edilmiştir (KUMAR-KUNDU, 2006).

HASSAN ve ark. (2006) toplam 60 örneği ACLSV, ASGV ve ApMV için ELISA ile ve ASPV'yi de içeren dört virüs için Pentaplex RT-PCR ile testlemişler ve enfekteli örnek sayısını PCR ile daha fazla bulduklarını bildirmişlerdir.

ASPV'nin kontrolünde sağlıklı üretim materyali kullanılması gerektiği; bitkilerin 38 °C sıcaklıkta muhafaza edilmesi ile virüsün elemine olabileceği ayrıca bu sıcaklığın bitkilere kaç gün uygulanması gerektiğinin de çeşitlere göre farklılık göstereceği belirtilirken; CROPLEY (1968) EM7 anacı için sağlıklı sürgünler çıktıktan sonra 14 gün, diğer çeşitler için ise 21-77 günün gerekli olduğunu bildirmiştir (NEMETH, 1986). ASPV ile mücadelede MC CRUM ve HILBORN (1972) *Malus sargentii* anaçlarının kullanılmasını önermişlerdir. Bu anaçlar kullanıldığında ASPV'nin fidanlıklardan elemine olma ihtimalinin yüksek olacağını belirtmişlerdir (NEMETH, 1986).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Survey Çalışmaları**

Çalışma Batı Akdeniz Bölgesi'nde Isparta-Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nün araştırma ve üretim parselleri ile Antalya-Korkuteli'ndeki ticari bahçelerde yürütülmüştür. Bu bahçelerden simptom gösteren ve göstermeyen ağaçlardan alınan yapraklar veya sürgünlerin kabuk kısmı yapılan testlerde kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar**

ELISA testlerinde kullanılan antiserum ve konjugatlar Loewe (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Ayrıca içerikleri ekte verilen Fosfat Tamponu, Yıkama Tamponu, Kaplama Tamponu, Örnek Tamponu, Konjugat Tamponu ve Substrat Tamponu (Ek.1) ile 8x12'lik U şeklinde çukurlara sahip mikropalakalar kullanılmıştır. Nükleik asit izolasyonu için ise bitki ezme, yıkama tamponları ile EtOH, NaI, NaCl, EDTA, KOAc, NaOAc ve silika süspansiyonları (Ek.2) kullanılmıştır.

#### **3.2. YÖNTEM**

##### **3.2.1. Survey Çalışmaları ve Bitki Materyallerinin Toplanması**

Isparta-Eğirdir ve Antalya-Korkuteli ilçelerinde seçilen bahçelerde Nisan ayından itibaren survey çalışmaları başlatılmış ve Haziran ayına kadar tüm örnekler toplanmıştır. Bitki örnekleri toplanırken CANOVA ve ark. (1962) ve POSNETTE (1963)'nin bildirdiği elma virüs hastalıkları belirtileri göz önünde tutulmuş ve ağaçların gelişmesi, dalların durumu, yapraklarda deformasyon ve mozaik lekeleri, meyvelerde küçülmeler, anormallikler, sapların durumu, renk değişikliği, meyve kabuğunda mantarlaşmalar, çatlama gibi belirtilerin bulunup bulunmadığına dikkat edilmiştir. Bahçenin en az

%5'ini temsil edecek şekilde gerek simptom gösteren gerekse simptomsuz ağaçların 4 farklı yönünden 20-25 cm'lik sürgünler kesilmiştir. Alınan bu sürgünler plastik torbalara etiketlenerek yerleştirilmiş ve buz içeren kutularda gerek serolojik testlemeler gerekse nükleik asit izolasyonu için testleninceye kadar saklanmıştır.

### 3.2.2. Bitki Materyalinin Muhafazası

Araziden laboratuara getirilen örnekler farklı şekillerde muhafaza edilmiştir. +4 °C'de muhafaza edilen bitki materyallerinin bir kısmı CaCl<sub>2</sub>'de kurutulmuş, bir kısmı da gliserol içerisinde -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca bu örneklerin her birinden toplam RNA'lar da ekstrakte edilmiştir ve ekstrakte edilen RNA'lar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. ELISA Testinin Uygulanması

Virüsle bulaşık olduğundan şüphelenilen ağaçlardan alınan örneklerden ApMV için simptom gösteren kısımlarından, ACLSV ve ASGV için ise farklı sürgünlerin yapraklarından alınan 1 gram doku tartılmış ve steril porselen havan içerisinde, 1:10 oranında sulandırılarak tampon çözeltisi ile ezilmiştir ve ekstraktlar kullanılmaya kadar buzdolabında saklanmıştır.

Serolojik çalışmalarda "Double Antibody Sandwich-ELISA" (DAS-ELISA) yöntemi kullanılmıştır (CLARK ve ADAMS, 1977). Yapılan ELISA testlerinde LOEWE (Almanya) firmasından temin edilen ApMV, ACLSV ve ASGV poliklonal antiserum kitleri kullanılmıştır. Her virüs için firmanın protokolünde belirtilmiş olduğu antiserum sulandırma oranları dikkate alınmıştır. Standart ELISA testi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- Gamma globulinler, kaplama tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyona göre sulandırılmış ve mikrotiter ELISA plakalarının her bir çukuruna 100 µl konulmuştur. Plakaların üzeri kapatılarak buharlaşma engellenmiş 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar 3 kez en az 3'er dakika bekletilerek yıkanmıştır. Her yıkamada plakalar hızla ters çevrilerek boşaltılmış ve en son yıkamadan sonra 8-10 katlı peçete üzerine vurularak kuruması sağlanmıştır.
- Örnek tamponu içinde ezilmiş her bir örnek iki tekrarlı olarak, gamma globulin ile kaplanmış mikrotiter plakaya her bir çukura 100 µl olacak şekilde yerleştirilmiştir. Plakaya kontrol olarak ekstraksiyon tampon çözeltisi, antiserum kiti içerisinde gelen pozitif ve negatif kontroller de eklenerek +4 °C'de tüm gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Tüm gece inkübasyondan sonra plakalar daha önce belirtildiği şekilde yıkanmıştır.
- Konjugat tamponu ile konjugatlar optimum konsantrasyonda sulandırılarak her bir çukura 100 µl konulmuş ve 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra plakalar daha önce belirtildiği şekilde yıkanmıştır.
- Substrat tamponu ile taze olarak hazırlanan substrattan (1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 100 µl konulmuş ve oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Renk değişimine bağlı olarak 30, 60, 120 dakika sonra plakalar mikropilaka optik okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

BARBA ve RICCONI (1993) 405 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerine göre sağlıklı kontrol değerinin en az iki katı ve daha yukarı okuma değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (GAZEL, 1997). Absorbans değerleri markası SEAC-SIRIOS olan ELISA okuyucusunda okunmuştur.

### **3.2.4. PCR Çalışmaları (Polymerase Chain Reaction= Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

#### **3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu**

Toplam nükleik asitler, BOOM ve ark. (1990) tarafından ilk kez tanımlanan silica-capture metodunun ROTT ve JELKMANN (2001) tarafından yapılan değişikliklerine göre izole edilmiştir. Bu yöntem gereği;

- 0.3 g yaprak materyali 3 ml silica içeren ezme tamponunda ezilmiş ve bundan 500 µl alınıp üzerine 100 µl %10 N-Lauryl sarkosil ve 5 µl 2-Merkaptoethanol eklenmiştir.

- Karışım 70 °C'de 10 dk tutulduktan sonra 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra oluşan sıvı fazdan 300 µl alınarak üzerine 150 µl % 96 Ethanol, 300 µl 6M NaI<sub>2</sub> ve 25 µl resüspanse edilmiş silica eklenmiştir.
- Tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edilmiştir.
- Tüpler 6.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Oluşan çökelti 2 kez yıkama tamponunda çözündürülerek yeniden santrifüj edilmiştir.
- Çökelti oda sıcaklığında kurutularak 150 µl destile suda süspanse edilmiştir.
- Tüpler 70 °C'de 5 dk inkübe edilerek birkaç dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- 13.000 rpm'de 3 dakika inkübe edildikten sonra elde edilen supernatanttan 130 µl'si yeni tüplere aktararak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.4.2. Revers Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)**

Bu işlem şu şekilde gerçekleştirilmiştir; 5 µl toplam nükleik asit ekstraktı, 2 µl random hexamer primer (100 µM), 2 µl oligo (dT)<sub>18</sub> (0.5 µg/µl), 4.5 µl RNase-arı su karışımı 70 °C'de 10 dk tutulmuştur. Daha sonra bu karışıma 4 µl 5Xreaksiyon ortamı (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 µl MMLV-Reverse transcriptase (200 unite/µl) eklenmiştir. Reverse transkripsiyon işlemi için tüpler 37 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra 42 °C'de 1 saat, 70 °C'de 10 dakika tutularak cDNA'lar elde edilmiştir. Daha sonra cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Revers transkripsiyonun şematik görüntüsü Şekil 3.1'de görüldüğü gibidir.



