

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hilal Eser AYTÜRK**

**KONYA VE NİĞDE İLLERİ CİVARINDA YENİ TESİS ELMA  
BAHÇELERİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ (*Apple Mosaic  
Virus*, ApMV)'NÜN SAPTANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ADANA-2019**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONYA VE NİĞDE İLLERİ CİVARINDA YENİ TESİS ELMA  
BAHÇELERİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ (*Apple mosaic virus*, ApMV)'  
NÜN SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Hilal Eser AYTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu Tez 04/10//2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
DANIŞMAN

Prof. Dr.Saadettin BALOĞLU  
ÜYE

Prof. Dr.Gülşen SERTKAYA  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof. Dr. Mustafa GÖK**  
**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**  
**Proje No:** FYL-2018-9923

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

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KONYA VE NİĞDE İLLERİ CİVARINDA YENİ TESİS ELMA  
BAHÇELERİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ  
(*Apple mosaic virus*, ApMV)' NÜN SAPTANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Hilal Eser AYTÜRK**

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

Danışman : Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
Yıl: 2019 Sayfa: 71  
Jüri : Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU  
: Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

Bu çalışma 2017-2019 yılları arasında ilkbahar ve yaz dönemlerinde Konya ve Niğde illerinde yeni kurulan elma bahçelerinde Elma Mozaik Virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV)'nün saptanması ve karakterizasyonu amacıyla yürütülmüştür. Arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak 14 bahçe ve 6220 da alan taranmış ve ApMV ile infekteli olduğundan şüphelenilen toplam 130 adet elma ağacından örnekleme yapılmış DAS-ELISA testleri sonucunda 32 bitki bulaşık bulunmuştur. ApMV'ye spesifik 92D9UP (1) ve 1425RE (2) primer çifti ile kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda, DAS-ELISA'da pozitif çıkan örneklerden 382 bp büyüklüğe sahip band elde edilmiştir. Bunlar arasından seçilen, Konya-Kutören izolatlarının (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15 ve ApMV-33), ApMV-2 (Kutören 3-2) ve ApMV-33 (Kutören4-1 ) izolatları diğerlerinden farklı olarak kendi aralarında bir grup oluştururken, ApMV-3 (Kutören 3-3) ve ApMV-4 (Kutören 3-4) izolatları (Türkiye (KX034209.1), Güney Kore ( LC006865.1), Kanada ( KY971021.1), Çek Cumhuriyeti ( LT574872.1), Hindistan ( FN564150.1), Slovakya (HG328268.1), Avusturalya (KY883320.1), Belarus (HG328270.1), Antarktika (KC4690368.1), Brezilya (GQ13185.1), İtalya (AY542546.1) ve Norveç (KC469067.1) ile aynı gruba dahil olmuştur. Buna karşılık ApMV-15 (Kutören 1-3) izolatu diğer izolatlarla %80 benzerlik göstermesine rağmen tek başına farklı bir grup oluşturmuştur. ApMV-7 (Kutören 3-7) izolatu ise, Türkiye'de daha önceden tanımlanmış ApMV izolatu (JX155668.1) ile aynı grupta yer almıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Elma, ApMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Dizi Analizi

## ABSTRACT

### MSc THESIS

#### DETECTION AND CHARACTERIZATION OF APPLE MOSAIC VIRUS (ApMV) IN NEW ESTABLISHED APPLE ORCHARDS AROUND KONYA AND NIĞDE PROVINCES

Hilal Eser AYTÜRK

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Assoc Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
Year: 2019, Pages: 71  
Jury : Assoc Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU  
: Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU  
: Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

This study was carried out for the detection and characterization of Apple mosaic virus (Apple mosaic virus, ApMV) in newly established apple orchards in Konya and Niğde provinces during the spring and summer periods of 2017-2019. A total of 130 apple leaf samples that were suspected to be infected with ApMV were collected and only 32 plants were confirmed to be infected as obtained from ELISA test results. Using RT-PCR with 92D9UP (1) and 1425RE (2) primer pair of ApMV, 382 bp bands were obtained from Konya-Kutören isolates for ApMV (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15 and ApMV-33). As a result of sequence analysis, ApMV-2 (Kutören 3-2) and ApMV-33 (Kutören 4-1) isolates were found in one group. ApMV-3 (Kutören 3-3) and ApMV-4 (Kutören 3-4) were in the same group with other (Turkey (KX034209.1), South Korea (LC006865.1), Canada (KY971021.1), Czech Republic (LT574872.1), India (FN564150.1), Slovakia (HG328268.1), Australia (KY883320.1), Belarus (HG328270.1), Antarctica (KC4690368.1), Brazil (GQ13185.1), Italy (AY542546.1) ve Norway (KC469067.1)) selected world isolates. Although ApMV-15 (Kutören 1-3) isolate showed %80 similarity with other isolates, it formed a different group by itself. ApMV-7 (Kutören 3-7) isolate took place within the same group as the other isolate (JX155668.1) previously identified in Turkey.

**Key words:** Apple, ApMV, DAS-ELISA, RT-PCR, Sequence analysis.

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Elma, insanlık tarihinin ilk meyvesidir ve tüm uygarlıklar boyunca hem insan beslenmesi hem de insan sağlığı bakımından oldukça önemli bir yere sahiptir. İlk olarak Kuzey Anadolu, Güney Kafkaslar, Rusya'nın güney batısında kalan bölgeler ile Orta Asya (Kazakistan'ın doğusu)'da görüldüğü tahmin edilmektedir (Özbek, 1978). Isparta, Karaman, Niğde, Denizli, Konya, Çanakkale, Antalya ve Bursa illeri ticari olarak elma üretiminde en önemli iller arasındadır.

Rosaceae familyasının, Pomoideae alt familyasında yer alan elma *Malus* cinsi içerisinde bulunmaktadır. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da doğal olarak yetişebilen toplamda yaklaşık olarak 30'a yakın elma türü bulunmaktadır. Genetik çeşitliliğinde değişikliklerin olması, yabancı tozlanması, apomiksis ve poliploid özellikli olması nedeniyle tür olarak sınıflandırılması oldukça zordur (Campbell ve ark, 1963).

Elma'da verim kayıplarına neden olan birçok abiyotik ve biyotik faktör bulunmaktadır. Bunlar içerisinde aşı materyali ile taşınan ve kimyasal mücadelesi olmayan birçok virüs ve virüs benzeri hastalık elma bitkisinde belirlenmiş ve viral etmenlerin hastalık şiddetlerine göre elmanın kalite ve kantitesinde farklı düzeylerde zarar oluşturmakla beraber anaç-kalem uyumsuzluklarına neden olduğu için fidanlıklarda da kayıp oluşturdıkları bilinmektedir.

Yumuşak çekirdekli meyvelerde geçmişten günümüze kadar çok az ya da oldukça önemli zararlara neden olan 43 adet virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni saptanmıştır, bunlardan elma üretim alanlarında önemli virüs hastalıklarından birisi de Elma mozaik virüsü ( *Apple mosaic virüs*, ApMV)' dür.

Elma mozaik virüsü ( *Apple mosaic virüs*, ApMV), *Bromoviridae* familyası, *Ilarvirus* cinsi içinde yer almaktadır. Viral hastalık etmeni olarak 19. yüzyılın başlarında belirlenmiştir (Howell ve ark, 1991). ApMV'nin 19 familyadan 65 bitki türünü hastalandırdığı ve çok geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu rapor edilmiştir (Zeki, 1991). Konukçuları arasında böğürtlen, ahududu, elma, kayısı,

kiraz, badem, erik ve şeftali, fındık, gül ve şerbetçi otu yer almaktadır. Ayrıca, ApMV'nin dişbudak, atkestanesi ve kırmızı atkestanesinde de varlığı rapor edilmiştir (Polak ve Zieglerova, 1997).

ApMV'nin doğal vektörü bilinmemektedir (Postman ve Mahlenbacher, 1994). Bununla birlikte virüs, mekanik olarak bitki öz suyu, virüsle infekteli aşı materyali ve vejetatif üretim materyallerinin kullanılması bitkiler arasında kök kaynaşması ile taşınabilmektedir. Ayrıca fındıkta yapılan çalışmalarda viral etmenin polenle ve tohumla taşınabildiği de rapor edilmiştir (Aramburu ve Rovira, 2000).

Bu çalışma, 2017-2019 yılları arasında yaklaşık olarak 450 bin tonun üzerinde elma üretiminin gerçekleştirildiği elmanın ticari değerinin yüksek olduğu Konya ve Niğde illerinde yeni kurulu elma bahçelerinde önemli virüslerden biri olan Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV)'nün serolojik ve moleküler olarak saptanması ve elde edilen ApMV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacıyla yürütülmüştür. Bu amaç doğrultusunda, Konya ve Niğde illerinde yeni kurulan elma bahçelerinin yoğun olduğu yerlere arazi çıkışları gerçekleştirilmiş ve simptomolojik olarak ApMV ile bulaşık olduğu düşünülen elma ağaçlarından örnekler alınarak Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarına getirilmiştir. Toplanan örneklerin virüsle bulaşık olup olmadığını tespit etmek amacıyla örnekler öncelikle serolojik (DAS-ELISA) ve daha sonra moleküler (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Çalışma kapsamında 6220 dönüm elma bahçesi gezilerek yaklaşık 1.800.000 elma ağacı simptomatolojik olarak taranmıştır. Bu arazi çıkışlarında ApMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen 130 adet elma ağacından örnekleme yapılmış ve DAS-ELISA testleri sonucunda, 28 adeti Konya-Kutören bölgesinden, 1 adeti Niğde-Zengen bölgesinden ve 3 adeti de Niğde Çukurkuyu bölgesinden olmak üzere toplam 32 adet örneğin ApMV ile infekteli olduğu saptanmıştır.

ELISA testlerinde pozitif sonuç veren örneklerden yapılan RT-PCR işlemi sonucunda 8 örneğin net bir şekilde band oluşturduğu gözlemlenmiştir.

RT-PCR çalışmalarında band elde edilen örnekler birer izolat kabul edilmiş ve bunlar arasından 6 izolat seçilerek bulunduğu bölgeler ve bahçeler dikkate alınarak dizileme ve dizi analizi çalışmalarında kullanılmıştır. Dizi analizi sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde, ApMV-2 (Kutören 3-2) ve ApMV-33 (Kutören 4-1) izolatlarının kendi aralarında bir grup oluşturduğu saptanmıştır. ApMV-3 (Kutören 3-3) ApMV-4 (Kutören 3-4) izolatlarının seçilen dünya izolatları (Türkiye (KX034209.1), Güney Kore ( LC006865.1), Kanada ( KY971021.1), Çek Cumhuriyeti (LT574872.1), Hindistan ( FN564150.1), Slovakya (HG328268.1), Avusturalya (KY883320.1), Belarus ( HG328270.1), Antarktika ( KC4690368.1), Brezilya ( GQ13185.1), İtalya (AY542546.1) ve Norveç ( KC469067.1)) ile aynı grupta yer aldığı; ApMV-15 (Kutören 1-3) izolatının dünya izolatları ile benzerlik gösterdiği halde ayrı bir grup oluşturduğu; ApMV-7 (Kutören3-7) izolatının ise diğerlerinden farklı olarak daha önce rapor edilen Türkiye izolatı (JX155668.1) ile aynı grupta yer aldığı tespit edilmiştir.

Elma yetiştiriciliğinde virüs hastalıklarının zarar seviyesi genellikle anaç-kalem arasındaki ilişkiye bağlıdır. Virüslerin mücadelesinde virüsten ari ismine doğru sertifikalı fidan kullanılmalı, kültürel işlemler sırasında alet ve ekipmanlar dezenfekte edilmeli, viral etmene dayanıklı ve tolerant çeşit üretebilme konusunda çalışmalar yapılmalı ve bulaşık olduğu belirlenen bitkiler üretim alanlarından uzaklaştırılarak imha edilmelidir. Gerek uluslararası üretim materyali transferinde gerek yurtiçi materyal taşınmasında karantina tedbirleri kritik önem arz etmektedir.





## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bana yardımcı ve her zaman destek olan kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Viroloji Laboratuvarı'nda yapmış olduğum tez dahilindeki çalışmalarına yardımlarından dolayı Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU, Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR, Zir. Müh. Fatıma DAŞ, Zir. Müh. Güler TANLI ve Zir. Müh. Volkan KILINÇ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında büyük bir destek ile bana yardımcı olan arkadaşım Zir. Yük. Müh. Havva Nur SAĞLAM'a çok teşekkür ederim.

Projemin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarımda da maddi ve manevi destek ve kolaylık sağlayan başta sevgili eşim Atakan AYTÜRK'e ve tüm aile fertlerime sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZ .....                                                                  | I    |
| ABSTRACT.....                                                             | II   |
| GENİŞLETİLMİŞ ÖZET .....                                                  | III  |
| TEŞEKKÜR.....                                                             | VII  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                         | VIII |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                   | X    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                     | XII  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                              | XIV  |
| 1. GİRİŞ .....                                                            | 1    |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....                                                | 9    |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                | 17   |
| 3.1. Materyal .....                                                       | 17   |
| 3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler .....                          | 17   |
| 3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal .....                   | 19   |
| 3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyal .... | 20   |
| 3.1.4. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....                    | 20   |
| 3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....    | 21   |
| 3.2. Metot .....                                                          | 21   |
| 3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi .....                   | 21   |
| 3.2.2. Serolojik Çalışmalar .....                                         | 23   |
| 3.2.2.1. DAS-ELISA Tekniği .....                                          | 23   |
| 3.2.3. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyonu.....                       | 24   |
| 3.2.3.1. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyonu Aşamaları .....          | 24   |
| 3.2.4. CTAB Nükleik Asit Ekstraksiyonu .....                              | 25   |
| 3.2.4.1. CTAB Nükleik Asit Ekstraksiyonu Aşamaları.....                   | 25   |
| 3.2.5. RT-PCR Çalışmaları.....                                            | 26   |
| 3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....                           | 29   |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.7. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları .....                                | 29 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                       | 33 |
| 4.1. ApMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması .....                                                   | 33 |
| 4.2. ELISA Çalışmaları.....                                                                         | 41 |
| 4.3. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyon Çalışmaları.....                                        | 49 |
| 4.4. RT-PCR Çalışmaları .....                                                                       | 49 |
| 4.5. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....                                   | 50 |
| 4.5.1. Elma Mozaik Virüsü ( <i>Apple mosaic virus</i> , ApMV)'nün Dizi<br>Belirleme Çalışması ..... | 50 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....                                                                        | 55 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                     | 59 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                      | 65 |
| EKLER.....                                                                                          | 66 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|              |                                                                                                                                                    |    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. | Dünyada elma üretim alanları (ha) .....                                                                                                            | 2  |
| Çizelge 1.2. | Ülkelere göre dünya elma üretim miktarı (milyon ton) .....                                                                                         | 3  |
| Çizelge 1.3. | Türkiye'de elma üretim alanları (ha).....                                                                                                          | 4  |
| Çizelge 1.4. | Türkiye Elma Üretimi .....                                                                                                                         | 4  |
| Çizelge 1.5. | Konya İli Elma Üretim Alanı ve Miktarı (Son 5 yıl).....                                                                                            | 5  |
| Çizelge 1.6. | Niğde İli Elma Üretim Alanı Ve Miktarı (Son 5 yıl).....                                                                                            | 5  |
| Çizelge 1.7. | Türkiye'de çeşitlerine göre meyve veren yaşta elma ağaç sayısı (bin adet).....                                                                     | 6  |
| Çizelge 1.8. | Elmada rapor edilen bazı virüs hastalıkları, familyaları ve taşınma yolları.....                                                                   | 7  |
| Çizelge 3.1. | Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı.....                                                                                             | 17 |
| Çizelge 3.2. | RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çiftleri ve Band Büyüklüğü.....                                                                            | 21 |
| Çizelge 3.3. | Arazi çıkışlarında elma ağaçlarında aranan semptomlar .....                                                                                        | 22 |
| Çizelge 3.4. | Bitki örneklerinin kodlanması .....                                                                                                                | 26 |
| Çizelge 3.5. | RT-PCR çalışmalarında seçilen virüs izolatları ve alındığı iller.....                                                                              | 27 |
| Çizelge 3.6. | ApMV için uygulanan PCR programı ve sıcaklıklar .....                                                                                              | 28 |
| Çizelge 4.1. | Arazi çıkışı yapılan alanlar ve ELISA testi sonucu ApMV ile infekteli olan elma bitkileri.....                                                     | 41 |
| Çizelge 4.2. | DAS-ELISA ve RT-PCR Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....                                                                                      | 48 |
| Çizelge 4.3. | Filogenetik soyağacı oluşturulurken kullanılan izolatların isimlendirilmesi .....                                                                  | 51 |
| Çizelge 4.4. | Sekans Analizi Çalışmalarında Kullanılan Dünya'nın Farklı Yerlerinden Rapor Edilen ApMV İzolatlarının Konukçuları, Benzerlik Oranı ve Orjini ..... | 53 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|             |                                                                                                           |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1.  | Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı .....                                                   | 19 |
| Şekil 3.2.  | Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları .....                                             | 30 |
| Şekil 4.1.  | Elma yaprağında mozaik simptomlar (Konya Kutören/ApMV enfeksiyonu).....                                   | 34 |
| Şekil 4.2.  | Elma yaprağında ApMV enfeksiyonuna bağlı solgun sarı veya açık krem renginde lekeler (Konya/Kutören)..... | 34 |
| Şekil 4.3.  | Yaprakta ApMV enfeksiyonuna bağlı damar açılması ve mozaik lekelenmeler (Konya/Kutören).....              | 35 |
| Şekil 4.4.  | Yapraklarda ApMV enfeksiyonuna bağlı rozetleşme (Konya/Kutören) .....                                     | 35 |
| Şekil 4.5.  | Elma sürgününde ApMV enfeksiyonuna bağlı gelişme geriliği (Konya/Kutören) .....                           | 35 |
| Şekil 4.6.  | Elma yaprağında ApMV enfeksiyonuna bağlı şiddetli renk açılması ve nekroz (Konya/Kutören).....            | 36 |
| Şekil 4.7.  | ApMV ile bulaşık elma sürgününde nekroz, damar bantlaşması ve mozaik simptomlar .....                     | 36 |
| Şekil 4.8.  | Yaprakta sararma, mozaik lekeler ve nekrozlaşan alanlar (Konya/Kutören) .....                             | 37 |
| Şekil 4.9.  | ApMV ile bulaşık bir elma ağacında şiddetli damar açılması ve mozaik simptomu (Konya/ Kutören).....       | 37 |
| Şekil 4.10. | ApMV ile bulaşık sürgünde damar bantlaşması simptomu (Kutören/ApMV enfeksiyonu).....                      | 38 |
| Şekil 4.11. | ApMV ile infekteli elma ağacında mozaik simptomlar (Kutören/ApMV).....                                    | 38 |
| Şekil 4.12. | Elma yaprağında renk açılmaları (Kutören/ApMV enfeksiyonu).....                                           | 39 |
| Şekil 4.13. | Büyüme döneminde ApMV ile infekteli elma sürgününde mozaik simptomlar (ApMV enfeksiyonu) .....            | 39 |

|                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.14. ApMV ile infekteli bitkinin yapraklarında renk açılması (ApMV enfeksiyonu) .....                                                                                                                                  | 40 |
| Şekil 4.15. ApMV ile infekteli elma yapraklarında renk açılmaları (ApMV enfeksiyonu).....                                                                                                                                     | 40 |
| Şekil 4.16. ApMV-2(a),ApMV-3(b), ApMV-4(c), ApMV-7(d) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu yaprak deformasyonu ve mozaik lekelenmeler, damar bantlaşması, yaprakta sarımsı renk açılması belirtileri .....           | 44 |
| Şekil 4.17. ApMV-15(e),ApMV-33(f), ApMV-6(g), ApMV-9(h) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu yaprak deformasyonu ve mozaik lekelenmeler, damar bantlaşması, yaprakta sarımsı renk açılması, nekroz belirtileri. .... | 45 |
| Şekil 4.18. ApMV-25(k), ApMV-27(l), ApMV-30(m), ApMV-31(n), ApMV-41(o), ApMV-47(ö) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu mozaik lekelenmeler, nekroz, damarlar çevresinde renk açılması belirtileri .....             | 46 |
| Şekil 4.19. ApMV-50(p), ApMV-60(r), ApMV-63(s), ApMV-64(ş), ApMV-66(t), ApMV-102(u) izolatlarının elma yapraklarında neden oldukları sarımsı beyaz lekeler, mozaik belirtiler, rozetleşme belirtileri .....                   | 47 |
| Şekil 4.20. ApMV'nin Kutören izolatları (ApMV-1, ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-6, ApMV-7, ApMV-15, ApMV-21 ve ApMV-33) kullanılarak 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları .....                      | 50 |
| Şekil 4.21. 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti ile saptanan ApMV izolatlarının (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15, ApMV-33) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı) .....                                   | 52 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|       |                                                           |
|-------|-----------------------------------------------------------|
| A     | : Adenin                                                  |
| ApMV  | : <i>Apple Mosaic Virus</i>                               |
| ACLSV | : <i>Apple Chlorotic Leaf Spot Virus</i>                  |
| ASGV  | : <i>Apple Stem Grooving Virus</i>                        |
| BLAST | : Basic Local Alignment Search Tool                       |
| BPYV  | : <i>Beet Pseudo Yellows Virus</i>                        |
| bp    | : Base Pair (Baz çifti)                                   |
| °C    | : Santigrat Derece                                        |
| cDNA  | : Complementary Deoxyribonucleic Acid                     |
| CP    | : Kılıf Protein                                           |
| DNA   | : Deoksiribonükleik asid                                  |
| dsDNA | : Double Stranded (çift iplikli) DNA                      |
| EDTA  | : Ethylenediaminetetraacetic acid                         |
| ELISA | : Enzyme Linked İmmuno Sorbent Assay                      |
| FAO   | : Food and Agriculture Organisation                       |
| g     | : Gram                                                    |
| G     | : Guanin                                                  |
| mg    | : Miligram                                                |
| µl    | : Mikrolitre                                              |
| ml    | : Mililitre                                               |
| M     | : Molarite                                                |
| M-MLV | : Moloney Murine Leukaemia Virus                          |
| mM    | : Milimolar                                               |
| NaCl  | : Sodyum Klorür                                           |
| NaOH  | : Sodyum Hidrokside                                       |
| NCBI  | : National Center for Biotechnology Information           |
| PBS   | : Phosphate Buffered Saline (Fosfat tuz tampon çözeltisi) |



|         |                                                    |
|---------|----------------------------------------------------|
| PCR     | : Polymerase Chain Reaction                        |
| pH      | : Çözeltinin Asitlik Bazlık Seviyesi               |
| PNRSV   | : <i>Prunus Necrotic Ringspot Virus</i>            |
| PVP     | : Polyvinylpirrilodone                             |
| pmol/µl | : Pikomol/Mikrolitre                               |
| RNA     | : Ribonükleikasit                                  |
| RNAsin  | : Ribonükleaz İnhibitörü                           |
| rpm     | : Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı) |
| RT      | : Reverse Transcriptase                            |
| RT- PCR | : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction  |
| ssDNA   | : Single Stranded DNA (Tek iplikli DNA)            |
| S       | : Sitozin                                          |
| SLRSV   | : <i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>          |
| SpaV    | : <i>Strawberry Pallidosis Associated Virus</i>    |
| TAE     | : Tris Acetate EDTA Buffer                         |
| TBE     | : Tris Borate EDTA Buffer                          |
| ToRSV   | : <i>Tomato Ringspot Virus</i>                     |
| T       | : Timin                                            |
| TÜİK    | : Türkiye İstatistik Kurumu                        |
| UV      | : Ultraviole                                       |
| V       | : Volt                                             |
| W/V     | : Ağırlık/Hacim                                    |

## 1. GİRİŞ

Rosaceae familyası Pomoideae alt familyası *Malus* cinsi içerisinde yer alan elma (*Malus domestica* (Borkh.)) bütün dünyaya Orta Asya'dan yayılmıştır (Anonymus, 2017).

Kültür bitkilerinin orjinlerini araştıran De Candolle, 1883 yılında yayımladığı “L’Orgine des Plantes Cultivees” adlı eserinde elmanın 4000 yıldan daha fazla bir zamandan beri kültüre alınmış olabileceğini öne sürmüştür (Özçağırın ve ark, 2004).

Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika’da doğal olarak yetişen 30 kadar elma türü bulunmaktadır (Campbell ve ark, 1963).

Kültüre alındığı bildirilen 6000 elma çeşidi bulunmasına rağmen, “Golden Delicious, Granny Smith, Fuji ve Gala grubu elma çeşitleri toplam elma üretiminin %61’ini oluşturmaktadır (O’Rourke, 2003).

Elma dünyada tarımı yaygın olarak yapılan ve üretim bakımından muz ve üzümünden sonra en fazla üretimi gerçekleştirilen bir türdür. Farklı ekolojilere uyum kabiliyetinin yüksek olması, dünya üzerinde geniş bir yayılım göstermesine neden olmuştur. Elma, dünyada toplam meyve üretiminin yaklaşık %12’sini oluşturarak muzdan sonra ikinci sırada yer almaktadır (FAO, 2017).

Yumuşak çekirdekli meyve türlerinin en önemlisi olan elmanın yazlık, kışlık ve güzlük çeşitleri bulunmaktadır. Özellikle de kışlık çeşitlerin uzun süreli depolamaya dayanıklı olması ve nakliye için elverişli olması sebebiyle de önemi daha da artmıştır.

Elma, sofralık olarak taze tüketilmesinin yanı sıra kurutulmuş olarak ve meyve suyu, marmelat, komposto ve sirke şeklinde de işlenerek farklı kullanım alanlarında da yer almıştır (Kaygısız, 2002).

Elma; fosfor, kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, silisyum gibi bir çok mineral maddeler ile çeşitli organik asitler, meyve asitleri ve doğal aroma maddeleri içerrir. A, B1, B2, C ve E vitaminleri bakımından da oldukça zengindir.

Bu yönüyle elma insan sağlığı açısından en önemli meyveler arasında yer alır (Temiz, 2016).

Dünyada elma üretim alanları yıllara göre değişmekle birlikte yaklaşık 5 milyon üç yüz bin hektar civarındadır. 2012 yılında 5.075.039 ha olan dünya elma üretim alanları 2016 yılında %4, 3 oranında artarak 5.293.340 ha olmuştur (USDA, 2018).

Çizelge 1.1. Dünyada elma üretim alanları (ha)

| Yıllar    | 2012      | 2013      | 2014      | 2015      | 2016      |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Alan (ha) | 5.075.039 | 5.160.561 | 5.141.398 | 5.206.832 | 5.293.340 |

Kaynak: (USDA, 2018)

Dünyada elma üretimi; hem üretim alanlarının artması hem de daha yüksek verimli çeşitlerin kullanımının yaygınlaşmasına bağlı olarak artış göstermiştir. 2012/13 sezonunda 71.635 milyon ton olan dünya elma üretimi 2015/16 sezonunda %9,94 oranında artmış ve 76.936 milyon tona ulaşarak son yılların en yüksek seviyesine çıkmıştır. Dünya elma üretimi 2017/18 sezonunda ise 76.208 milyon ton olmuştur.

2017/2018 sezonu dünya elma üretimine bakıldığında Çin tek başına dünya elma üretiminin %58,39'unu karşılayarak birinci sırada yer almıştır. Çin'den sonra ikinci sırada AB ülkeleri yer almış ve bu ülkeleri ABD izlemiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Ülkelere göre dünya elma üretim miktarı (milyon ton)

| ÜLKELER   | 2012/13 | 2013/14 | 2014/15 | 2015/16 | 2016/17 | 2017/18 |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ÇİN       | 38.500  | 39.680  | 40.920  | 42.600  | 43.900  | 44.500  |
| AB        | 12.207  | 11.865  | 13.636  | 12.453  | 12.591  | 10.021  |
| ABD       | 4.049   | 4.690   | 5.067   | 4.521   | 4.912   | 4.653   |
| TÜRKİYE   | 2.900   | 2.930   | 2.289   | 2.740   | 2.900   | 2.750   |
| HİNDİSTAN | 1.915   | 2.498   | 2.498   | 2.520   | 2.258   | 2.300   |
| İRAN      | 1.693   | 1.573   | 1.573   | 1.573   | 1.573   | 1.573   |
| RUSYA     | 1.264   | 1.416   | 1.409   | 1.311   | 1.509   | 1.277   |
| ŞİLİ      | 1.420   | 1.310   | 1.210   | 1.335   | 1.310   | 1.360   |
| BREZİLYA  | 1.231   | 1.377   | 1.262   | 1.041   | 1.045   | 1.045   |
| UKRAYNA   | 1.211   | 1.100   | 1.100   | 1.100   | 1.100   | 1.100   |
| DİĞER     | 71.635  | 74.174  | 76.789  | 76.936  | 78.759  | 76.208  |

Ülkemiz, elmanın gen merkezi konumunda olup, birçok elma çeşidinin kültür formlarının ülkemizde oluştuğu tespit edilmiştir. Ekolojik açıdan büyük farklılık gösteren ülkemizde farklı ekolojilere uygun ve o bölgeye özgü olarak yetiştirilen 500'ün üzerinde elma çeşidi bulunmaktadır. (Özbek, 1978).