## Viral nükleik asit izolasyonu (RNA.)



Hedef RNA  
Reverse primer  
dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)  
Reaksiyon ortamı



Hedef RNA



Denatürasyon (72°C)



Annealing  
(Primerin bağlanması, 37°C)



Revers Transkriptaz'ın Eklenmesi



cDNA sentezi (37-45°C)



RNA-cDNA hibriti

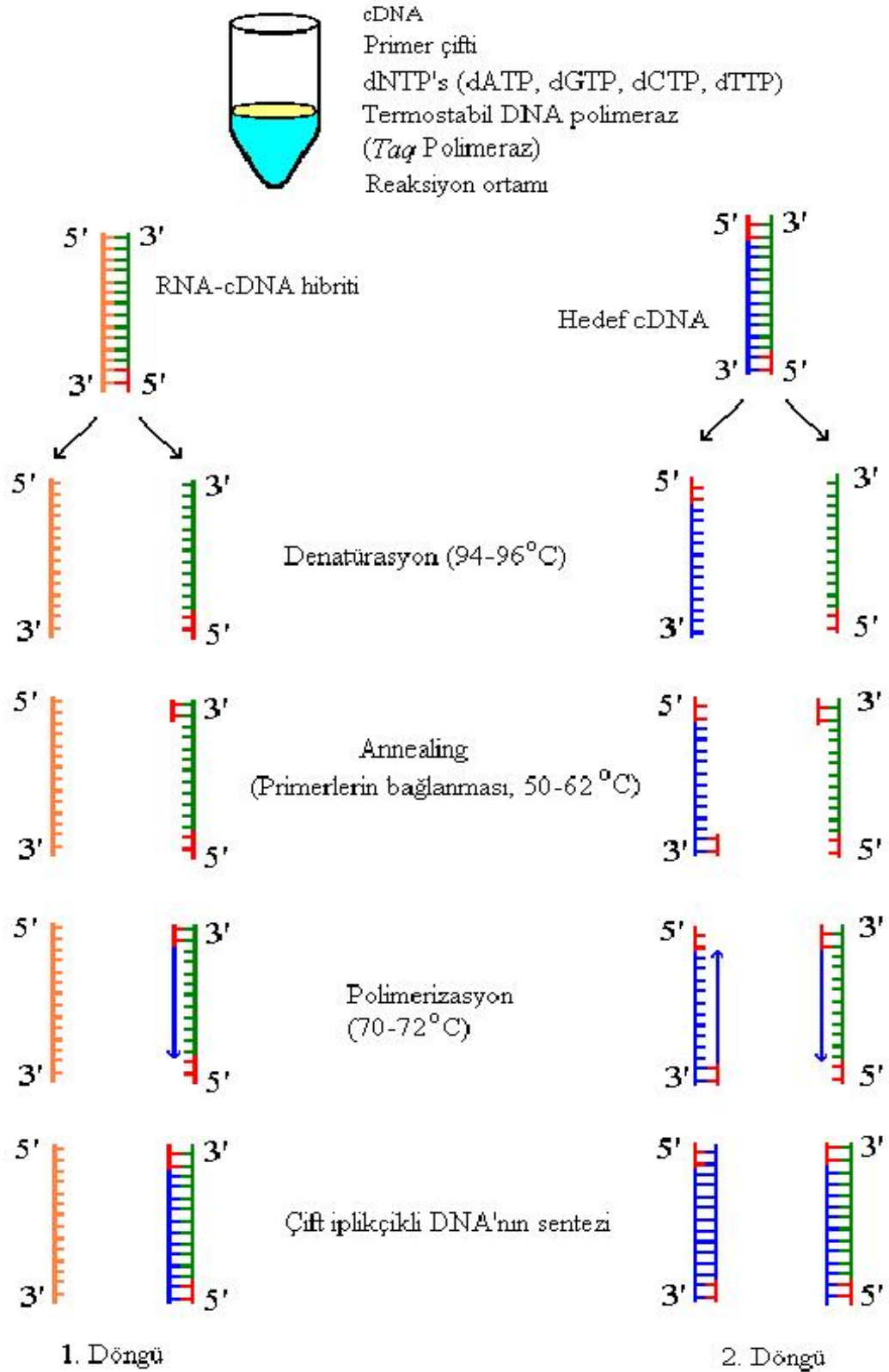
Şekil 3.1. Revers transkripsiyonun şematik olarak açıklaması (ULUBAŞ, 2003)

### 3.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ACLSV, ASGV, ApMV ve ASPV virüslerinin tespit edilmesinde kullanılan primer baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. PCR karışımı; 13.6 µl RNase-arı su, 1 µl cDNA, 0.6 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1.6 µl dNTP mix (2.0 mM), 1 µl virüse özgü primer karışımı (20 pmol/µl), 2 µl PCR 10Xreaksiyon tamponu, 0.2 µl Taq-DNA polymerase (Goldstar 5 U/µl) içerecek şekilde hazırlanmıştır. ACLSV ve ASGV amplifikasyonları için thermocycler 1 döngü 94 °C’de 2 dakika, 35 döngü 94 °C’de 1 dakika, 46 °C’de 1 dakika ve 72 °C’de 1 dakika şeklinde programlanmıştır. Ancak ASPV için annealing sıcaklığı 46 °C yerine 57 °C olarak ayarlanmıştır. ApMV amplifikasyonu için ise 94 °C’de 2 dakika, 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 62 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 1 dakikada yapılmıştır. Daha sonra reaksiyon 72 °C’de 5 dakikada tamamlanmıştır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV spesifik primer çiftleri (MENZEL ve ark., 2002).

Primer	Baz dizisi (5’-3’)	Primer bölgesi	Ürün uzunluğu
ACLSV Sense Antisense	5’-TTC ATG GAA AGA CAG GGG CAA -3’ 5’-AAG TCT ACA GGC TAT TTA TTA TAA GTC TAA-3’	6860-6880, 7507-7536	677 bp
ASPV Sense Antisense	5’-ATG TCT GGA ACC TCA TGC TGC AA-3’ 5’-TTG GGA TCA ACT TTA CTA AAA AGC ATA A-3’	8869-8895, 9211-9238	370 bp
ApMV Sense Antisense	5’-ATC CGA GTG AAC AGT CTA TCC TCT AA-3’ 5’-GTA ACT CAC TCG TTA TCA CGT ACA A-3’	1474-1499, 1711-1735	262 bp
ASGV Sense Antisense	5’-GCC ACT TCT AGG CAG AAC TCT TTG AA-3’ 5’-AAC CCC TTT TTG TCC TTC AGT ACG AA-3’	6039-6064, 6286-6311	273 bp



Şekil 3.2. PCR'in şematik olarak açıklaması (ULUBAŞ, 2003)

#### 3.2.4.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Jel Elektroforez

RT-PCR rnlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla reaksiyondan sonra ürünler %1-1.5 agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez 0.5XTAE ortamında gerçekleştirilmiş ve aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 l yükleme ortamı (6X; 15 l için 150 mg bromophenol blue, 18 g gliserol, 6 ml 50XTAE) ile birlikte 10 l yüklenen PCR rnleri, 100 V'da 1 saat süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/l etidyum bromid (EtBr) içeren 0.5XTAE ortamında 5-10 dakika EtBr ile boyanmıştır (Ek.3). Daha sonra UV transillminatrde sonuçlar gözlenerek polaroid fotoğrafları çekilmiştir. Testlenen dört virüsün spesifik primer çiftleri izelge 3.1'de verilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu araştırmada Batı Akdeniz Bölgesi'nin en yaygın elma yetiştirilen Antalya-Korkuteli ve Isparta-Eğirdir ilçelerindeki bahçelerde elma ağaçlarında zarar oluşturan ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV için arazi gözlemleri yapılmış, ELISA ve RT-PCR testi ile de kesin tanıları yapılarak bu virüs hastalıklarının yaygınlık oranları belirlenmiştir.

### 4.1. Arazi Gözlemleri

Elma virüslerinin saptanması için en uygun mevsimin ilkbahar ayları olması ve sıcaklığın artmasıyla birlikte virüs konsantrasyonunun düşmesi nedeniyle bitki örnekleri 2005 yılının Mayıs ayında toplanmıştır. Örnekler Isparta-Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nün araştırma ve üretim parselleri ile Antalya-Korkuteli'ndeki ticari bahçelerde virüs symptomu gösteren bitkilerden (Şekil 4.1) ve latent bulunduğu bilinen virüsler (ACLSV, ASGV ve ASPV) için ise tesadüfi olarak bahçenin % 5'ini temsil edecek şekilde alınmıştır. Toplam 72 örneğin 25 tanesi Antalya-Korkuteli'ndeki bahçelerden, 47 tanesi ise Isparta-Eğirdir ilindeki bahçeden toplanmıştır.

Survey yapılan bahçelerdeki ağaçlarda halkalı mozaik symptomları, yapraklarda nekrotik lekeler, bodurluk, kloroz gibi symptomlar gözlenmiştir (Şekil 4.1). BRUNT ve ark. (1996) da ApMV'nin elma türlerinde mozaik lekeleri oluşturduğunu bildirmişlerdir.