Türkiye'de elma yetiştiriciliği neredeyse tüm illerde yapılmakla birlikte özellikle son yıllarda belirli yörelerde yoğunlaşmış ve buralarda ticari amaçla elma üretimi gerçekleştirilerek yeni teknik ve teknolojilerin kullanılmasıyla birim alandan daha çok ürün almak amaçlanmıştır (Karaçayır, 2008). Çizelge 1.3'te Türkiye'de yıllar itibariyle elma üretim alanları gösterilmiştir. 2012 yılında 174.811 ha olan elma üretim alanları 2016 yılında yaklaşık %1 oranında azalarak 173.394 ha olmuştur.

Çizelge 1.3. Türkiye'de elma üretim alanları (ha)

| Yıllar    | 2012    | 2013    | 2014    | 2015    | 2016    |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Alan( ha) | 174.811 | 173.095 | 171.417 | 171.410 | 173.394 |

Kaynak: (FAO, 2018)

Türkiye, dünya elma üretiminde önemli ülkelerden birisidir. Sıralamadaki yeri yıldan yıla değişmekle birlikte, elma üretim alanı ve miktarı bakımından dünyanın ilk 4 ülkesi arasında yer almaktadır.

Türkiye’de üretilen toplam elma miktarı dünya elma üretim miktarının %4,05’ini karşılarken bu oran 2017/18 üretim sezonunda %0,44 oranında azalarak %3,61’e düşmüştür. Türkiye’de toplam yumuşak çekirdekli meyve üretim miktarı 3.542.680 ton olup ilk sırada 2.925.828 ton ile elma yer almaktadır (TÜİK, 2017).

Çizelge 1.4. Türkiye Elma Üretimi (TÜİK,2017)

| Yıllar | Üretim Alanı ( ha) | Üretim Miktarı ( ton) |
|--------|--------------------|-----------------------|
| 2007   | 1.577.510          | 2.457.845             |
| 2008   | 1.583.996          | 2.504.494             |
| 2009   | 1.626.499          | 2.782.365             |
| 2010   | 1.650.775          | 2.600.000             |
| 2011   | 1.666.718          | 2.680.075             |
| 2012   | 1.748.126          | 2.888.985             |
| 2013   | 1.730.955          | 3.128.450             |
| 2014   | 1.714.169          | 2.480.444             |
| 2015   | 1.714.098          | 2.569.759             |
| 2016   | 1.733.935          | 2.925.828             |

2016 yılında Türkiye elma üretim alanları 1.733.935 ha olup ilk sırayı 234.090 da ile Niğde ili almaktadır. Isparta 228.137 da ile ikinci sırada yer alırken, Karaman 195.563 da ile üçüncü sırada yer almıştır (TÜİK, 2018).

Niğde ili 2012 yılında Türkiye elma üretim alanlarının %12,27'sine sahipken yıllar içinde elma üretim alanları artmış ve 2016 yılında Türkiye elma üretim alanlarının %13,50'sine sahip olmuştur. Isparta Türkiye elma üretim alanlarının %13,16'sına ve Konya ise %11,28'ine sahiptir (TÜİK, 2018).

Ülkemizde ticari olarak elma üretiminde Isparta, Karaman, Niğde, Denizli, Konya, Çanakkale, Antalya ve Bursa söz sahibi iller arasında yer almaktadır.

Çizelge 1.5. Konya İli Elma Üretim Alanı ve Miktarı (Son 5 yıl) (TÜİK, 2017)

| Yıllar | Üretim Alanı (da) | Üretim Miktarı (ton) |
|--------|-------------------|----------------------|
| 2012   | 94.037            | 59.969               |
| 2013   | 95.028            | 75.666               |
| 2014   | 95.316            | 60.538               |
| 2015   | 97.081            | 69.107               |
| 2016   | 102.469           | 101.081              |

Çizelge 1.6. Niğde İli Elma Üretim Alanı Ve Miktarı (Son 5 yıl) (TÜİK, 2017)

| Yıllar | Üretim Alanı (da) | Üretim Miktarı (ton) |
|--------|-------------------|----------------------|
| 2012   | 214.553           | 317.271              |
| 2013   | 216.982           | 349.122              |
| 2014   | 220.99            | 127.945              |
| 2015   | 228.520           | 416.671              |
| 2016   | 234.090           | 376.906              |

Golden Delicious, Starking Delicious, Amasya elması, Fuji, Granny Smith, Gala grubu, Jersey mac, Scarlet Spur ve Jonagold ülkemizde yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan çeşitlerdir.

Çizelge 1.7. Türkiye'de çeşitlerine göre meyve veren yaşıta elma ağaç sayısı (bin adet) (TÜİK 2018)

| Yıllar/Çeşit        | 2012   | 2013   | 2014   | 2015   | 2016   |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Starking</b>     | 16.894 | 16.679 | 16.793 | 17.052 | 18.273 |
| <b>Golden</b>       | 10.803 | 10.829 | 10.872 | 11.316 | 11.486 |
| <b>Amasya</b>       | 4.308  | 4.138  | 4.151  | 4.211  | 4.112  |
| <b>Granny Smith</b> | 2.120  | 2.173  | 2.487  | 2.688  | 2.945  |
| <b>Diğer</b>        | 11.128 | 13.258 | 14.362 | 17.004 | 18.768 |
| <b>Toplam</b>       | 45.253 | 47.077 | 48.665 | 52.271 | 55.584 |

Dünyanın bitkisel üretim yapılan tüm alanlarında önemli düzeyde ürün ve kalite kayıplarına yol açan pek çok hastalığın sorumlusu virüslerdir. Viral etmenlerin sebep olduğu hastalıklar nedeniyle kültür bitkilerinde meydana gelen kayıplar bazen ılımlı bazen de felaket derecelerinde ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda virüslerin neden olduğu hastalıkların diğer bitki hastalık etmenlerinden daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Yardımcı, 2013). Bitki virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi olmaması nedeniyle diğer bitki hastalık etmenleriyle kıyaslandığında önemini arttırmıştır (Pavan ve ark, 2008). Dünyanın birçok yerinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan elmada rapor edilen bazı virüs hastalıkları, familyaları ve taşınma yolları aşağıda verilen çizelgedeki gibidir.

Çizelge 1.8. Elmada rapor edilen bazı virüs hastalıkları, familyaları ve taşınma yolları

| FAMİLYA          | CİNS                | TÜR                                     | TAŞINMA ŞEKLİ      |
|------------------|---------------------|-----------------------------------------|--------------------|
| Bromoviridae     | <i>Ilarvirus</i>    | Apple Mosaic Virus (ApMV)               | Aşı/M.İnokulasyon  |
| Betaflexiviridae | <i>Trichovirus</i>  | Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) | Aşı/ M.İnokulasyon |
| Betaflexiviridae | <i>Capillovirus</i> | Apple Stem Grooving Virus (ASGV)        | Aşı/ M.İnokulasyon |
| Betaflexiviridae | <i>Foveavirus</i>   | Apple Stem Pitting Virus (ASPV)         | Aşı/ M.İnokulasyon |
| Secoviridae      | <i>Cheravirus</i>   | Cherry Rasp Leaf Virus (CRLV)           | Aşı/ Nematod       |
| Secoviridae      | <i>Nepovirüs</i>    | Tomato Ring Spot Virus (ToRSV)          | Aşı/ Nematod       |
| Bromoviridae     | <i>Ilarviruss</i>   | Tulare Apple MosaicVirus (TAMV)         | Aşı/ M.İnokulasyon |

Çizelgede belirtilen virüsler arasında yer alan Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), *Bromoviridae* familyası, *Ilarvirus* cinsi içinde yer almaktadır. *Ilarvirus* cinsi, serolojik karakterlerine göre 3 alt gruba ayrılmıştır. ApMV, *Ilarvirus* cinsinin altgrup 3'ünde yer almaktadır. Viral hastalık etmeni olarak 19. yüzyılın başlarında belirlenmesinden bugüne kadar elma yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede tespit edilmiştir (Howell ve ark, 1991).

Virüs, 25 ve 29 nm çapında izometrik şekilli partiküllere sahiptir. ApMV partikülleri, tek sarmal ssRNA yapısında olup %16 nükleik asit ve %84 protein içermektedir. Virüsün genom yapısında üç ayrı genomik (RNA 1, RNA 2 ve RNA 3) ve bir adet subgenomik (RNA 4) tespit edilmiş olup bu dizilimin örtü proteini (coat protein-CP) geninden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Brunt ve ark., 1996).

ApMV'nin 19 familyadan 65 bitki türünü hastalandırdığı ve çok geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu rapor edilmiştir (Zeki, 1991). Virüs odunsu



bitkilerden böğürtlen, ahududu, elma, kayısı, kiraz, badem, erik ve şeftali, fındık, gül ve şerbetçi otunda belirlenmiştir. Ayrıca, ApMV'nin dişbudak, atkestanesi ve kırmızı atkestanesinde de varlığı rapor edilmiştir (Polak ve Zieglerova, 1997).

ApMV'nin doğal vektörü bilinmemektedir (Postman ve Mahlenbacher, 1994). Bununla birlikte virüs, mekaniksel olarak bitki öz suyu, virüsle enfekteli aşı materyalinin kullanılması, bitkiler arasında kök kaynaşması ve vejetatif üretim materyallerinin kullanılması ile taşınabilmektedir. Ayrıca, virüsün fındıkta polen ve tohum ile taşınabildiği bildirilmiştir (Aramburu ve Rovira, 2000).

ApMV, konukçuları üzerinde yapraklarda sarımsı-beyaz renklenmeler, mozaik halkalı lekeler ve damar bantlaşması şeklinde tipik belirtiler gösterir. Bu belirtiler; elma çeşidi, virüs ırkı ve virülensi, çevre şartlarına göre ve yıldan yıla değişiklik gösterebilir. Kuvvetli güneş ışığında yapraklardaki lekelenmeler nekrotik lekeler dönüşmekte ve erken döküme neden olmaktadır. Hastalık yapraklarda küçük sarı noktalar halinde de kendini gösterebilmektedir. Belirtiler genellikle yazın erken dönemde görülmekte olup sıcaklığın yükselmesiyle maskelenebilmektedir (Bauman, 1972).

Mejneke ve ark., (1963) ApMV'nin ağacın büyüme ve gelişmesini % 20-50 gerilettiğini ayrıca meyve verimini de % 30 oranında düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, elma mozaik virüsünün elma fidanlarının gelişmesini de olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (Klinkowski, 1960).

Bu yüksek lisans tez çalışması, Konya ve Niğde illerinde yeni tesis edilmiş elma üretim alanlarında ApMV'nin saptanması bu çalışmada kullanılacak farklı izolatların elde edilmesi ile etmen virüsün ortaya konulması, Konya ve Niğde illerinden elde edilen bazı ApMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda, virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen elma ağaçlarından yaprak örnekleri alınarak, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Casper (1973), *Apple mosaic virus*'e ait 3 virüs izolatu ve *Prunus necrotic ring spot virus*'e ait 2 virüs izolatu'nun melez çay gülünden alınan altı virüs izolatu ile karşılaştırmalı olarak serolojik testini yapmıştır. Test sonucunda 2 izolatu'nun açık bir şekilde ApMV'ye, 3 izolatu'nun ise PNRSV'ye ait olduğunu saptamıştır. Oysaki çalışmanın başında 3 izolatu ApMV'nin 2 izolatu ise PNRSV'nindir. Bu test ile PNRSV serotipinden ApMV serotipine uzanan ve gülden alınan izolatlarla sürekli olarak spectrum içinde olduğunu bildirmiştir.

Sano ve ark. (1985), ApMV'nin %2 askorbik asit, %2 nikotin ve %0,83 PVP içeren 0,05 M sodyum fosfat tampon solüsyonu (PH:8) ile *Cucumis sativus* kotiledonlarına aşılama ve bitkileri sırasıyla 16 saat ve 8 saat'lik peryotlarda 25 derecede sabit sıcaklıkta bekletmiştir. Araştırmacılar bazı bitkileri inokulasyondan önce 1 gün boyunca karanlıkta bıraktıklarında yapılan testler sonucunda ApMV'nin hıyar bitkisi kotiledonlarında klorotik lekeler oluşturmadığı fakat sistemik infeksiyonlara neden olduğunu saptamışlardır.

ApMV'nin yapraklarda oluşturduğu klorotik renk değişimi simptomsu ile yaprak bitlerinin yapraklar üzerinde beslenmesi sonucu oluşturdukları mozaik simptomların ve mikro besin elementlerinden özellikle de Mn, Fe, Zn ve Mg noksanlık belirtileriyle ApMV infeksiyonunun karıştırılabileceğini bildirmiştir (Nemeth, 1986).

Barbara (1988), elma yetiştiriciliğinde % 20 oranında ürün kaybına neden olduğu bilinen ApMV'nin aynı zamanda süs bitkilerinde de önemli kalite kayıplarına neden olduğunu bildirmiştir. Bu kayıpları en aza indirmek için de virüsten arı üretim materyalleri ile yetiştiricilik yapılmasının gerektiğini ve bunun büyük önem arz ettiğini rapor etmiştir.

Posnette (1989), yumuşak çekirdekli meyvelerde ApMV'nin aşıyla taşınarak hastalık oluşturduğunu ilk kez 1825 yılında rapor etmiş, fakat uzun yıllar bu konuyla ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Fidan (1994), Balıkesir, Denizli, Çanakkale, İzmir ve Uşak illerindeki elma bahçelerinde yaptığı surveylerde, 1992 yılında topladığı 450 örneği DAS-ELISA test yöntemine göre tanılamış ve 4 örneğin ApMV ile infekteli olduğunu ve 1993 yılında topladığı 220 örnekten, 63 örneğin (%28,6) ACLSV ile 52 örneğin (%23,6) ise ASGV ile infekteli olduğunu ilk kayıt olarak rapor etmiştir.

Aynı çalışmada ApMV ile infekteli örnekleri, *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn ve *C. sativus* L. bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule etmiştir. *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn indikatör bitkisinin virüsle inokule edilen yapraklarında 0.1 mm çapında nekrotik lekeler görüldüğünü, *Cucumis sativus* L. indikatör bitkisinin kotiledon yapraklarında klorotik lokal lekeler oluştuğunu, *N. glutinosa* L. da herhangi bir belirti gözlenmediğini, ACLSV ile infekteli örneklerin *C. quinoa* L.'da nekrotik lekeler, ASGV ile infekteli örneklerin ise *N. glutinosa* L.'da çizgi deseni oluşturduğunu bildirmiştir.

Türk (1996), Slovenya'da infekteli elma ağaçlarının farklı bitki dokularından alınan örneklerde; ApMV, ACLSV, ASGV varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA yöntemi kullanılarak makine ve el yardımıyla hazırlanan örnek preparatları karşılaştırmıştır. ApMV, ACLSV, ASGV 'nin varlığını tespit etmekte en iyi sonuç veren bitki dokusunun petal yapraklar olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca el yardımıyla hazırlanan örnek preparatların ise bu üç virüsü belirlemede daha verimli sonuç verdiğini bildirmiştir.

Poniedzialek ve ark. (2001), Hollanda, Çek Cumhuriyeti ve Polonya'daki 13 fidanlıktan alınan jonagold elma çeşidi örneklerinde ACLSV, ApMV ve ASGV'nun varlığını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda ApMV'nin %25 oranla en fazla Polonya'dan alınan örneklerde bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve alanları dışında fındık yetiştiriciliği yapılan alanlarında da ApMV rapor edilmiştir. Bu farklı türlerdeki ApMV izolatları ile yapılan RFLP çalışmaları sonucunda CP gen bölgesinde büyük oranda homoloji olduğu rapor edilmiştir (Sökmen, 2003).

Ulubaş ve Ertunç, (2003), Elma ağaçlarında ApMV'nin varlığını tespit etmek amacıyla viral etmenin kılıf protein bölgesindeki DNA primerlerini kullanarak RT-PCR yöntemini uygulamışlardır. RT-PCR testi ile ApMV'nin tespit edilmesinin ELISA testlerine uygunluk gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu test yönteminin karantina ve aşı kalemi ile sertifikasyon programlarında elma gen kaynaklarının test edilmesinde kullanışlı ve güvenilir olduğu sonucuna varmışlardır.

Salem ve ark. (2005), Ürdün'de sertifikasyon programı kapsamında yürüttükleri survey çalışmasında elma, armut ve ayva bahçelerinden virüs simptomsu gösteren ve göstermeyen ağaçlardan aldıkları yaprak örneklerinde, ACLSV, ApMV, ASGV ve ToRSV'nun varlığını DAS-ELISA yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. Örneklerin büyük çoğunluğunun çalışılan bu dört virüsle bulaşık olduğunu saptamışlardır.

Tzanetakis ve ark. (2005), yabani çilek bitkilerinde ve aşılı çilekte *Strawberry pallidosis associated virüs* (SPaV) ve *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV)'ün yanı sıra *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV)'nünde infeksiyon oluşturduğunu belirtmişler ve bu doğrultuda ApMV'nin her iki virüs ile nükleotid dizilerinin %87-91, aminoasit dizisinin ise %79-88 oranlarında benzerlik taşıdığını saptamışlardır.

Yardımcı ve ark. (2005), Isparta ili elma yetiştiriciliği yapılan alanlarda elma mozaik virüsü varlığını saptamak amacıyla surveyler yapmışlardır. 2001-2003 yılları arasında yapılan surveyler sonucunda alınan 276 yaprak örneğine DAS-ELISA testleri uygulamış sonucunda 82 örnekte (Granny Smith, Imperator ve M9 anaçları) ApMV saptamışlardır. Bu çalışma Isparta yöresinde elma üretim alanlarında ApMV'nin saptanması amacıyla yürütülen ilk çalışma olmasından dolayı önemlidir.

Akbaş ve İlhan (2005) Isparta, Karaman ve Niğde illerinde ApMV'nin varlığını saptamak ve yaygınlığını belirlemek amacıyla Mayıs ve Haziran aylarında simptomolojik olarak gözlem yapmışlar ve ApMV ile bulaşık olduğundan

şüphelendikleri Starking, Granny Smith, Gala, Jonaagold, Anna, Gold Star, Golden Delicious ve Rajka çeşiti elma ağaçlarından 461 adet örnek toplamışlardır. Toplanan bu örneklerle DAS-ELISA testi uygulamışlar ve tüm örnekler ApMV infekteli bulunmuş ve bölgede yaygınlık oranını %68,3 olarak saptamışlardır. Aynı zamanda mekanik inokulasyon yöntemiyle de testler yapmışlar böylece *C. sativus* L. bitkisinde tipik ApMV smptomlarına rastlamışlar ancak *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn indikatör bitkisinde herhangi bir simptome rastlamamışlardır. Viral etmenin en yaygın olduğu çeşidi ise *Granny Smith* olarak saptamışlardır.

Kutluk Yılmaz ve ark. (2005), Tokat ili Merkez, Pazar, Turhal ve Artova ilçelerinde elma bahçelerinde *Apple Mosaic İlarvirüs* (ApMV)'nün yayılışını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda bu ilçelerde 24 elma bahçesinden toplanan 116 adet örnek DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiş ve test sonucunda %6,9'unun ApMV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Ayrıca, Merkez ilçesinden alınan örneklerde ApMV bulaşıklık oranını %15,09 olarak belirlemişlerdir. Hastalığın yaygın görüldüğü çeşiti ise *Granny Smith* olarak saptamışlardır.

Özdemir ve ark. (2006), karantina kapsamında inceledikleri 26 elma anacı ve 17 aşılı elma fidanını ApMV ve ACLSV'ye karşı 5 armut anacı ve 6 aşılı fidanı ise ACLSV'ye karşı tanılamak için DAS-ELISA yöntemini uygulamışlardır. Yaprak örneklerinin bu iki virüsle infekteli olmadığını saptamışlardır.

Çağlayan ve ark. (2006), Türkiye'de elma yetiştiriciliğinin yoğun olduğu bölgelerde elmalarda önemli zarara yol açan dört virüs hastalığının yaygınlık durumlarını değerlendirmek amacıyla 2004 yılında infekteli olduğundan şüphelenilen 174 bitki örneği toplamışlardır. Toplanan örnekleri ApMV, ASGV ve ACLSV'ye karşı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testlemişlerdir. Toplanan 174 örneğin 126 tanesinin en az bir virüs ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir. Hastalık yaygınlık oranını ise ticari elma bahçelerinde toplanan örneklerdeki bulaşıklık dikkate alınarak %70,21 olarak saptamış çoğunluğu çeşit bahçelerinden

alınan gözlerle üretilen fidanlarla kurulmuş olan ticari bahçelerde infeksiyon oranının ise daha yüksek olup % 75 oranında olduğunu rapor etmişlerdir.

Dursunoğlu ve Ertunç (2006), Orta Anadolu, Akdeniz, Karadeniz ve Marmara Bölgesi'ndeki sürvey çalışmalarında infekteli olduğundan şüphelendikleri elma, armut ve ayva ağaçlarından yaprak ve sürgün örnekleri toplamışlar ve bu örnekleri DAS-ELISA test yöntemiyle testlemiş ve tanılamışlardır. Örneklerin % 29,75'inin ApMV ile infekteli olduğunu saptamışlardır.

Akpınar (2009), Trakya bölgesinde güllerde görülen virüslerin çeşitli yöntemler kullanarak saptanmasını amaçlayan çalışmasında Edirne, İstanbul, Kırklareli ve Tekirdağ'ın 18 ilçesinden karakteristik hastalık belirtileri sergileyen güllerden toplam 287 yaprak örneği toplamıştır. Toplanan yaprak örneklerine (DAS-ELISA) serolojik testi uygulamış ve bu örneklerde *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple mosaic virus* (ApMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) virüslerinin varlığını saptamaya çalışmıştır. Sonuç olarak yaprak örneklerinin 18 adedinde ApMV, 17 adedinde ise PNRSV saptamıştır. Ancak serolojik olarak saptanan bu virüsler *Chenopodium quinoa* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. ve *Cucumis sativus* L. (Çengelköy, hıyar) indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucu biyolojik olarak doğrulanamamıştır. Bunun nedeni olarak da inokulasyonların 2008 yaz mevsiminde yüksek sıcaklık derecelerinden dolayı simptomların maskelenmesi olduğunu bildirmiştir.

Şevik (2009), Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarla dünya üretiminde söz sahibi olduğumuz fındığın üretim alanlarında ApMV'nin varlığını tespit etmiştir. Bu çalışma ile fındık üretim alanlarında *Apple mosaic ilarvirüs* (ApMV)'ünün morfolojik özellikleri, doğal konukçuları, simptomları, taşınma şekli, coğrafi dağılımı ve kontrol yöntemlerini saptamıştır.

Uzunogulları ve ark. (2009) Güneydoğu Marmara Bölgesi'nde yer alan Bursa, Kocaeli, Sakarya ve Yalova illeri ve bu illere bağlı 11 ilçedeki 170 bahçeden ApMV'yi saptamak amacıyla 2006 yılında surveyler yapmış ve elde

edilen örnekleri DAS-ELISA yöntemiyle testlemişlerdir. Testleme sonucunda 11 farklı elma çeşidinin %15,8 12 farklı armut çeşidinin %24,7 ve 7 farklı ayva çeşidinin ise %21 oranında hastalıkla infekteli olduğunu saptamışlardır. Yapılan çalışmayla çeşit düzeyinde bulaşıklık tespit edilmiştir Starking delicious, Golden delicious elma çeşitlerinin, Santa maria, Akça ve Deveci armut çeşitlerinin ve Eşme ayva çeşidinin virüs ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Çek Cumhuriyeti'nde ApMV'nin varlığını tespit edebilmek için gerekli uygun koşullar araştırılmış ve çiçeklenme öncesinde seçilmiş olan 472 elma ağacından örnekler almışlardır. Alınan bu örnekler farklı dokulardan ( yaprak, çiçek, dormant tomurcuk filament) alınmıştır. ApMV'yi genç elma yapraklarında tespit etmişlerdir. Bu çalışmayla ApMV enfeksiyonunun en yüksek konsantrasyona sahip olduğu dönemi çiçeklenme öncesi Nisan ayı olarak belirtmişlerdir (Svaboda ve ark, 2010).

Ertunç ve ark. (2010), Türkiye'deki elma mozaik virüs izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu ve sekans analizi çalışmalarını yürütmüşlerdir. Bu doğrultuda ülkemizde elma ve fındık üretimi yapılan alanlarından hastalıkla şüpheli olduğu düşünülen örnekler toplamışlar ve toplanan örnekler mekanik inokulasyon, DAS-ELISA yöntemi ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak ile testlemişlerdir. Böylelikle patojenin varlığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak Türkiye'nin değişik bölgelerine ait 7 elma ve 9 fındık izolatının sekansını gerçekleştirmişlerdir.

Ertunç ve ark. (2011), 2008-2009 yılları arasında Ukrayna elma üretim alanlarından toplanan örnekler ait izolatlar ile ülkemiz elma ve fındık üretim alanlarından toplanan örnekler ait izolatları karşılaştırmışlardır. Yapılan karşılaştırma çalışmalarında Ukrayna izolatları ile Türk izolatlarının baz dizilerinin benzer olduğu saptanmış ve buna karşılık Türk izolatlarının kendi içinde 9 ayrı genotipe ayrıldığı ancak Ukrayna izolatlarının birbirleriyle benzer olduğu bildirilmiştir.

Değirmenci ve ark. (2011) Amasya ve Tokat illerinde 2008-2010 yılları arasında yürüttükleri çalışmada eriklerde *European plum pattern* hastalığının etmeni olan ApMV'nin varlığının tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 2008-2010 yılları arasında erik bahçeleri ve diğer meyve plantasyonları gezilerek simptomolojik olarak gözlemler yapmışlar ve toplamda 549 adet erik örneği toplamışlardır. Toplanan bu erik örnekleri DAS-ELISA ve RT-PCR metotları ile testlenmiştir. Test sonuçlarına göre süt eriği ağaçlarında hastalığın yaygınlık oranını Amasya'da % 46,1, Tokat'ta ise % 16,6 olarak rapor etmişlerdir.

Korkmaz ve ark. (2013), Doğu Anadolu Bölgesi Van ve Malatya illerinde ApMV'nin yayılım alanlarını saptamak amacıyla survey çalışmaları kapsamında bölgede yer alan ticari elma bahçeleri gezilerek toplamda 481 elma örneği toplamışlardır. Bu örnekleri Dot-blot hibridizasyon ve RT-PCR metodları kullanarak testlemişlerdir. Sonuç olarak ApMV bulaşıklık oranını % 0,8 olarak saptamışlardır. Aynı zamanda Malatya'dan alınan örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ApMV-G ve ApMV-M izolatlarının örtü proteinini (coat protein) klonlamışlar ve nükleotid dizilerini belirlemişlerdir. Watpade ve ark., (2013), Elma yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV) ve *Apple chlorotic leaf spot virus* ( ACLSV)'nün her ikisinin de aynı anda tespiti amacıyla dublex RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Böylelikle her iki virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen örneklerde viral etmenin ne olduğunun tespitinde kullanılabilirliği kolay, zamandan tasarruf sağlayacak bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemin kültür çeşitlerinde yabani elma çeşitlerinde ve anaçlarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Grimova ve ark. (2016), Elma mozaik virüsünün dünya çapında geniş alanlara yayılmış olmasından ve meyve, fındık ve şerbetçiotu üretimi üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı bu virüs ile ilgili tüm bilgileri derlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma kapsamında virüsün taksonomik sınıflandırması, genom yapısı, konukçu dizisi, semptomları, taşınma şekli virüsün teşhisi ve sebep olduğu hastalıklar ile bunların kontrol yöntemlerini derlemiştir.