ApMV dışındaki diğer virüs hastalıkları (ACLSV, ASGV ve ASPV) ile ilgili bu virüslerin indikatör bitkilerde yaptıkları symptomlara benzer tipik hiçbir belirti gözlenmemiştir. NEMETH (1986) ACLSV, ASGV ve ASPV'nin ticari elma ve armut çeşitlerinde tipik symptom oluşturmada latent olarak bulunduğunu ifade etmektedir.

NEMETH (1986) ApMV belirtilerinin ilk dönemlerinin yaprak bitlerinin beslenmesi sonucunda oluşan mozaik lekeleri ile ya da iz element eksikliğinden kaynaklanan renk değişiklikleri ile karıştırılabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada mozaik ve kloroz belirtisi gösteren ağaçlardan alınan örnekler testlendiğinde belirtilerin ApMV'den kaynaklandığı saptanmıştır.



Şekil 4.1. a-b) Isparta-Eğirdir ilçesindeki bir elma bahçesinde ApMV ile enfekteli olduğu saptanan 38 nolu ağaçtaki mozaik belirtileri ve kloroz c) Antalya-Korkuteli'nde bir elma bahçesinde ApMV ile enfekteli olduğu saptanan 4 nolu ağaçta özellikle bir bölümde yoğunlaşan mozaik belirtileri ve kloroz

Çalışma kapsamında toplanan materyallerde ApMV semptomları belirgin şekilde görülmüş, ELISA ve RT-PCR testleri de virüsün varlığını doğrulamıştır. Ayrıca bu çalışma ApMV'nin Isparta-Eğirdir ve Antalya-Korkuteli'nden alınan örneklerde önemli bir sorun olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışma ÇITIR ve İLBAĞI (2006) tarafından Tekirdağ ilinde yapılmış ve ağaçlardaki belirtilerin ApMV'den kaynaklandığı bildirilmiştir.

#### 4.2. ELISA Testi Sonuçları

Yeterli antiserum bulunmadığından toplam 72 örneğin 29 tanesi ELISA yöntemiyle testlenebilmiştir. Testlenen bu örneklerin tamamı RT-PCR yöntemi ile de testlenerek sonuçlar kıyaslanmıştır. Bu örneklerden 16 tanesinin en az bir virüs hastalığı ile enfekteli olduğu saptanmış ve enfeksiyon oranı ELISA ile % 55.17 olarak bulunmuştur. ELISA ile testlenen üç virüsün enfeksiyon oranları Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi saptanmıştır.

Çizelge 4.1. DAS-ELISA testi sonucunda belirlenen ApMV, ACLSV ve ASGV ile enfekteli örnek sayısı ve % enfeksiyon oranı

	ApMV	ACLSV	ASGV
Enfekteli örnek sayısı	4	13	9
% Enfeksiyon oranı	13.79	44.82	31.03

Çizelgede de görüldüğü gibi testlenen bitkiler ApMV ile % 13.79 oranında enfekteli bulunurken semptom göstermeyen ağaçlardan tesadüfi olarak alınan bir çok örnekte ACLSV ve ASGV pozitif olarak bulunmuştur. Bu ağaçlarda belirti görülmemesinin nedeni bu virüslerin latent olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır. Latent virüslerden ACLSV'nin enfeksiyon oranı % 44.82, ASGV'nin ise % 31.03 olarak saptanmıştır.

ELISA testi ile testlenen 29 örneğin absorbans değerleri ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. ELISA testi ile ApMV, ACLSV ve ASGV'ye karşı testlenen örneklerin absorbands değerleri (405 nm)

Örnek Sıra No	Arazideki Örnek No	Alındığı yer	ELISA Absorbans Değerleri (405 nm)		
			ApMV	ACLSV	ASGV
1	1	Korkuteli/Antalya	0.069	0.103	0.103
2	4	Korkuteli/Antalya	0.066	0.149	0.167
3	5	Korkuteli/Antalya	0.069	0.476*	0.100
4	6	Korkuteli/Antalya	0.071	0.071	0.089
5	11	Korkuteli/Antalya	0.066	0.124	0.282*
6	14	Korkuteli/Antalya	0.064	0.068	0.105
7	17	Korkuteli/Antalya	0.071	0.081	0.093
8	18	Korkuteli/Antalya	0.077	0.071	0.118
9	29	Eğirdir/Isparta	0.097	0.082	0.108
10	30	Eğirdir/Isparta	0.981*	0.422*	0.321*
11	37	Eğirdir/Isparta	0.320*	0.513*	0.245*
12	38	Eğirdir/Isparta	0.066	0.081	0.100
13	39	Eğirdir/Isparta	0.071	0.072	0.127
14	41	Eğirdir/Isparta	0.082	0.789*	0.088
15	43	Eğirdir/Isparta	0.498*	0.660*	0.160
16	44	Eğirdir/Isparta	0.139	0.400*	0.273*
17	45	Eğirdir/Isparta	0.071	0.507*	0.275*
18	49	Eğirdir/Isparta	1.119*	0.463*	0.241*
19	51	Eğirdir/Isparta	0.075	0.075	0.269*
20	52	Eğirdir/Isparta	0.084	0.237*	0.147
21	54	Eğirdir/Isparta	0.093	0.085	0.206*
22	56	Eğirdir/Isparta	0.075	0.095	0.089
23	59	Eğirdir/Isparta	0.078	0.693*	0.097
24	61	Eğirdir/Isparta	0.065	0.423*	0.226*
25	62	Eğirdir/Isparta	0.068	0.103	0.098
26	68	Eğirdir/Isparta	0.075	0.316*	0.099
27	70	Eğirdir/Isparta	0.075	0.262*	0.097
28	71	Eğirdir/Isparta	0.081	0.105	0.111
29	72	Eğirdir/Isparta	0.081	0.136	0.131

\* : Pozitif bulunan örnekler

ApMV için; Pozitif Kontrol Ortalaması : 0.601

Negatif Kontrol Ortalaması : 0.075

ACLSV için; Pozitif Kontrol Ortalaması : 0.609

Negatif Kontrol Ortalaması : 0.093

ASGV için; Pozitif Kontrol Ortalaması : 0.483

Negatif Kontrol Ortalaması : 0.081



Çizelgede de görüldüğü gibi örneklerden 4 tanesi ApMV, 13 tanesi ACLSV, 9 tanesi ise ASGV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Örneklerin büyük bir çoğunluğu karışık enfekteli olup, 6 ağaçta ACLSV, 3 ağaçta ise ASGV tek enfeksiyon olarak tespit edilmiştir. ApMV ise pozitif bulunduğu tüm örneklerde karışık enfeksiyon şeklinde saptanmıştır. Testlenen ağaçların 13'ü araştırılan virüsler açısından temiz bulunmuştur. ELISA testi sonucunda ApMV ve ACLSV ile karışık örnek sayısı 4, enfeksiyon oranı % 13.79; ApMV ve ASGV ile karışık örnek sayısı 3, enfeksiyon oranı % 10.34; ACLSV ve ASGV ile karışık örnek sayısı 6, enfeksiyon oranı % 20.69 olarak belirlenirken; ApMV, ACLSV ve ASGV 3'lü enfeksiyon şeklinde 3 ağaçta görülmüş ve enfeksiyon oranı % 10.34 olarak bulunmuştur. ELISA testi ile Antalya-Korkuteli'ndeki bahçelerden alınan örneklerde ApMV enfeksiyonuna rastlanmazken 1 örnek ACLSV ile ve 1 örnek de ASGV ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Isparta-Eğirdir'deki bahçeden alınan örneklerden 4 tanesinin ApMV ile 12 tanesinin ACLSV, 8 tanesinin ASGV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Buna göre Korkuteli ilçesinden alınan örneklerde enfeksiyon oranı % 25 olarak belirlenirken, Eğirdir ilçesinden alınan örneklerde % 67 olarak bulunmuştur. ELISA testi sonucunda örneklerin daha çok ACLSV ile enfekteli olduğu ve bunu sırasıyla ASGV ve ApMV'nin izlediği görülmüştür.

ÇAĞLAYAN ve ark. (2004) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde dört önemli elma virüsünün yaygınlığını ELISA yöntemi ile belirleyerek hastalığın damızlık materyallerle kurulan çeşit bahçelerinde yaygınlık oranının % 37.23 olduğunu, ticari bahçelerde ise bu oranın % 33.75 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca BİRİŞİK ve ark. (2006) Adana, Kahramanmaraş, Antalya ve Osmaniye bölgelerindeki 93 bahçedeki 9 çeşitten çelik ve yaprakların alınmasıyla toplam 338 örneği ApMV, ASGV ve ACLSV'ye karşı testlediklerinde genel enfeksiyon oranı % 36; ACLSV % 18, ASGV % 12 ve ApMV % 4 olarak bulunmuş karışık enfeksiyon ise % 5 oranında saptanmıştır. Ülkemizde yapılan bu çalışmalar dikkate alındığında özellikle Eğirdir ilçesindeki damızlık blokta Doğu Akdeniz Bölgesi'ne göre tüm virüslerin daha yaygın bulunduğu görülmektedir. Çalışmanın Batı Akdeniz Bölgesi'nde sınırlı bir alanda ve sınırlı sayıda örnekle yürütülmesi nedeniyle bu sonuçların daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışma sırasında toplanan örneklerin bazılarının çeşit adı bilinmemekte; bazıları ise üreticiler ile görüşülememesi nedeni ile bilinmemektedir. Testlenen çeşitlerden 12

tanesi Granysmith, 13 tanesi Golden delicious, 2 tanesi Jonagored, 1 tanesi Braeburn, 1 tanesi Fuji, 1 tanesi Jersey mac, 1 tanesi Kaşel-37, 1 tanesi Yellow spur, 1 tanesi Red chief, 1 tanesi Galaxy-Gala ve 1 tanesi de Lutz golden olarak bildirilmiştir.