## 3. MATERYAL VE METOT

## 3.1. Materyal

## 3.1.1. Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

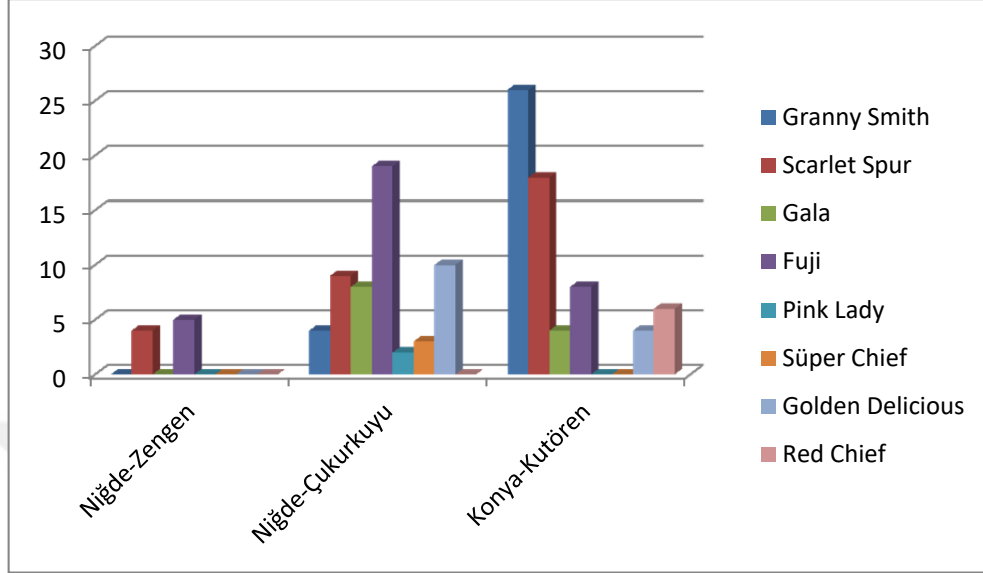
Yürütülen bu çalışmada, 2017-2019 ilkbahar ve yaz dönemlerinde Niğde ili; Zengen ve Çukurkuyu ilçeleri/mahallesi ve Konya ilinde ise, Kutören mahallesinde yeni kurulan 100 dekarın üzerinde olan elma bahçelerinde simptomatolojik gözlemler sonucu ApMV ile bulaşık olduğu düşünülen elma ağaçlarından alınan yaprak örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerin alındığı yerler ve testlenen bitki sayısı Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı

| Bahçe Mevkii | Bahçe Numarası | Alınan Örnek Sayısı | Çeşit Dağılımı (adet)                                     |
|--------------|----------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| cNiğde       | Zengen-1       | 9                   | ScarletSpur-4<br>Fuji-5                                   |
|              | Çukurkuyu-1    | 10                  | Fuji- 3<br>Pink Lady-2<br>Süper Chief-3<br>Granny Smith-2 |
|              | Çukurkuyu-2    | 13                  | Fuji-5<br>Gala-3<br>Scarlet Spur-3<br>Granny Smith-2      |
|              | Çukurkuyu-3    | 10                  | Scarlet Spur-2<br>Gala-3<br>Fuji-2<br>Golden Delicious-3  |

Çizelge 3.1'in devamı

|               |                    |          |                                                                  |
|---------------|--------------------|----------|------------------------------------------------------------------|
|               | <b>Çukurkuyu-4</b> | <b>6</b> | <b>Gala-2</b><br><b>Fuji-3</b><br><b>Scarlet Spur-1</b>          |
|               | Çukurkuyu-5        | 7        | Golden Delicious-3<br>Fuji-4                                     |
|               | Çukurkuyu-6        | 9        | Scarlet Spur-3<br>Golden Delicious-4<br>Fuji-2                   |
| <b>Konya</b>  | Kutören-1          | 14       | Golden Delicious-2<br>Granny Smith-6<br>Scarlet Spur-4<br>Fuji-2 |
|               | Kutören-2          | 6        | Scarlet Spur-3<br>Granny Smith-3                                 |
|               | Kutören-3          | 12       | Granny Smith-7<br>Scarlet Spur-3<br>Gala-2                       |
|               | Kutören-4          | 10       | Granny Smith-2<br>Scarlet Spur-4<br>Fuji-2<br>Golden Delicious-2 |
|               | Kutören-5          | 7        | Granny Smith-1<br>Red Chief-6                                    |
|               | Kutören-6          | 9        | Fuji-4<br>Gala-2<br>Scarlet Spur-3                               |
|               | Kutören-7          | 8        | Granny Smith-7<br>Scarlet Spur-1                                 |
| <b>Toplam</b> | 14                 | 130      |                                                                  |



Şekil 3.1. Örneklerin alındığı yer ve testlenen bitki sayısı

Arazi çalışmalarında 14 bahçe 6220 da alan simptomolojik olarak taranmış ve ApMV ile infekteli olduğundan şüphelenilen toplam 130 adet elma sürgün ve yaprak örneği toplanmıştır. Tez çalışması, Ç.Ü.Z.F. Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı ve mevcut iklim odalarında yürütülmüştür.

### 3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Niğde ve Konya illerinin ilçelerinde/mahallelerinde tez kapsamı dahilindeki üretim alanlarındaki ApMV ile bulaşık olduğundan şüphe edilen elma ağaçlarından alınan bitki dokuları serolojik çalışmalarda materyal olarak kullanılmıştır. Alınan bu örnekler öncelikle Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) testine tabi tutulmuştur.

DAS-ELISA testlerinde, ayrıca ticari olarak temin edilen Bioreba firmasının ApMV'ye spesifik ELISA kiti, ELISA pleytleri (NUNC), otomatik

pipetler, pipet uçları, saf su, tampon çözeltiler (Ek-1) ve ELISA okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılmıştır.

### 3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyal

ELISA testleri sonucunda ApMV ile infekteli olduğu saptanan arazi örnekleri materyal olarak kullanılmıştır.

TNA ekstraksiyonu işleminde; ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, ekstraksiyon paketleri (BIOREBA), eppendorf tüpleri, steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler (Ek-2), masa tipi soğutmalı santrifüj (Universal 320R) kullanılmıştır.

### 3.1.4. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

ApMV'nin moleküler tanısı amacıyla virüs ile bulaşık elma yapraklarından elde edilen TNA'lar çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

RT-PCR uygulamalarında, Moloney Murine Leukaemia Virus'den oluşan Revert Aid Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV 200 U/μl, 10000 U, Thermo Scientific) ve 5X Reaction Buffer for RT, Taq polymerase enzimi (Taq DNA polimeraz enzimi, 500 U, 5 U/μl, Thermoscientific), dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 4X25 μmol, Thermoscientific), MgCl<sub>2</sub>, DNA Ladder marker (100 bp, Solis Biodyne ve 100 bp Gene Direx), pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri, saf su ve Çizelge (3.2.)'de verilen virüse spesifik primerler (10 μM) kullanılmıştır.

PCR işlemi, Applied Biosystems marka thermocycler cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primer Çiftleri ve Band Büyüklüğü

| Primer Çiftleri | Dizi                                                                                     | Baz Çifti (bp) | Referans                 |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------|
| ApMV            | 5-3ATCGTCTGCAAGTACTGCAAT(Forward)<br>3-5 TCATAATTCTAACAAATC (Reverse)                    | 672            | Petrizk,(2005)           |
| ApMV            | 92D9UP(1)-<br>3(5'GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3')<br>1425RE(2)-<br>(5'ATCGGCAAAGTCAATGTTGAC3') | 382            | Petrizk,(2005)           |
| ApMV            | ApMV3(5'ATGCTTTAGTTTCCTCTCGG-3'<br>ApMV4(5'GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3')                     | 820            | Petrizk and Lenz, (2002) |

Seçilen primer çiftleri 1044-1025 nt karşılık gelen hareket proteini içeren (AMU15608 dizisi) CP –intergenik bölgesini büyütür (Petrizk,2005).

### 3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, RT-PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforez uygulamasında, agaroz (Sigma), tampon çözeltiler (Ek-3), Mini Sub. DNA Cell Elektroforez cihazı (BIORAD), güç kaynağı ve UV ışık kaynağından (UVP Ultraviolet Transilluminator) yararlanılmıştır.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi

Konya ve Niğde illerinde yeni tesis edilmiş olan elma bahçelerinde elmada zararlı ApMV'nin tanınması ve karakterizasyonu amacıyla Zengen, Çukurkuyu ve Kutören ilçelerinde/mahallelerinde arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Arazi

çalışmaları, 2017-2019 yıllarında ilkbahar ve yaz dönemlerinde elma alanlarında yapılmıştır.

Arazide öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılarak ApMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen elma yapraklarından ve sürgünlerinden örnek dokular alınmıştır. Örnek alınan elma yapraklarında damar dokusu çevresinde klorotik alanlar, yaprak deformasyonları, gelişmede azalma, yaprakta mozaik ya da beneklenme, bazen nekroz ve bozulma belirtileri aranmış, bu belirtilerden en az birini gösteren elma bitkilerinden yapraklar alınarak çalışmalarda kullanılmıştır (Nemeth, 1986) (Çizelge 3.3).

Araziden alınan örnekler numaralandırılarak buzdolabı poşetlerine konulmuş, laboratuvara getirilmiş ve çalışmalarda kullanılıncaya kadar, 7-10 gün gibi kısa süreliğine +4 C°'de, daha uzun süreliğine -20 C°'de muhafaza altına alınmıştır.

Çizelge 3.3. Arazi çıkışlarında elma ağaçlarında aranan belirtiler

| <b>Belirtiler</b>                   | <b>ApMV</b> |
|-------------------------------------|-------------|
| Yaprakta mozaik belirtiler          | √           |
| Yaprakta solgun krem renkli lekeler | √           |
| Yaprak damarlarında bant oluşumu    | √           |
| Gelişmede azalma                    | √           |
| Damarlar etrafında klorotik açılma  | √           |
| Yaprak deformasyonları              | √           |
| Nekroz                              | √           |

**3.2.2. Serolojik Çalışmalar**

Serolojik çalışmalarda; elma bahçelerinde simptomolojik olarak ApMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen elma ağaçlarından toplanan yaprak örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

DAS-ELISA testlerinde firmanın önerisi dikkate alınarak uygulanmıştır.

**3.2.2.1. DAS-ELISA Tekniği**

1. Testlenen virüse spesifik poliklonal  $\gamma$ -globulin (ApMV'ye spesifik antiserumlar; BIOREBA), firmanın bildirdiği yöntem göre 1/1000 oranında sulandırılarak kaplama tampon çözeltisinde karıştırılmış ve ELISA pleytlerinin her bir çukuruna 100  $\mu$ l olacak şekilde iki tekrarlı konulmuştur.
2. Pleytler, 37 °C'de 2-3 saat inkübasyona alınmış ve yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
3. 1/10 oranında hazırlanan ELISA ekstraksiyon tamponu ile bitki dokusu ezilerek özsuyu çıkartılmış ve her kuyuya 100  $\mu$ l koyularak pleytler +4 °C'de bir gece inkübasyona alındıktan sonra yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
4. Konjugat tamponu içerisine virüse spesifik konjugat ( $\gamma$ -globulin) sulandırılarak her kuyuya 100'er  $\mu$ l gelecek şekilde koyulmuş ve 37 °C'de 3 saat inkübasyona alındıktan sonra yıkama tamponu ile en az 3 dk 3 defa yıkanmıştır.
5. A1 kuyusu da dahil olmak üzere pleytlerin her kuyusuna substrat tampon çözeltisinden 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her çukura 100'er  $\mu$ l konularak pleytler 30-60 dk oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir.
6. Pleytteki sarı renk ölçümleri Thermo Scientific Multiskan Go marka ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunarak sonuçlar elde edilmiştir.



7. Yapılacak ELISA testlerinde, her bir pleytte pozitif, negatif ve buffer olmak üzere üç kontrol kullanılacaktır.
8. Testlerin değerlendirilmesinde, negatif kontrolün bulunduğu çukurlardan elde edilecek absorbans değerlerinin ortalamasının iki veya üç katı değerler veren çukurlardaki örnekler bulaşık kabul edilecektir (Clark ve Adams, 1977).

### 3.2.3. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonu, arazi çıkışlarında toplanan ve ELISA testi ile bulaşık olduğu saptanan bitki örneklerinden kullanılarak Astruc ve ark. (1996), önerdiği yöntemle göre yapılmıştır.

#### 3.2.3.1. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyonu Aşamaları

1. Örnekler ezme tamponu (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50 mM EDTA pH. 7.0, 500 mM NaCl, 10mM 2.merkapto etanol (1/1000)) ile 1:2 (ağırlık/hacim) oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen bitki özsuu eppendorf tüplere alınmıştır.
2. Bitki özsuundan 1ml alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve örnekler 3 dakika 4.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
3. Sıvı kısım üzerine % 20’lik Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 50 µl ilave edilerek vorteks ile karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C’de 30 dakika su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur.
4. Tüplere 250 µl potasyum asetat (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve 15 dakika 13.000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
5. Elde edilen sıvı kısım ikiye bölünmüş ve 500 µl’si eppendorf tüplerine aktararak -70 °C’de saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl sıvı kısım yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak ve üzerine %100’lük etil alkolden 500 µl ilave edilerek 1ml’ye tamamlanmış ve vorteks ile karıştırılmıştır.

6. Daha sonra tüplere 50 µl sodyum asetat (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -20 °C’de bir gece inkübe edilmiştir.
7. Örnekler 15 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilerek sıvı kısım ortamdan uzaklaştırılmıştır.
8. Eppendorf tüpleri filtre kağıdı üzerinde ters çevrilerek 5 dakika kurutulmuş ve pellet üzerine % 70’lik etil alkolden 1ml ilave edilmiştir.
9. Örnekler RNA’ları çöktürmek amacıyla 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki etil alkol dökülerek eppendorf tüpleri kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur.
10. Elde edilen nükleik asitler 50 µl RNaz saf su ile sulandırılarak, 15 µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünmüş ve -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.4. CTAB Nükleik Asit Ekstraksiyonu

CTab nükleik asit ekstraksiyonu, arazi çıkışlarında toplanan ve ELISA testi ile bulaşık olduğu saptanan bitki örneklerinden kullanılarak Fulton ve ark, (2007)’ın önerdiği yöntemle göre modifiye edilmiştir.