ELISA testi sonucunda çeşit bazında enfekteli ağaçların dağılımı incelendiğinde; ApMV ile enfekteli olarak belirlenen 4 ağaçtan 3 tanesinin Granysmith, ACLSV ile enfekteli olarak belirlenen 13 ağaçtan 6 tanesinin Granysmith, 1 tanesinin Golden delicious ve 1 tanesinin de Kaşel-37 olduğu; ASGV ile enfekteli olarak belirlenen 9 ağaçtan 5 tanesinin Granysmith ve 1 tanesinin Golden delicious olduğu saptanmıştır. Buna göre testlenen çeşitler içerisinde en yoğun enfekteli olan Granysmith çeşitidir.

### **4.3 Örneklerin RT-PCR ile Testlenmesi ve ELISA Testi ile Kıyaslanması**

Toplanan 72 örnek RT-PCR ile testlenmiş ve ELISA ile testlenen 29 örneğin sonucuyla kıyaslanmıştır. Bu çalışmada testlenen elma ağaçlarının % 97.22'sinin en az bir virüs ile enfekteli olduğu RT-PCR testi ile kanıtlanmıştır. Benzer bir çalışma ÇAĞLAYAN ve ark. (2004) tarafından yapılmış ve farklı bölgelerden aldıkları 174 bitki örneğini ELISA ve RT-PCR ile testlediklerinde bu örneklerin 126 tanesinin en az bir virüs ile enfekteli (% 72.41) olduğunu bulmuşlardır.

RT-PCR testlerinin sonuçlarına göre, testlenen toplam 72 örneğin 42 tanesinin ACLSV ile, 41 tanesinin ApMV ile, 29 tanesinin ASGV ile, 50 tanesinin ASPV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Enfeksiyon oranları ise % 56.94 ApMV, % 58.33 ACLSV, % 40.28 ASGV ve % 69.44 ASPV olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Buna göre en yüksek enfeksiyon oranı ASPV'de bulunmuş, bunu sırasıyla ACLSV, ApMV ve ASGV izlemiştir.

RT-PCR testi ile Antalya-Korkuteli'ndeki bahçeden alınan örneklerde 9 örnek ACLSV ile, 18 örnek ApMV ile, 5 örnek ASGV ile ve 11 örnek ASPV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Bu ilçeden alınan örnekler genel olarak değerlendirildiğinde testlenen 25 örneğin 23 tanesi en az bir virüs ile enfekteli olarak bulunmuştur (% 92). Isparta-Eğirdir'deki bahçeden alınan örneklerde ise 33 örnek ACLSV ile, 23 örnek ApMV ile, 24 örnek ASGV ile ve 39 örnek ASPV ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Bu bahçedeki genel enfeksiyon oranı ise % 100 olup testlenen tüm ağaçlar en az bir virüs ile bulaşık durumdadır.

Çizelge 4.3. Testlenen bitki materyallerinde RT-PCR testi ile belirlenen ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV ile enfekteli örnek sayısı ve % enfeksiyon oranı

Enfekteli Örnek Sayısı				% Enfeksiyon Oranı			
ApMV	ACLSV	ASGV	ASPV	ApMV	ACLSV	ASGV	ASPV
41	42	29	50	56.94	58.33	40.28	69.44

Testlenen örneklerde ELISA yöntemine göre RT-PCR da daha fazla sayıda karışık enfeksiyonlar saptanmıştır. İkili ve dörtlü karışık enfekteli örnek sayısı ve oranları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Testlenen bitki materyallerinde RT-PCR testi sonucunda karışık enfeksiyon şeklinde belirlenen enfekteli bitki sayısı ve % enfeksiyon oranı

Karışık Enfeksiyon	ACLSV ApMV	ACLSV ASGV	ACLSV ASPV	ApMV ASGV	ApMV ASPV	ASGV ASPV	ApMV ACLSV ASGV ASPV
Enfekteli Bitki Sayısı	28	19	32	15	27	24	13
Enfeksiyon Oranı (%)	38.89	26.39	44.44	20.83	37.5	33.33	18.06

Çizelge 4.4’de de görüldüğü gibi çoğu örnekte karışık enfeksiyon tespit edilmiştir. Çalışmada testlenen 4 virüs (ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV) 13 örnekte karışık enfeksiyon şeklinde saptanmış ve % enfeksiyon oranı 18.06 olarak belirlenmiştir. Toplam 72 örnekte sadece 2 ağaç çalışılan herhangi bir virüsle enfekteli bulunmamış, tek enfeksiyon tespit edilen ağaç sayısı ApMV için 6, ASGV için 3, ASPV için 7, ACLSV için ise 2 olarak saptanmıştır. Farklı virüslerle üçlü enfeksiyon şeklinde bulunan örnek sayısı ise 14 olup, enfeksiyon oranı % 19.44’dür.

Batı Akdeniz Bölgesi’nde elma yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı Antalya-Korkuteli ve Isparta-Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü’ndeki bahçelerden alınarak testlenen toplam 72 örneğin alındığı yerler ve ELISA ile RT-PCR testlerinin kıyaslamalı sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Testlenen bitki materyallerinde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV ile enfekteli örneklerin DAS-ELISA ve RT-PCR testi ile karşılaştırılması

Örnek No	Alındığı yer	ELISA			RT-PCR			
		ApMV	ACLSV	ASGV	ACLSV	ApMV	ASGV	ASPV
1	Korkuteli/Antalya	-	-	-	-	+	-	-
2	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	+	-	+
3	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	+	-	-
4	Korkuteli/Antalya	-	-	-	+	+	-	-
5	Korkuteli/Antalya	-	+	-	+	+	-	-
6	Korkuteli/Antalya	-	-	-	-	+	-	-
7	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	-
8	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	+	-	-
9	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	+
10	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	+	-	+
11	Korkuteli/Antalya	-	-	+	-	+	-	+
12	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	-
13	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	+
14	Korkuteli/Antalya	-	-	-	-	+	-	+
15	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	-
16	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	-	-
17	Korkuteli/Antalya	-	-	-	-	+	-	-
18	Korkuteli/Antalya	-	-	-	-	-	-	-
19	Korkuteli/Antalya	*	*	*	+	+	+	+
20	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	+	-
21	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	-	-
22	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	+	+
23	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	-	+
24	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	+	+
25	Korkuteli/Antalya	*	*	*	-	-	+	+
26	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	+	+
27	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	+
28	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	+	-
29	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	-	-	+
30	Eğirdir/Isparta	+	+	+	+	+	-	+
31	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	+	-
32	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	-
33	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	+	+
34	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	+
35	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	+
36	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	+
37	Eğirdir/Isparta	+	+	+	+	+	+	+
38	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	+	-	-
39	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	+	+	-
40	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
41	Eğirdir/Isparta	-	+	-	+	+	+	+
42	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
43	Eğirdir/Isparta	+	+	-	+	+	-	+
44	Eğirdir/Isparta	-	+	+	+	+	+	+
45	Eğirdir/Isparta	-	+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.5. (Devam) Testlenen bitki materyallerinde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV ile enfekteli örneklerin DAS-ELISA ve RT-PCR testi ile karşılaştırılması

46	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
47	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
48	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	-	+
49	Eğirdir/Isparta	+	+	+	+	+	+	+
50	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	-	+
51	Eğirdir/Isparta	-	-	+	+	+	-	+
52	Eğirdir/Isparta	-	+	-	+	-	-	+
53	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	-	+
54	Eğirdir/Isparta	-	-	+	+	-	-	+
55	Eğirdir/Isparta	*	*	*	-	-	-	+
56	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	+	-	+
57	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	-	+
58	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	-	-
59	Eğirdir/Isparta	-	+	-	+	-	-	-
60	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	-	-
61	Eğirdir/Isparta	-	+	+	+	+	+	+
62	Eğirdir/Isparta	-	-	-	+	-	-	+
63	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	-	+
64	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
65	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	+	+
66	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	+	-	+
67	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	+	+
68	Eğirdir/Isparta	-	+	-	+	-	-	+
69	Eğirdir/Isparta	*	*	*	+	-	-	+
70	Eğirdir/Isparta	-	+	-	+	-	-	+
71	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	-	-	+
72	Eğirdir/Isparta	-	-	-	-	+	+	+