##### 3.2.4.1. CTAB Nükleik Asit Ekstraksiyonu Aşamaları

1. Bitki örnekleri ekstraksiyon tamponu (100 mM tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, %2 CTAB, %0.3 beta-mercaptoethanol) içerisinde 1/3 (w/v) oranında ekstraksiyon torbalarının içinde sulandırılarak homojenize edilir.
2. Ekstraksiyondan sonra 4.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmından 600 µl çekilerek yeni hazırlanan eppendorf tüplere aktarılır.
3. Bitki öz suyundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilir ve örnekler 65 °C’de su banyosunda 30 dakika inkübe edilir.
4. Eppendorf tüplere 600 µl kloroform-izomil alkol (24:1) eklenir ve 1 dakikalık vorteksin ardından 10 dakika 12.000 rpm’de santrifüj edilir.

5. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant kısımdan 500 µl çekilerek tekrar 1:1 oranında kloroform-izoamil alkol eklenir, 1 dakikalık vorteksin ardından 10 dakika 12.000 rpm’de santrifüj edilir.
6. Oluşan süpernatant kısımdan 350 µl alınarak 2/3 oranında isopropanol eklenir ve -20°C’de 1 saat bekletilir.
7. Daha sonra 15 dakika 12.000 rpm’de santrifüj edilir ve tüplerin içindeki sıvı kısım boşaltılır.
8. Eppendorf tüplere 1ml %70’lik alkol eklenerek 5 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilir. Alkol döküldükten sonra kurutma kâğıtları yardımıyla tüplerdeki alkol temizlenir.
9. Son aşamada 50 µl ddH<sub>2</sub>O su eklenir ve oda sıcaklığında 3-4 saat ekstrakte edilen nükleik asitin çözülmesi beklenir. Daha sonra DNA izolatları -20°C derecede eppendorf tüplerde muhafaza edilir.

### 3.2.5. RT-PCR Çalışmaları

Çalışmada ApMV’nin moleküler tanısını yapmak, dizi belirleme çalışmalarında kullanılacak DNA’ların elde edilmesini sağlamak ve moleküler karakterizasyonunu yapmak amacıyla RT-PCR çalışmaları Prieto ve ark. (2001) ve Sidek ve ark. (1999)’a göre modifiye edilerek yapılmıştır.

ApMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen örnekler ilçelere/mahallelere göre seçilerek moleküler çalışmalarda izolat olarak kullanılmıştır. Örneklerin isimlendirilmesinde her bir bahçenin bulunduğu mevkiye göre sırasıyla kod numarası verilmiştir. Her bahçeden alınan sürgün ve yaprak örnekleri alınan bahçenin adı ile tek tek numaralandırılmıştır. Aşağıda belirtildiği gibi kodlama yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Bitki örneklerinin kodlanması

| İl    | Bahçenin Yeri | Bahçe Numarası | Sürgün Numarası | Örnek Numarası |
|-------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| Konya | Kutören       | Kutören-3      | Kutören 3-1     | 1              |

Çizelge 3.5. RT-PCR çalışmalarında seçilen virüs izolatları ve alındığı iller

| Virüs İzolatı | Örnek Numarası | İl    | Yöntem |
|---------------|----------------|-------|--------|
| Kutören 3-1   | 1              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 2              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 3              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 4              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 6              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 7              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 3-1   | 9              | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-3   | 15             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-6   | 18             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-8   | 20             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-11  | 23             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-12  | 24             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 1-13  | 25             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 2-1   | 27             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 2-4   | 30             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 2-5   | 31             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 4-1   | 33             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 4-9   | 41             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 5-5   | 47             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 6-1   | 50             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 6-3   | 52             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-2   | 60             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-3   | 61             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-4   | 62             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-5   | 63             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-6   | 64             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-7   | 65             | Konya | RT-PCR |
| Kutören 7-8   | 66             | Konya | RT-PCR |
| Zengen 1-9    | 97             | Niğde | RT-PCR |
| Çukurkuyu 1-3 | 100            | Niğde | RT-PCR |
| Çukurkuyu 1-5 | 102            | Niğde | RT-PCR |
| Çukurkuyu 4-4 | 111            | Niğde | RT-PCR |

RT-PCR işlemi aşağıdaki şekilde iki aşamalı yapılmıştır:

1. aşamada, RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edilmiş; 2. aşamada ise elde edilen bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. RT işleminde, PCR tüplerinin her birine total RNA'dan 2 µl konulup, üzerine 1 µl primer (5 pmol/ µl) ilave edilerek thermocycler'a yerleştirilmiş ve 95°C'de 3 dk denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra tüpler buz üzerine alınarak 5 dk bekletilmiştir. PCR tüplerine 14,9 µl saf su, 5 µl RT tampon çözeltisi (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl dNTP (2 mM), 0.3 µl RNase ve 0.1 µl RT enzimi ilave edilerek, 48 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.

2. PCR işleminde ise ayrı bir PCR tüpüne, 1. aşamada yapılan işlemlerden elde edilen cDNA'lardan 2 µl konularak üzerine 16.3 µl saf su, 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris -HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer ilave edilmiştir.

Daha sonra tüpler 92D9UP(1)-3 (5'-GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3'),

1425RE(2) (5'-ATCGGCAAAGTCAATGTTGAC-3'),

5-3 (5'-ATCGTCTGCAAGTACTGCAAT-3') (Forward),

3-5 (5'-TCATAATTCTAACAAATC-3') (Reverse)

ApMV3 (5'ATGCTTTAGTTTCCTCTCGG 3')

ApMV4 (5'GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3') primer çiftleri için Çizelge 3.6'daki gibi olacak şekilde ayarlanarak PCR işlemi yapılmıştır.

Çizelge 3.6. ApMV için uygulanan PCR programı ve sıcaklıklar

| ApMV                                    | ApMV                                    |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 94 °C 2 dk                              | 94 °C 2 dk                              |
| 94°C 30 sn<br>50°C 30 sn<br>72 °C 90 sn | 94°C 30 sn<br>50°C 30 sn<br>68 °C 90 sn |
| 40 döngü                                | 35 döngü                                |
| 72°C 10 dk                              | 68°C 10 dk                              |

**3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları**

Agaroz jel elektroforez çalışması % 1.5'lik olacak şekilde Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre uygulanmıştır.

1. Cam erlen içerisine 20 ml 1X TAE (4.84 g Tris, 2ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, 1.142 ml Glacial acetic acid) ya da 1X TBE tampon çözeltisi konulmuş ve agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıcıda tutulmuştur.
2. Karışım kaynadıktan sonra ısıtıcıdan alınarak kısa bir süre soğumaya bırakılmış ve tank içerisine dökülerek tarak takılmıştır.
3. Jelin donması beklenmiş ve jel donduktan sonra tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jeli 1-2 mm geçecek kadar kullanılan buffera göre 1X TAE ya da 1X TBE eklenmiştir.
4. Örnekler ve marker 5 µl olacak şekilde jeldeki kuyulara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Marker ilk çukura konulmuş ve yükleme tamponundaki turuncu renk (Orange G) jelin sonuna gelene kadar elektroforez tankına virüslere göre değişmekle beraber 30 ya da 35 V elektrik akımı verilmiştir.
5. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dk süreyle ethidium bromid (30 µl ethidium bromid/100 ml saf su) çözeltisinde boyanmış ve daha sonra fazla ethidium bromidi uzaklaştırmak için 10 dk saf su içerisinde tutulmuştur.
6. Jel yıkandıktan sonra UV transilluminatör üzerine konulmuş ve UV ışıktaki ortaya çıkan bantlar gözlemlenerek fotoğrafı çekilmiştir.

**3.2.7. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları**

Bu çalışmada kullanılan ve ApMV için seçilen izolatların saptanması, dizi belirleme ve dizi analizi çalışmalarında izlenen yol Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.2. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Dizi analizi çalışmaları ticari hizmet alınarak yapılmıştır. Dizilemede anlamsız bölgeler silindikten (contique) sonra NCBI, BLAST ve MEGA 7 programları kullanılarak filogenetik ağaçlar elde edilmiş ve belirlenen izolatların dünyada bildirilmiş olan diğer izolatlarla benzerlik oranları saptanmıştır.

ELISA testinde pozitif çıkan örneklerle uygulanan RT-PCR çalışmalarında, net olarak band veren pozitif örnekler farklı bahçeleri temsil edecek şekilde seçilerek dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır.







**4. BULGULAR VE TARTIŞMA****4.1. ApMV ile Bulaşık Bitkilerin Saptanması**

ApMV izolatlarının toplanması, tanılanması ve karakterizasyonu amacıyla 2017-2019 ilkbahar ve yaz aylarında Konya (Kutören) ve Niğde (Zengen ve Çukurkuyu) illerinde elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı alanlarda yürütülen bu tez çalışmasında 6220 dönüm elma bahçesi ve yaklaşık 1.800.000 adet ağaç incelenerek simptomatolojik olarak yaprakların damarları çevresinde klorotik renk beneklenme, bazen nekroz belirtileri gösteren 130 elma ağacından dokular alınmış ve laboratuvar çalışmalarında öncelikle ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

Yapılan arazi çıkışlarında Konya'nın Kutören mahallesindeki 7 bahçeden 66 örnek; Niğde'nin Zengen ilçesindeki 1 bahçeden 9 örnek ve Çukurkuyu mahallesindeki 6 bahçeden de 55 örnek alınarak toplamda 130 ağaçtan örnekleme yapılmıştır.

ApMV'nin bitkide en fazla yapraklarda mozaik belirtiler, ilkbaharda solgun sarı veya açık krem renginde lekelenmeler, renk açılması ve deformasyon belirtilerine sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.7, Şekil 4.12, Şekil 4.13) Bitkide gelişme geriliği, yapraklarda sararma ve nekroz da belirtiler arasındadır (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.8, Şekil 4.9).

ApMV ile infekteli elma bitkilerinde ise en fazla sararma ve yapraklarda renk açılması belirtilerinin görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



şekil 4.1. Elma yaprağında mozaik belirtiler (Konya Kutüren/ApMV enfeksiyonu)



şekil 4.2. Elma yaprağında ApMV enfeksiyonuna bağlı solgun sarı veya açık krem renğinde lekeler (Konya/Kutüren)



şekil 4.3. Yaprakta ApMV infeksiyonuna bağlı damar açılması ve mozaik lekelenmeler (Konya/Kutören)



şekil 4.4. Yapraklarda ApMV infeksiyonuna bağlı rozetleşme (Konya/Kutören)



şekil 4.5. Elma sürgününde ApMV infeksiyonuna bağlı gelişme geriliği (Konya/Kutören)



Şekil 4.6. Elma yaprağında ApMV enfeksiyonuna bağı şiddetli renk açılması ve nekroz (Konya/Kutören)



Şekil 4.7. ApMV ile bulaşık elma sürgününde nekroz, damar bantlaşması ve mozaik semptomlar



Şekil 4.8. Yaprakta sararma, mozaik lekeler ve nekrozlaşan alanlar (Konya/Kutören)



Şekil 4.9. ApMV ile bulaşık bir elma ağacında şiddetli damar açılması ve mozaik simptomsu (Konya/ Kutören)



şekil 4.10. ApMV ile bulaşık sürgünde damar bantlaşması simptome (Kutören/ApMV enfeksiyonu)



şekil 4.11. ApMV ile infekteli elma ağacında mozaik simptome (Kutören/ApMV)





Şekil 4.12. Elma yaprağında renk açılmaları (Kutören/ApMV enfeksiyonu)



Şekil 4.13. Büyüme döneminde ApMV ile enfekteli elma sürgününde mozaik belirtiler (ApMV enfeksiyonu)





Şekil 4.14. ApMV ile infekteli bitkinin yapraklarında renk açılması (ApMV enfeksiyonu)



Şekil 4.15. ApMV ile infekteli elma yapraklarında renk açılmaları (ApMV enfeksiyonu)

Bu tez çalışmasında 6220 dönüm alan gezilmiş yaklaşık 1.800.000 sayıda bitki simptomatolojik olarak incelenmiştir. Konya ve Niğde illerine bağlı elma yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı ilçelerden/mahallelerden ApMV'nin varlığını saptamak amacıyla toplam 130 adet örnek alınmıştır.

#### 4.2. ELISA Çalışmaları

Konya ve Niğde illerinde yeni kurulan elma bahçelerinde simptomatolojik olarak ApMV ile bulaşık olduğundan şüphelenilen 130 elma ağacından alınan dokulara uygulanan ELISA testleri sonucunda, 28 tanesi Konya Kutören mahallesinden, 1 tanesi Niğde Zengen ilçesinden ve 3 tanesi de Niğde Çukurkuyu mahallesinden olmak üzere toplamda 32 adet elma örneği ApMV ile infekteli bulunmuştur. Alınan örneklerin çeşit düzeyinde dağılımı yapıldığında Niğde ilinden toplamda 13 Scarlet Spur, 25 Fuji, 5 Süper Chief, 4 Granny Smith, 8 Gala ve 10 Golden Delicious; Konya ilinden ise 4 Golden Delicious, 26 Granny Smith, 18 Scarlet Spur, 7 Fuji, 4 Gala ve 6 Red Chief olmak üzere 130 örnek alınmıştır.