+ : Virüs ile enfekteli

- : Virüs yok

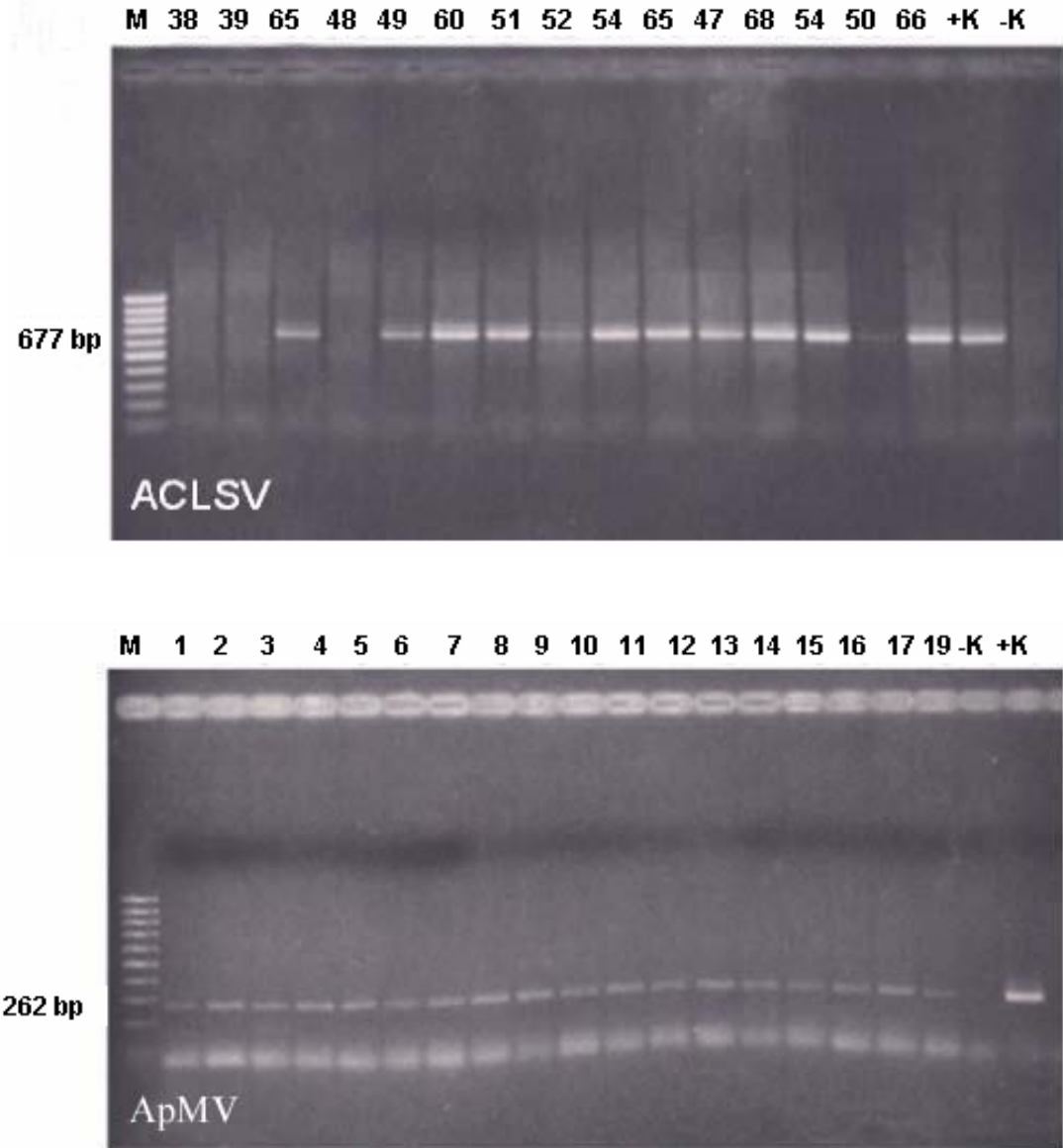
\* : Test edilmemiş örnekler

Çizelgede de görüldüğü gibi Korkuteli ilçesinde testlenen örneklerde 5 no.'lu örnek ACLSV, 11 no.lu örnek ise ASGV ile enfekteli bulunmuştur. Eğirdir ilçesinde ise 30, 37, 43 ve 49 no.lu örnekler ApMV ile; 30, 37, 41,43,44,45,49,52, 59, 61, 68 ve 70 no.lu örnekler ACLSV ile; 30, 37, 44, 45, 49, 51, 54 ve 61 no.lu örnekler ise ASGV ile enfekteli olarak bulunmuştur.

DAS-ELISA testi sonucunda ApMV ile negatif olarak tespit edilen 25 örnekten 16 tanesi, ACLSV ile negatif olarak tespit edilen 16 örnekten 4 tanesi ve ASGV ile negatif olarak tespit edilen 20 örnekten 3 tanesi RT-PCR testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Bu durum beklenen bir sonuç olup daha önce bir çok araştırmacı tarafından da

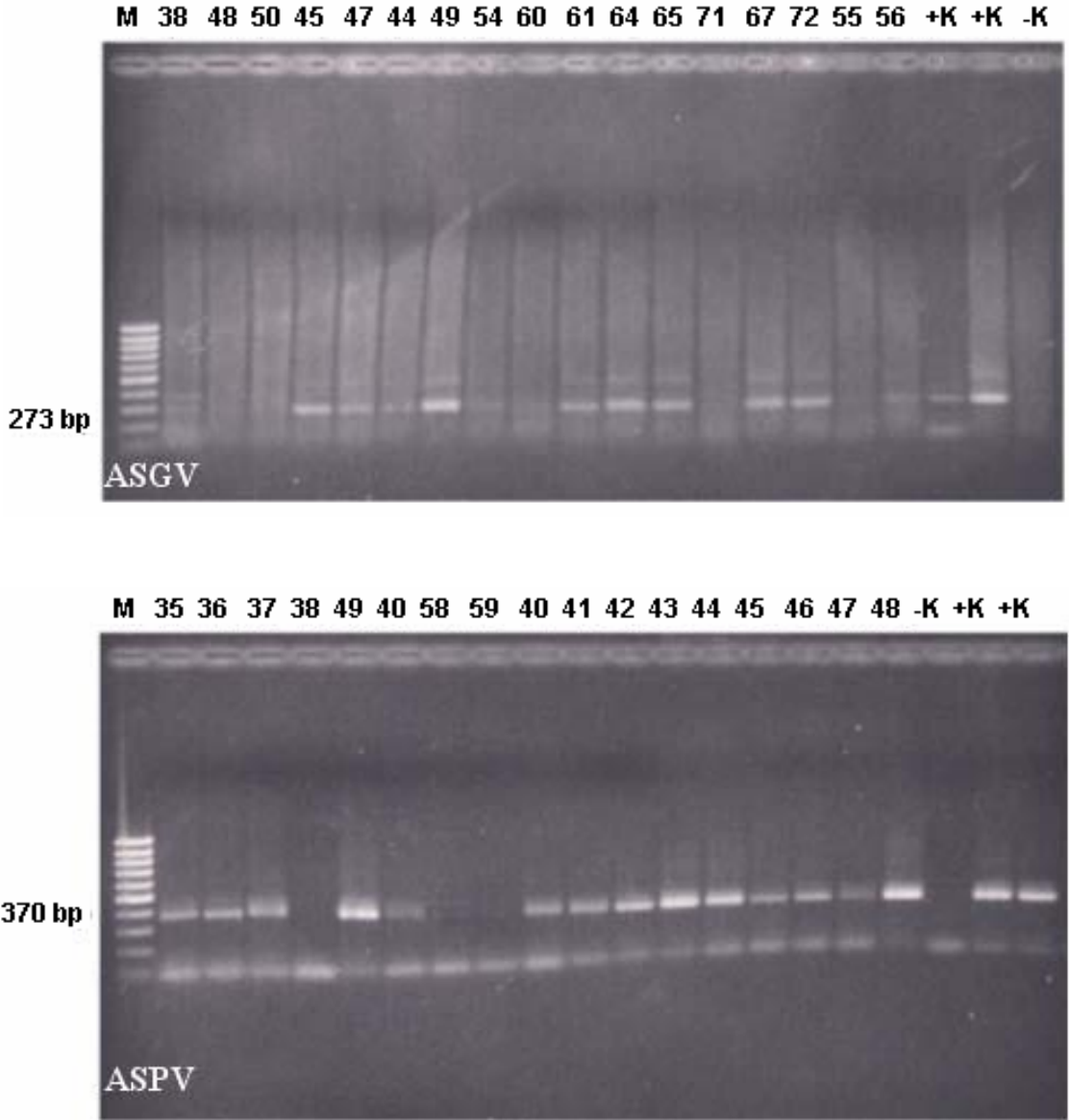
doğrulanmıştır (JELKMANN 1994; MACKENZIE ve ark., 1997). ELISA testi sonucuna göre ASGV açısından pozitif bulunan 9 örnek RT-PCR ile testlendiğinde sadece 5 tanesi ASGV ile enfekteli bulunmuştur. ASGV virüsü son yıllarda moleküler çalışmalara konu olmuş ve üzerinde moleküler yapısı hakkında yeterince bilgi birikimi olmayan bir elma virüsüdür. Gen bankasında bu virüsün çok sayıda izolatu kayıtlı değildir, bu nedenle tüm izolatları tespit edebilecek spesifik primer düzenlenmesinde çok önemli olan baz dizisi değişkenliği bilgisi sınırlıdır (VASKOVA ve ark., 2000). Sonuç olarak, RT-PCR’da kullanılan primer çiftlerinin ELISA’da tespit edilen izolatları saptayamamış olması olasıdır. ELISA testi sonucunda ACLSV ile enfekteli bulunan 13 örneğin tümü RT-PCR testi ile de enfekteli olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi bu çalışmada örnekler RT-PCR ile testlendiğinde enfekteli bitki sayısı ELISA’ya göre bazı istisnalar dışında daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar ÇAĞLAYAN ve ark. (2006)’nın Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. 174 elma örneğini ELISA ve RT-PCR ile testledikleri çalışmalarında RT-PCR ile % 8.6 oranında daha fazla örneği pozitif bulmuşlardır.