ELISA testi sonucunda ApMV ile infekteli örneklerin çeşit dağılımına bakıldığında 28 adeti *Granny Smith*, 3 adeti *Gala* ve 1 adeti ise *Scarlet Spur* olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Arazi çıkışı yapılan alanlar ve ELISA testi sonucu ApMV ile infekteli olan elma bitkileri

| Bahçe Mevkii | Bahçe Numarası | Alınan Örnek Sayısı | Çeşit Dağılımı (adet)                                     | Pozitif Sonuç Veren Çeşitler |
|--------------|----------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|
| Niğde        | Zengen-1       | 9                   | Scarlet Spur-4<br>Fuji-5                                  | Scarlet Spur-1               |
|              | Çukurkuyu-1    | 10                  | Fuji- 3<br>Pink Lady-2<br>Süper Chief-3<br>Granny Smith-2 | Granny Smith-2               |

Çizelge 4.1. devamı

|               |                    |           |                                                                  |                        |
|---------------|--------------------|-----------|------------------------------------------------------------------|------------------------|
|               | <b>Çukurkuyu-2</b> | <b>13</b> | <b>Fuji-5<br/>Gala-3<br/>Scarlet Spur-3<br/>Granny Smith-2</b>   | <b>0</b>               |
|               | Çukurkuyu-3        | 10        | Scarlet Spur-2<br>Gala-3<br>Fuji-2<br>Golden Delicious-3         | 0                      |
|               | Çukurkuyu-4        | 6         | Gala-2<br>Fuji-3<br>Scarlet Spur-1                               | Gala- <b>1</b>         |
|               | Çukurkuyu-5        | 7         | Golden Delicious-3<br>Fuji-4                                     | 0                      |
|               | Çukurkuyu-6        | 9         | Scarlet Spur-3<br>Golden Delicious-4<br>Fuji-2                   | 0                      |
| <b>Konya</b>  | Kutören-1          | 14        | Golden Delicious-2<br>Granny Smith-6<br>Scarlet Spur-4<br>Fuji-2 | Granny Smith- <b>6</b> |
|               | Kutören-2          | 6         | Scarlet Spur-3<br>Granny Smith-3                                 | Granny Smith- <b>3</b> |
|               | Kutören-3          | 12        | Granny Smith-7<br>Scarlet Spur-3<br>Gala-2                       | Granny Smith- <b>7</b> |
|               | Kutören-4          | 10        | Granny Smith-2<br>Scarlet Spur-4<br>Fuji-2<br>Golden Delicious-2 | Granny Smith- <b>2</b> |
|               | Kutören-5          | 7         | Granny Smith-1<br>Red Chief-6                                    | Granny Smith- <b>1</b> |
|               | Kutören-6          | 9         | Fuji-4<br>Gala-2<br>Scarlet Spur-3                               | Gala- <b>2</b>         |
|               | Kutören-7          | 8         | Granny Smith-7<br>Scarlet Spur-1                                 | Granny Smith- <b>7</b> |
| <b>Toplam</b> |                    | 130       |                                                                  | 32                     |

Daha önce yapılan bir çalışmada, ülkemizde ApMV'nin farklı elma çeşitlerinde saptandığı bildirilmesine karşılık (Akbaş ve İlhan, 2005), bizim yaptığımız bu çalışmada *Granny Smith* çeşidinde en yaygın olduğu belirlenmiştir.

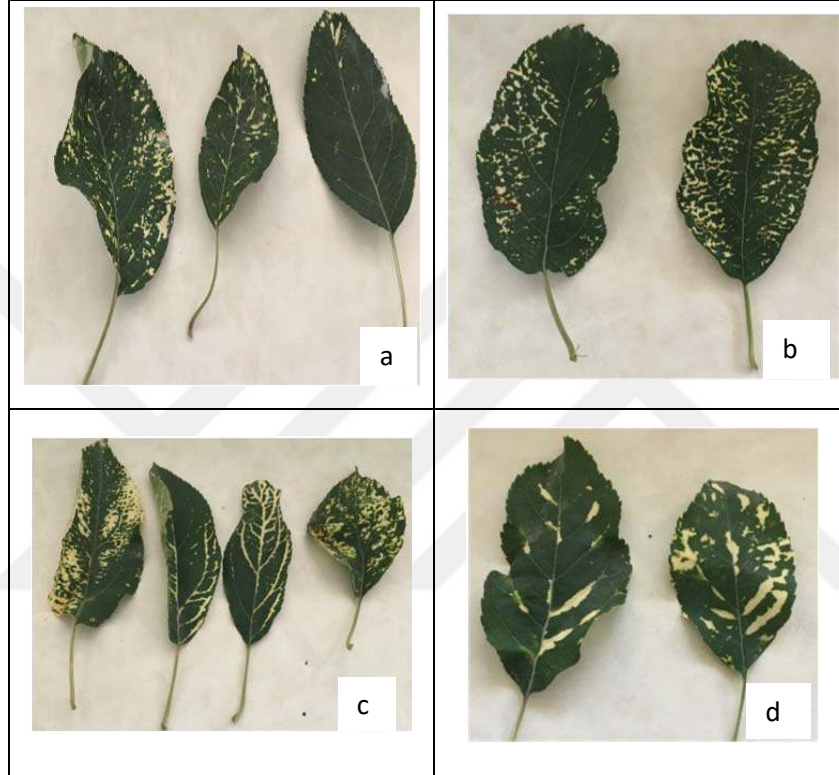
Birişik ve ark. (2006) Adana, Antalya, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinde 2002–2005 yıllarında yaptıkları survey çalışmaları sonucunda 112 elma bahçesinden 338 adet örnek toplamışlar örnekleri elmada zarar yapan birkaç virüse karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda ApMV ile bulaşıklık oranını %4 olarak saptamışlardır. Örnek toplama aşamasında yürüttüğümüz tez çalışmamızda olduğu gibi tesadüfi olarak simptomolojik gözlemler ile örnek toplamışlardır. Çalışmamızda toplanan örnekler baz alınarak yapılan DAS-ELISA testi sonucunda ApMV ile bulaşıklık oranı %26.4 olarak saptanmıştır.

Uzunoğulları (2008), Marmara Bölgesi'nde Bursa, Sakarya, Kocaeli ve Yalova illerindeki survey çalışmalarında elma ağaçlarından toplanan 333 yaprak ve 147 çiçek örneğinin DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 26 yaprak örneğini ApMV ile infekteli olarak bulmuştur. Aynı zamanda ApMV'nin en çok zarar yaptığı çeşidi bizim çalışmamızdan farklı olarak Starking Delicious olarak saptamış ve en yaygın olduğu ili ise Yalova olarak bildirmiştir. Yürüttüğümüz tez çalışmamızda ise ApMV'nin en yaygın olduğu çeşit *Granny Smith* olarak belirlendi.

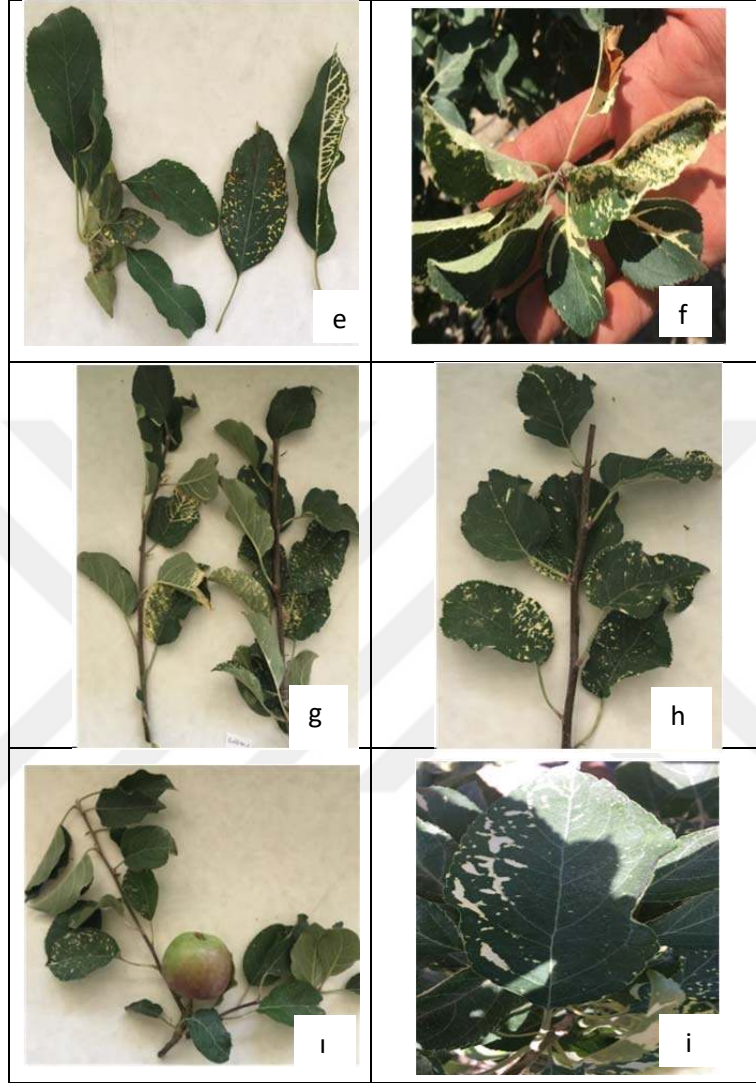
ApMV'nin belirtilerinin elma çeşidi, virüs ırkı, virülensi ve çevre şartlarına göre yıldan yıla değişebildiğini Baumann (1972) ve Kutluk Yılmaz (2005) ileri sürmüşlerdir.

Yardımcı ve ark, (2006), Isparta ili elma üretim alanlarında gözlenen ve ApMV benzeri infeksiyon belirtisi sergileyen etmenin tespiti amacıyla serolojik ve simptomatolojik çalışmalar yürütmüşlerdir. Surveyler sırasında araziden toplanan örneklerin tümüne DAS-ELISA testi uygulamışlar ve testlenen 276 şüpheli örnekten 82'sinde elma mozaik virüsü saptamışlardır. *Granny Smith*, *Imparator* çeşitleri ve M9 anaçlarından alınan örneklerin virüsle infekteli olduğunu buna karşılık *Golden Delicious* ve *Starking Delicious* örneklerinin temiz olduğunu rapor

etmişlerdir. Bu çalışmada edinilen sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermiştir. Her iki çalışmada da ApMV ile bulaşık bulunan çeşit Granny Smith'dir.

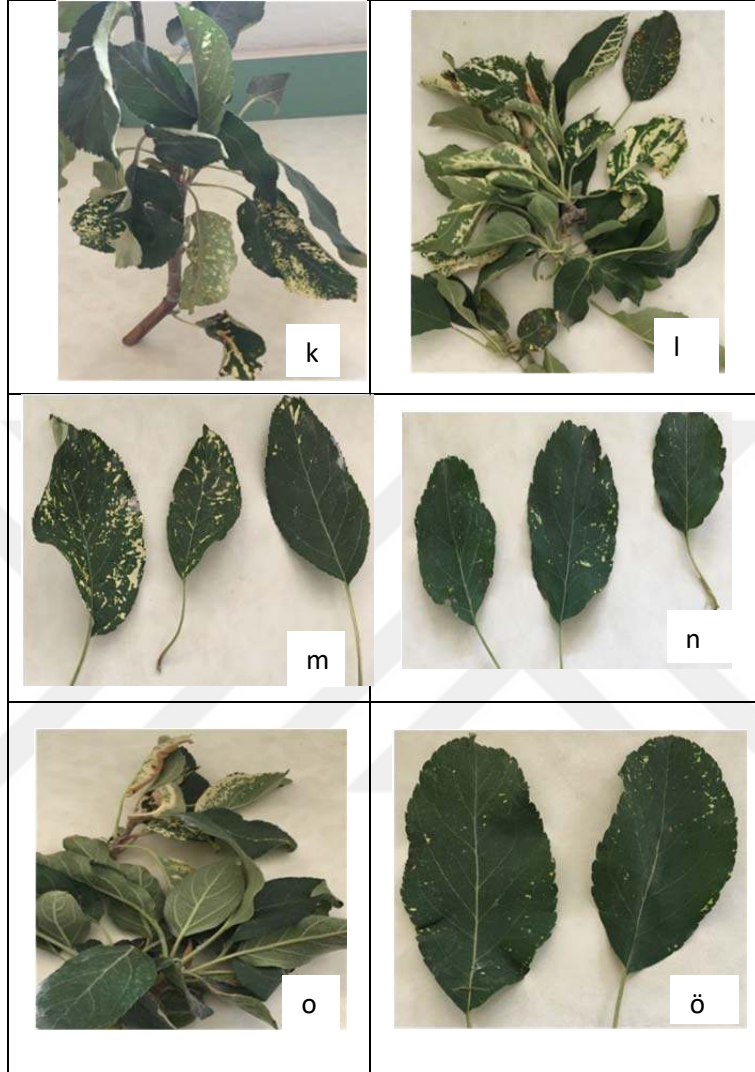


Şekil 4.16. ApMV-2(a), ApMV-3(b), ApMV-4(c), ApMV-7(d) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu yaprak deformasyonu ve mozaik lekelenmeler, damar bantlaşması, yaprakta sarımsı renk açılması belirtileri

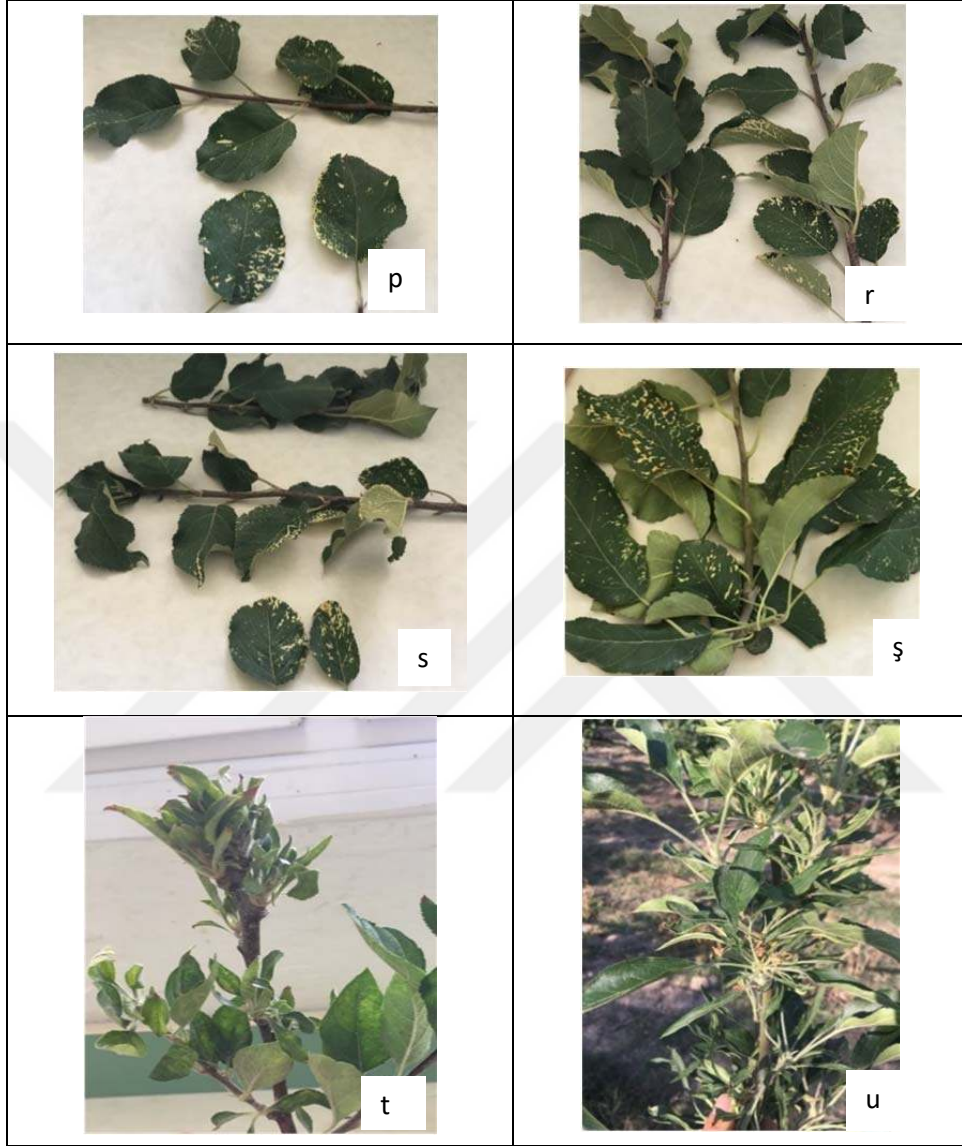


Şekil 4. 17. ApMV-15(e), ApMV-33(f), ApMV-6(g), ApMV-9(h), ApMV-18 (i) ApMV-23 (i) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu yaprak deformasyonu ve mozaik lekelenmeler, damar bantlaşması, yaprakta sarımsı renk açılması, nekroz belirtileri.