RT-PCR ile test edilen bazı örneklerle ait jel resimleri Şekil 4.2 ve 4.3’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi jel üzerinde her bir virüs için beklenen seviyede (PCR ürünü uzunluğu; bp) bant oluşumu görülen bölgeler örneklerin ACLSV ve ApMV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Bant oluşumu görülmeyen bölgeler ise aranan virüsler (ACLSV ve ApMV) yönünden temiz bulunmuştur.



Şekil 4.2. Araziden toplanan bazı elma örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: 100 bp DNA markırı (MBI Fermentas), -C: negatif kontrol, +C: pozitif kontrol

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi RT-PCR sonucunda jele yüklenen örneklerde ilgili virüsün beklenen seviyesinde oluşan bantlar örneklerin ASGV veya ASPV ile enfekteli olduğunu göstermiştir. Bant oluşumu görülmeyen örnekler ise aranan virüsler (ASGV ve ASPV) yönünden temiz bulunmuştur.



Şekil 4.3. Araziden toplanan bazı elma örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: 100 bp DNA markırı (MBI Fermentas), -C: negatif kontrol, +C: pozitif kontrol



RT-PCR testi sonucunda çeşit bazında enfekteli ağaçların dağılımı incelendiğinde; 12 tane Granysmith, 2 tane Golden delicious, 1 tane Flaxy-gala, 1 tane Jonagored, 1 tane Red chief, 1 tane Lutz golden, 1 tane Braeburn, 1 tane Fuji ve 1 tane de Kaşel-37 ve 1 tane Yellow spur ACLSV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. 8 tane Granysmith, 3 tane Golden delicious, 1 tane Glaxy-gala, 1 tane Jonagored, 1 tane Lutz golden, 1 tane Braeburn ve 1 tane Fuji de ApMV enfeksiyonu bulunmuştur. 4 tane Golden delicious, 10 tane Granysmith, 2 tane Jonagored, 1 tane Braeburn ve 1 tane Fuji de ASGV ile enfekteli olarak belirlenmiştir. 11 tane Granysmith, 9 tane Golden delicious, 1 tane Glaxy-gala, 2 tane Jonagored, 1 tane Red chief, 1 tane Lutz golden, 1 tane Braeburn, 1 tane Fuji, 1 tane Kaşel-37 ve 1 tane Jersey mac ASPV ile enfekteli olarak bulunmuştur. RT-PCR testi ile enfekteli olarak belirlenen diğer ağaçların çeşit adı bilinmemektedir. Buna göre testlenen çeşitlerden en yaygın enfekteli çeşitler Granysmith ve Golden delicious olarak belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pek çok meyve kültürünün merkezi olan Türkiye, farklı ekolojik koşullara sahip olmasıyla elma, kayısı, erik ve kiraz gibi değişik meyve ağaçlarının anavatanıdır. Bu meyve türleri ülkemizde ekonomik olarak önemli meyve türlerini oluşturmakta ancak yüksek verimli ve kaliteli meyve elde etmek her zaman mümkün olamamaktadır. Bu durumun en önemli sebeplerinden birisi ağaçların pek çok virüs, fungus, bakteri, viroid ve fitoplazma hastalıklarından etkilenmesidir. Bu hastalıklar arasında virüs ve virüs benzeri hastalıklar yumuşak çekirdekli meyveleri sinsice tehdit etmektedir. Çünkü yumuşak çekirdekli meyvelerde bulunan pek çok virüs, viroid ve fitoplazma ticari çeşitlerde gözle görülebilir semptom oluşturmazken sadece hassas konukçularda belirgin semptomlar oluşturabilmektedir. Bu nedenle elma yetiştiriciliğinde karantinaya tabi virüs hastalıkları açısından erken ve doğru teşhis son derece önemlidir. Virüsün ELISA testi ile tespit edilmesi daha kısa sürede sonuç vermesi açısından elverişli olmakla beraber kullanımı bazı nedenlerle sınırlıdır. Odunsu dokularda virüslerin düzensiz yayılması, virüs konsantrasyonunun düşük ve mevsimlere göre farklılık göstermesi ELISA ile yapılan testlerde zaman zaman hatalı sonuçların alınmasına neden olabilmektedir (TORRANCE ve DOLBY, 1984). Daha önceden yapılan çalışmalar sonucunda DAS-ELISA yöntemiyle tespit edilebilen viral partikül konsantrasyonundan 625 kez daha düşük konsantrasyonda bile viral partiküller RT-PCR tekniği ile tespit edilebilmiştir (SANCHEZ-NAVARRO ve ark., 1998). Bitkide bu kadar düşük konsantrasyondaki virüsün varlığının RT-PCR tekniği ile belirlenebilmesi mevsimlere bağlı olmaksızın gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemin özellikle fidanlıklarda anaç bitkilerin testlenmesinde kullanılması ile sağlıklı bitkilerden enfekteli olanların ayırt edilmesi erken dönemde mümkün olabilecektir. Ayrıca fidanlıkların virüs yönünden dikkatli kontrol edilerek yapraklarda mozaik, bant ve halka lekeler gösteren, sürgünleri zayıf olan, gövdesi gevrek, yaprakları normalden büyük, çatallanma belirtisi gösteren ağaçların dikkatle seçilerek ayıklanması gerekmektedir. Ancak bilindiği gibi semptomoloji çoğu zaman yanıltıcıdır. Bütün bu nedenler dikkate alındığında virüs enfeksiyonlarının tespit edilmesinde RT-PCR tekniğinin ülkemizdeki damızlık blokların ve fidanlıkların testlenmesinde yaygın olarak kullanımının sağlanması gereklidir.

Bu çalışmada elmalarda EPPO standartlarına göre karantinaya tabii ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV'nin ülkemizin önemli damızlık bloklarından Eğirdir Bahçe Kùltürleri'ndeki durumu araştırılmıştır. Ayrıca elma yetiştiriciliğinde önemli Korkuteli ilçesindeki ticari bahçelerden alınan örnekler testlenerek Batı Akdeniz Bölgesi elma yetiştiriciliği önemli virüsler açısından az sayıda örneklede olsa ilk kez irdelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ELISA ve RT-PCR yöntemleri yeterli antiserum temin edilememesi nedeniyle 29 örnekle kıyaslanmıştır. Ancak 72 örneğin tamamı RT-PCR ile testlenmiştir. ELISA testi ile bu örneklerin % 13.79'unun ApMV, % 31.03'ünün ASGV ve % 44.82'sinin ACLSV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. RT-PCR ile ise örneklerin % 40.28'inin ASGV, % 56.94'ünün ApMV, % 58.33'ünün ACLSV, ve % 69.44'ünün ASPV ile enfekteli olduğu bulunmuştur.

Testlenen örneklerde en yaygın karışık enfeksiyon ACLSV+ASPV (% 44.44) olarak saptanırken bunu sırasıyla ApMV+ACLSV (% 38.89), ApMV+ASPV (% 37.5) ASGV+ASPV (% 33.33), ACLSV+ASGV (% 26.39) ve ApMV+ASGV (% 20.83) izlemiştir. ApMV+ACLSV+ASGV+ASPV dörütlü enfeksiyon oranı ise % 18.06 olarak saptanmıştır. Kıyaslanan 29 örneğin ELISA ile 16 tanesi en az bir virüs ile enfekteli bulunurken RT-PCR ile 28 bitki enfekteli olarak saptanmıştır. Beklenen bu sonuç moleküler yöntemlerin sertifikasyon programlarında kullanılmalarının ne kadar gerekli olduğunu bir kez daha vurgulamıştır.

Ülkemizin diğ er meyvecilik bölgelerinde olduğu gibi Isparta yöresinde de meyve fidanları farklı yerlerden sağ lanmaktadır. Son yıllarda yurt dışından önemli ölçüde fidan ithal edilmesi, bakanlık kontrolündeki damızlık blokların ve fidan üretim merkezlerinin denetimlerinin düzenli yapılmaması ve fidanların kontrolsüz koşullarda ve sertifikasız üretilmesi virüs hastalıklarının bu denli yaygın olmasının en önemli nedenleridir. Elma yetiştiriciliği açısından son derece önemli olan Batı Akdeniz Bölgesi'nde virüs enfeksiyonlarının varlığının daha detaylı araştırılmasının yanı sıra sağlıklı fidan üretiminde izlenecek yolun takip ve teşvik edilmesi de gerekmektedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerde elmalarda uygulanan sanitasyon ve sertifikasyon programı ülkemiz koşullarına uyarlanarak ivedilikle başlatılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- ALREFAI, R.H., SHIEL, P.J., DOMIER, L.L., D'ARCY, C.J., BERGER, P.H., and KORBAN, S.S., 1994. The Nucleotide Sequence of Apple Mosaic Virus Coat Protein Gene has no Similarity with Other Bromoviridae Coat Protein Genes. **J. Gen. Virol.**, 75: 2847- 2850.
- ANONİM, 1992. **Certification Schemes. Virus-Free or Virus Testet Material of Fruit Trees and Roodstocks.** Bulletin OEPP/EPP Bulletin, 22: 255-284.
- ANONİM, 2005. **Bioreba Katolog**, 50 s.
- ANONİM, 2006a. <http://www.ziraat.selcuk.edu.tr/dergi/36/37-51.pdf>
- ANONİM, 2006b. T.C. Başbakanlık. Türkiye İstatistik Kurumu.  
[http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab\\_id=139](http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=139).
- ANONİM, 2006c. <http://www.agaclar.net/forum/showthread.php?t=1548>
- ANONİM, 2006d.  
<http://www.bitkisagligi.net/Elma/ozellik.asp?patlatin=Apple%20Mosaic%20Virus>
- ANONİM, 2006e.  
<http://www.bitkisagligi.net/Elma/ozellik.asp?patlatin=Apple%20Chlorotic%20Leaf%20Spot%20Virus>
- ANONİM, 2006f.  
<http://www.bitkisagligi.net/Elma/ozellik.asp?patlatin=Apple%20Stem%20Grooving%20Virus>
- ANONİM, 2006g.  
<http://www.bitkisagligi.net/Elma/ozellik.asp?patlatin=Apple%20Stem%20Pitting%20Virus>
- BİRİŞİK, N., MYRTA, A., HASSAN, M., ve BALOĞLU, S., 2006. A Preliminary Account on Apple Viruses in Eastern Turkey. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 102, Antalya.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM VAN DILLEN, P.M.E., and VAN DER NOORDAA, J., 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **J. Clin. Microbiol.**, 28, 495-503.
- BRUNT, H.A., CRABTREE, K., DALLAWITZ, M.J., GIBBS, A.J., and WATSON, L., 1996. **Viruses of Plants**, CAB International.
- CAMPBELL, A.I., 1963. The Effect of Some Latent Virus Infections on The Growth and Cropping of Apples. **J. Hort. Science**, 38: 15-19.
- CANOVA, A., CORTE, F., and GUALACICINI, F., 1962. Virus and Viruslike Diseases of Pome and Stone Fruits Observed in Italy. **5<sup>th</sup> European Symposium on Fruit Tree Virus Disease**.
- CIESLINSKA, M., and RUTKOWSKI, K., 2006. Effect of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus on Yield and Quality of Apple Fruits of cvs. Golden Delicious and Sampion. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 101, Antalya.
- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N., 1997. Characteristics of The Micro Plate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Detection of Plant Viruses. **J. Gen. Virol.**, 34: 475-483.

- CONVERSE, R.H., and BARTLETT, A.B., 1979. Occurrence of Viruses in Some Wild Rubus and Rosa Species in Oregon. **Plant. Dis. Rep.**, 63: 441-444.
- ÇAĞLAYAN, K., ULUBAŞ, Ç., GAZEL, M., JELKMANN, W., 2004. First Report of Identification of Apple Viruses in Turkey. **J. Turk. Phytopath**, 32 (2), 57-60.
- ÇAĞLAYAN, K., ULUBAŞ, Ç., GAZEL, M., JELKMANN, W., 2006. Detection of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assays in Turkey. **Turk J Agric For**, 30: 241-246.
- ÇALI, S., 1992. Do Viruses and Mycoplasmas Cause to Small Sized Apple Fruit in Isparta. **J.Turk. Phytopath.**, 21, 87-99.
- ÇITIR, A., ve İLBAĞI, H., 2006. Serological Identification of Some Important Viruses on Fruit Trees and Bushes in Tekirdağ Province of Turkey. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 32, Antalya.
- DESVIGNES, J.C., 1999. Virus Diseases of Fruit Trees. **Ctifl, Paris**.
- DURSUNOĞLU, S., ve ERTUNÇ, F., 2006. Distribution of Apple Mosaic Virus in Turkey. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 104, Antalya.
- GAZEL, M. H., 1997. **Hatay Bölgesi Prunus Türlerindeki Virüs Hastalıklarının ELISA ve Biyolojik Yöntemlerle Tanınması**. M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antakya, 55 s.
- HASSAN, M., POLAK, J., PAPRSTEIN, F., and MYRTA, A., 2006. Detection and Distribution of Four Pome Fruit Viruses in Germplasm Collection Czech Republic by Pentaplex RT-PCR. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 34, Antalya.
- JELKMANN, W., 1994. Nucleotid Sequences of Apple Stem Pitting Virus (ASPV) and of The Coat Protein Gene of A Similar Virus from Pear Associated with Pear Vein Yellows Disease and Their Relationship with Potex and Carlaviruses. **J. Gen. Virol.**, 75: 1535-1542.
- KUMAR-KUNDU, J., 2006. Detection, Distribution and Genetik Diversity of Apple Stem Pitting Virus and Apple Stem Grooving Virus in the Czeck Republic. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 105, Antalya.
- KURÇMAN, S. 1977. Determination of Virus Diseases on Cultural Plant in Turkey. **J. Turkish Phytopath**, 6:1, 25-46.
- MACKENZIE, D.J., MCLEAN, M.A., MUKERJI, S., and GREEN, M., 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Diseases**, 81: 222-226.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROK, J., 1982. **Molecular Cloning; A Laboratory Manual**. By Cold Spring Harbour Lab., ISBN 0-87969-136.
- MASSART, S., ROUSSEL, S., KUMMERT, J., DUTRECQ, O., and JIJAKLI, M.H., 2006. Development of Routine Duplex RT-PCR Tests For Certification of

- Fruit Tree Multiplication Material. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 33, Antalya.
- MENZEL, W., JELKMANN, W., and MAISS, E., 2002. Detection of Four Apple Viruses by Multiplex RT-PCR Assay with Coamplification of Plant mRNA as Internal Control, **J. Virol. Methods**, 99: 81-92.
- MINK, G.I., 1989. Apple Chlorotic Leaf Spot. In: **Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders**. (Ed. P. R. Fridlund), Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University. Pullman, W. A., 34-39.
- MINK, G.I., 1992. **Diseases of Fruit Crops**, III. Washington State University Washington, USA.
- NEMCHINOV, L., and HADIDI, A., 1998. PCR-Detection of Apple Stem Pitting Virus from Pome Fruit Hosts and Sequence Variability Among Virus Isolates. **Acta Hort**, 472: 67-73.
- NEMETH, M., 1986. **Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees**. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands and Akademi Kiado, Hungary, 841.
- NOGAY, A., UZUNOĞULLARI, N., ve YÜREKTÜRK, M., 2001. Elma-Armut Anaç ve Çeşitlerinde Virüs Hastalıklarının Saptanması. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül, 486-495, Tekirdağ.
- ÖZBEK, S., 1978. Özel Meyvecilik, **Ç.Ü. Ziraat Fakültesi yayınları**, 128 s.
- ÖZDEMİR, S., ve KAYA, A., 2006. Detection of Viruses in Imported Fruit Propagation Material. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 106, Antalya.
- ÖZKAN, M., ve KURÇMAN, S., 1976. Orta Anadolu Elma Bahçelerinde Görülen Virüs Hastalıkları. **Bitki Koruma Bülteni**, 16: (2), 106-115.
- POSNETTE, A.F., 1963. Virus Diseases of Apples and Pears. **Common. Bur. Hortic. Plant. Crops (G.B) Tech. Commun**, 30, 137 s.
- ROTT, M.E., and JELKMAN, W., 2001. Characterization and Detection of Several Filamentous Viruses of Cherry: Adaption of An Alternative Cloning Method (DOP-PCR), and Modification of An RNA Extraction Protocol. **Eur. J. Phytopathol.**, 107, 411-420.
- SAHTİYANCI, Ş., 1964. Orta Anadolu'da Meyve Ağaçlarında Görülen Başlıca Virüs Hastalıkları Üzerinde Çalışmalar. Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü. **104.809 No'lu Proje Çalışma Raporu**.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, H.A., and ARNHEIM, N., 1985. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globulin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. **Science**, 230: 1350-1354.
- SANCHEZ-NAVARRO, J.A., and PALLAS, V., 1994. Nucleotide Sequence of Apple Mosaic Ilarvirus RNA4. **J. Gen. Virology**, 75:1441-1445.
- SANCHEZ-NAVARRO, J.A., APARICIA, F., ROWHANI, A., and PALLAS, V., 1998. Comparative Analysis of ELISA, Nonradioactive Molecular Hybridization and PCR for The Detection of Prunus Necrotic Ringspot Virus in Herbaceous and Prunus Hosts. **Plant Pathol.**, 47: 780-786.

- SHIEL, P.J., ALREFAI, R.H., DOMIER, L.L., KORBAN, S.S., and BERGER, P.H. 1995. The Complete Nucleotide Sequence of Apple Mosaic Virus RNA. **Archives of Virology**, 144: 1247-1256.
- SHIEL, P.J., and BERGER, P.H., 2000. The Complete Nucleotide Sequence of Apple Mosaic Virus (ApMV) RNA1 and RNA2: ApMV is more Closely Related to Alfalfa Mosaic Virus than to Other Ilarviruses. **J. Gen. Virol.**, 81: 273-278.
- SİPAHİOĞLU, H.M., ÇAĞLAR, B.K., ve BALOĞLU, S., 2001. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Güllerde Zararlı PNRSV ve ApMV Virüs Hastalıklarının Serolojik Olarak Yaygınlıklarının Saptanması. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül, 572-577, Tekirdağ.
- SÖKMEN, M.A., ŞEVİK, M.A., ve YILMAZ, M.A., 2004. Samsun'da Fındık (*Corylus avellena*) Alanlarının Apple Mosaic Virus (ApMV) ile Bulaşıklık Durumunun Belirlenmesi. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 8-10 Eylül, 173, Samsun.
- SÖKMEN, M.A., KUTLUK YILMAZ, N.D., MENNAN, H., and ŞEVİK, M.A., 2006. RT-PCR Detection of Apple Mosaic Virus (ApMV) Infection in Some Weed Hosts Found in Hazelnut Orchards in Turkey. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 109, Antalya.
- SUTIC, D.D., FORD, R.E., and TOSIC, M.T., 1999. **Handbook of Plant Virus Diseases**. CRC Press, London, New York, Washington, D. C., 553.
- TORRANCE, L., and DOLBY, C.A., 1984. Sampling Conditions for Reliable Routine Detection by Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Three Ilarviruses in Fruit Trees. **Ann. Appl. Biol.**, 117: 561-569.
- ULUBAŞ, Ç., 2003. **Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Enfeksiyon Yapan Ilarvirüslerin RT-PCR ile Tanısı ve Karakterizasyonu**. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 27-28 s, Ankara.
- VASKOVA, D., PETRZIK, K., and SPAK, J., 2000. Molecular Variability of The Capsid Protein of The Prune Dwarf Virus European **Journal of Plant Pathology**, 00: 1-8.
- YARDIMCI, N., ÇEVİK, B., ve ERYİĞİT, H., 2006. Detection of Apple Mosaic Virus by ELISA and RT-PCR Methods on Apple Cultivars in South-Western Turkey. **XX<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XI<sup>th</sup> International Symposium on Small Fruit Virus Diseases**, May 22-26, 103, Antalya.
- ZAHN, V., 1996. Obstvirustesting im Wandel der Zeit. **Obstbau**, 21: 547-550.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Ankara ili Nallıhan ilçesine bağlı Çayırhan beldesi'nde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Çayırhan beldesinde, lise öğrenimimi aynı ile bağlı Beypazarı ilçesinde tamamladım. 2000 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2004 yılında Ziraat Mühendisi ünvanıyla mezun oldum ve mezun olduğum yıl aynı Üniversite'de Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2007 yılında mezun oldum.



## EKLER

### Ek 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 1. Fosfat Tamponu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS) pH: 7.4

NaCl	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O veya	2.9 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.44 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Susuz)	1.15 g
KCl	0.2 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır. Bu tampon çözelti 5 veya 10 kat konsantre olarak stok çözelti şeklinde hazırlanıp saklanabilir ve gerekli olduğunda aynı oranda sulandırılıp kullanılabilir.

#### 2. Kaplama Tamponu (Coating Buffer) pH: 9.6

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

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır. Ancak her kullanımda pH kontrol edilmiştir.

#### 3. Yıkama Tamponu (Washing Buffer)

1 litre PBS tamponuna 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

#### 4. Örnek Tamponu (Sample Buffer)

1 litre tampon çözeltisi içerisine 20 g (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır (1 ay içerisinde kullanılmak üzere 4 °C'de saklanabilir).

### 5. Enzim Konjugat Tamponu (Enzyme Conjugate Buffer)

1 litre örnek tamponu içine 2 g (%2) Ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır (1 ay içerisinde kullanılmak üzere 4 °C’de saklanabilir).

### 6. Substrat Tamponu (Substrat Buffer) pH: 9.8

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilir. Sonra 0.2 g  $\text{NaN}_3$  eklenir ve HCl ile pH 9.8’e ayarlanarak 1 litreye tamamlanır (karanlıkta 4 °C’de saklanabilir ancak kullanılmadan önce pH kontrol edilmelidir).

## Ek 2. Nükleik Asit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

### 1. Grinding Buffer

Guanidine Thiocyanate (4.0 M)	11.8 g
3 M $\text{NaOAc}$ pH:5.2 (0.2 M)	6.6 ml
0.5 M EDTA pH:8.0 (25 mM)	5 ml
5 M $\text{KOAc}$ pH:7.5 (1.0 M)	20 ml
PVP 40 (% 2.5)	0.25 g

#### 1.1. 0.5 M EDTA, pH 8.0

0.0145 g EDTA 100 ml  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ’de eritilir. Magnetik karıştırıcı ile kuvvetle karıştırılır. pH’sı NaOH pelletleri ile 8.0’a ayarlanır. Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

#### 1.2. 5 M $\text{KOAc}$ , pH 6.0

29.445 g  $\text{KOAc}$  60 ml saf suda çözündürülür. Glacial asetik asid damlatılarak pH 6.0’a ayarlanır. Suyla 100 ml’ e tamamlanır.

#### 1.3 3 M $\text{NaOAc}$ , pH 5.2

40.8 g  $\text{NaOAc}$  100 ml’e su ile tamamlanır.

### 2. NaI Solution

0.75 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  40 ml su içinde çözündürülür ve 36 g NaI eklenerek karıştırılır. Solüsyon karanlıkta +4 °C’de saklanabilir.

### 3. Wash Buffer

10 mM Tris-HCl, pH:7.5

0.5 mM EDTA

50 mM NaCl

50 % Ethanol (EtOH)

#### 3.1. 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

0.121 g Trizma base 80 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ile çözüldürülür. pH konsantre HCl eklenerek istenen seviyeye getirilir. 100 ml'ye d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O eklenerek tamamlanır ve otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında rutin kullanımlar için 3-4 aya kadar saklanır.

#### 3.2. 50 mM NaCl

0.29 g NaCl içerisinde saf su eklenerek 50 ml'ye tamamlanır.

### 4. Resuspended Silica

60 g silica üzerine 500 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O eklenir. Karışımın çökmesi için 24 saat beklenir. Üst fazın 470 ml'si atılır ve üzerine 500 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O eklenir. Çökmesi için 5 saat bırakılır. Solüsyonun üst fazından 440 ml alınarak atılır, 60 ml çamurlu kısım kalır ve HCl ile pH 2.0'ye ayarlanır. Sonra otoklav edilir ve stok 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içerisinde kullanılıncaya kadar +4 °C'de birkaç ay karanlık bir yerde saklanır.

### Ek 3. AGAROSE JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1982)

#### 1. Materyal

##### 1.1. TAEX50

##### 100 ml stok için

Trizma base	24.2
0.5 M EDTA pH 8.0	10 ml
0.6 glacial acetic acide	5.71 ml

Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

### **1.2. Yükleme Ortamı**

#### 15 ml 6X stok için

150 mg Bromophenol blue

18 g Glycerol

6 ml TAEX50

-20°C’de saklanır.

### **1.3. Ethidium Bromide Solüsyonu**

#### 1 mg/ml 200 ml stok için

200 ml 0.5XTAE

200 µl Ethidium Bromide (Sigma E-1510) (son konsantrasyon 1 mg/ml)

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanır. 5-10 defaya kadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.

## **2. Yöntem**

### **2.1. % 1 Agarose Jel Elektrofözezi**

1 g agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilir. Yaklaşık 40 °C sıcaklığa geldikten sonra, elektroföze ünitesinin jel tepsisine dökülerek agarozun donması beklenir (15-20 dakika). 0.5XTAE ortamı içeren elektroföze tankına yerleştirilen agaroz jelin çukurlarına PCR ürünleri yüklenir. Örnek yüklemesi, 5-10 µl PCR ürünü ve 3 µl yükleme ortamı ayrı bir yerde karıştırılarak yapılır. PCR ürünlerinin 100 V’da 1 saat elektrofözezinden sonra ethidium bromide solüsyonu ile jel 5-10 dakika boyanır ve UV transilluminatörde sonuçlar gözlenir. İstenildiği takdirde kamera ile polaroid fotoğraf çekilir.