Şekil 4.18. ApMV-25(k), ApMV-27(l), ApMV-30(m), ApMV-31(n), ApMV-41(o), ApMV-47(ö) izolatlarının elma yapraklarında neden olduğu mozaik lekelenmeler, nekroz, damarlar çevresinde renk açılması belirtileri



Şekil 4.19. ApMV-50(p), ApMV-60(r), ApMV-63 (s), ApMV-64(ş), ApMV-66(t), ApMV-102(u) izolatlarının elma yapraklarında neden oldukları sarımsı beyaz lekeler, mozaik belirtiler, rozetleşme belirtileri

DAS-ELISA testlerinde pozitif sonuç vererek ApMV ile bulaşık olduğu saptanan örneklerde görülen belirtiler incelendiğinde. yaprak deformasyonu ve mozaik lekelenmeler, yapraklarda mozaik belirtiler, damar bantlaşması,



yapraklarda sarımsı damar açılmaları, nekroz ve damar bantlaşmaları (Şekil 4.16), şiddetli ApMV enfeksiyonu sonucunda yaprak üzerinde nekroze olmuş alanlar, mozaik simptomlar, nekroz, damarlarda renk açılmaları ve yapraklarda sarımsı beyaz lekelenmeler oluşmaktadır( Şekil 4.17). Şekil 4.19 incelendiğinde bu örneklerin DAS-ELISA testlerinde pozitif sonuç verdiği ve ApMV simptomlarını taşıdığı buna karşılık daha hassas bir yöntem olan RT-PCR yöntemiyle testlendiğinde ise negatif sonuç alındığı görülmektedir.

Çizelge 4.2. DAS-ELISA ve RT-PCR Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

| Belirgin Simptom                       | İlgili Görsel | Testleme Yöntemi Sonucu |        | ApMV ile Bulaşıklık Durumu |
|----------------------------------------|---------------|-------------------------|--------|----------------------------|
|                                        |               | DAS-ELISA               | RT-PCR |                            |
| Mozaik                                 | Şekil 4.17    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.18    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.25    | +                       | -      | -                          |
|                                        | Şekil 4.27    | +                       | -      | -                          |
| Yapraklarda sarımsı beyaz lekelenmeler | Şekil 4.22    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.23    | +                       | -      | -                          |
| Yaprak deformasyonu                    | Şekil 4.17    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.32    | +                       | -      | -                          |
| Damar bantlaşması                      | Şekil 4.19    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.28    | +                       | -      | -                          |
|                                        | Şekil 4.26    | +                       | -      | -                          |
| Nekroz ve damarlarda renk açılması     | Şekil 4.20    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.21    | +                       | +      | İnfekteli                  |
|                                        | Şekil 4.22    | +                       | +      | İnfekteli                  |
| Rozetleşme ve gelişme geriliği         | Şekil 4.37    | +                       | -      | -                          |
|                                        | Şekil 4.38    | +                       | -      | -                          |

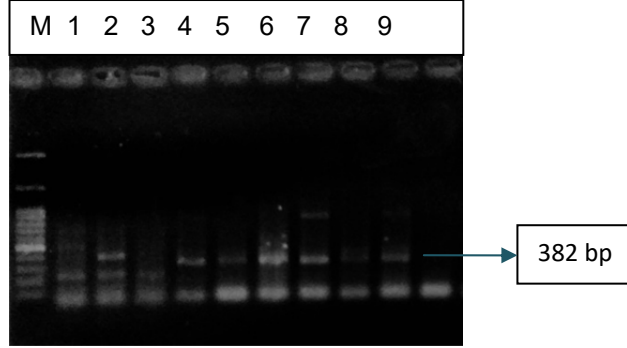
**4.3. Total Nükleik Asit ( TNA) Ekstraksiyon Çalışmaları**

ELISA testleri sonucunda ApMV ile infekteli olduğu belirlenen elma ağaçlarının yapraklarından alınan dokular kullanılarak TNA ve CTAB olmak üzere 2 yöntem de uygulanmış ancak TNA yönteminde RNA izolasyonu daha başarılı olmuştur. ApMV ilarvirüs cinsinden RNA virüsü olduğu için CTAB yönteminde kullanılan chloroform RNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır. Bu sebeple CTAB yöntemiyle RNA izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Yöntemin RNA virüsleri için uygun bir nükleik asit izolasyon yöntemi olmadığı kanatına varılmıştır.

**4.4. RT-PCR Çalışmaları**

Bu tez çalışmasında, ELISA testleri sonucu pozitif sonuç veren izolatlar ApMV'nin moleküler karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır. PCR çalışmalarında ApMV'ye özgü primer çiftleri kullanılarak konuyla ilgili çalışmalar yapan bazı araştırmacıların elde ettikleri band büyüklüğünde bandlar bulunmuştur. ApMV'ye spesifik primer çiftleri için 2 farklı PCR sıcaklık döngüsü kullanılmış fakat 94 °C 2 dk, 94°C 30 sn, 50°C 30 sn , 68 °C 90 sn (35 döngü), 68°C10 dk bu sıcaklık değerlerinde 92D9UP 3(5'GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3') ve 1425RE (5'ATCGGCAAAGTCAATGTTGAC3') primer çiftiyle sonuç alınırken, diğer primer çiftlerinden herhangi bir sonuç alınamamıştır.

ApMV için 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti kullanılarak Konya ili Kutören mahallesinde yer alan bahçelerden toplanan elma izolatlarına ait 382 bp büyüklüğünde bandlar elde edilmiştir (Şekil 4.39). Bu sonuçlar Petrisk, (2005)'nin çalışması ile benzerlik göstermiş, yapılan bu çalışmada aynı araştırmacılar 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primerlerini kullanarak 382 bp'lik bandlar gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.20. ApMV'nin Kutören izolatları ( ApMV-1, ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-6, ApMV-7, ApMV-15, ApMV-21 ve ApMV-33) kullanılarak 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti ile yapılan RT-PCR bandları

Öztürk ve ark. (2011) Granny Smith çeşidi üzerinde yaptıkları çalışmada topladıkları 58 örneğe RT-PCR testi uygulamışlar ancak hiçbir örnekte tekli ApMV enfeksiyonuna rastlamamışlardır. Tüm örneklerde farklı virus enfeksiyonu saptamışlardır.

#### 4.5. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

PCR çalışmaları sonucu elde edilen PCR ürünlerine ait nükleotid dizileri, Polar kimya firması tarafından ticari olarak belirlenmiş ve bu tez çalışmasında kullanılan izolatlara ait sekans bilgileri dünyada kaydedilmiş diğer izolatlarla nükleotid düzeyde karşılaştırılarak filogenetik ağaçlar elde edilmiştir.

##### 4.5.1. Elma Mozaik Virüsü ( *Apple mosaic virus*, ApMV)'nün Dizi Belirleme Çalışması

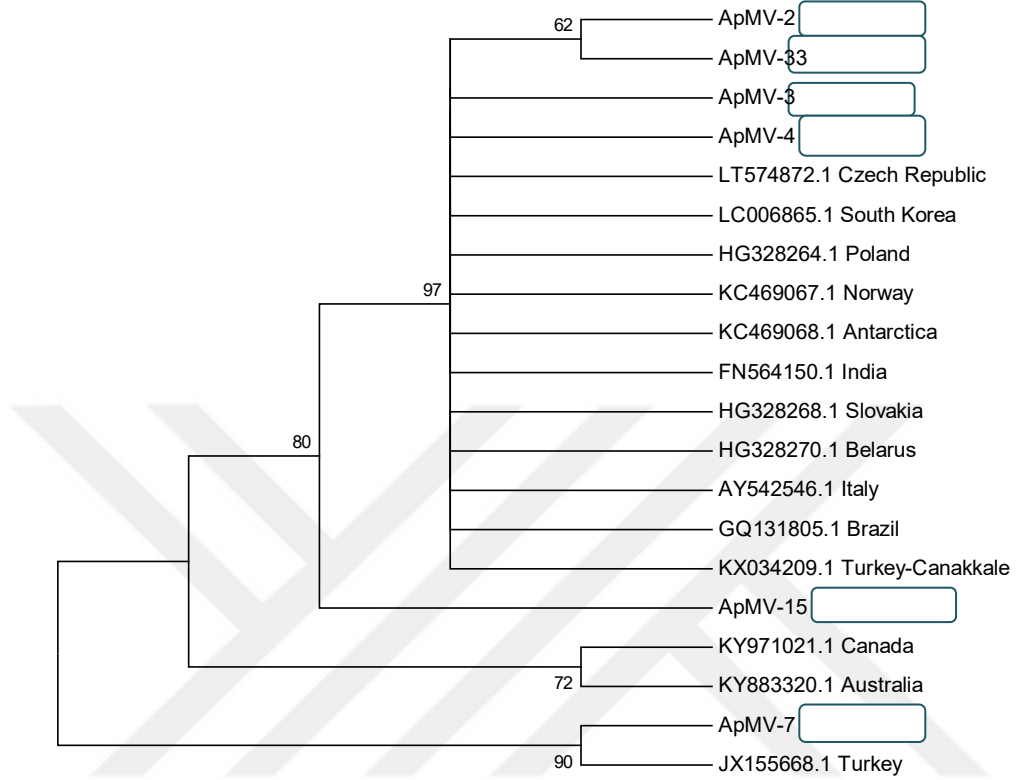
ApMV dizi belirleme ve analiz çalışmalarında ApMV ile infekteli elma bitkilerinden izole edilen ApMV-2 (Kutören 3-2), ApMV-3 (Kutören 3-3) , ApMV-4 (Kutören 3-4) , ApMV-7 (Kutören 3-7) ,ApMV-15 (Kutören 1-3) ve ApMV-33 (Kutören 4-1) izolatları kullanılmıştır.

Filogenetik soyağacı oluşturulurken kullanılan izolatlar çizelge 4.3’de gösterildiği şekilde isimlendirilmiştir.

Çizelge 4.3. Filogenetik soyağacı oluşturulurken kullanılan izolatların isimlendirilmesi

|             |         |
|-------------|---------|
| Kutören 3-2 | ApMV-2  |
| Kutören 3-3 | ApMV-3  |
| Kutören 3-4 | ApMV-4  |
| Kutören 3-7 | ApMV-7  |
| Kutören 1-3 | ApMV-15 |
| Kutören 4-1 | ApMV-33 |

92D9UP 3(5’GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3’) ve 1425RE (5’ATCGGCAAAGTCAATGTTGAC3’) primer çifti ile yapılan ApMV izolatlarının (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15 ve ApMV-33) yer aldığı filogenetik ağaç incelendiğinde, ApMV-2 (Kutören 3-2) ve ApMV-33 (Kutören4-1 ) izolatları diğerlerinden farklı olarak kendi aralarında bir grup oluştururken, ApMV-3 (Kutören 3-3) ve ApMV-4 (Kutören 3-4) izolatları (Türkiye (KX034209.1), Güney Kore (LC006865.1), Kanada (KY971021.1), Çek Cumhuriyeti ( LT574872.1), Hindistan ( FN564150.1), Slovakya (HG328268.1), Avusturalya (KY883320.1), Belarus ( HG328270.1), Antarktika ( KC4690368.1), Brezilya ( GQ13185.1), İtalya ( AY542546.1) ve Norveç ( KC469067.1)) izolatları ile aynı gruba dahil olmuştur. Buna karşılık ApMV-15 (Kutören 1-3) izolatı, diğer izolatlarla %80 benzerlik göstermesine rağmen tek başına farklı bir grup oluşturmuştur. ApMV-7 (Kutören 3-7) izolatı ise, Türkiye izolatı (JX155668.1) ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.40). Bu izolatların dünyada yer alan diğer izolatlarla benzerlik oranı ise Çizelge 4.4’ de verilmiştir.



Şekil 4.21. 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti ile saptanan ApMV izolatlarının (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15, ApMV-33) filogenetik soyağacı (Bootstrap 1000 tekrarlamalı)

Çizelge 4.4. Sekans Analizi Çalışmalarında Kullanılan Dünya'nın Farklı Yerlerinden Rapor Edilen ApMV İzolatlarının Konukçuları, Benzerlik Oranı ve Orjini

| ApMV | Accession Number | % Identity | Host                                      | Origin          |
|------|------------------|------------|-------------------------------------------|-----------------|
|      | JX155668.1       | 93,45      | <i>Malus domestica</i>                    | Türkiye         |
|      | KX034209.1       | 93,45      | Apple                                     | Türkiye         |
|      | LC006865.1       | 93,04      | Leaves of peach                           | Güney Kore      |
|      | KY971021.1       | 91,64      | <i>Malus spp.</i>                         | Kanada          |
|      | LT574872.1       | 91,64      | <i>Malus silvestris</i>                   | Çek Cumhuriyeti |
|      | FN564150.1       | 91,27      | <i>Malus domestica</i>                    | Hindistan       |
|      | HG328268.1       | 90,61      | <i>Malus domestica</i>                    | Slovakya        |
|      | KY883320.1       | 90,55      | Leaf                                      | Avusturalya     |
|      | HG328270.1       | 90,55      | <i>Malus domestica</i>                    | Belarus         |
|      | KC469068.1       | 90,55      | <i>Malus spp.</i>                         | Antarktika      |
|      | GQ13185.1        | 90,18      | <i>Malus domestica</i><br><i>cv. Fuji</i> | Brezilya        |
|      | AY542546.1       | 90,18      | Pear                                      | İtalya          |
|      | KC469067.1       | 89,82      | <i>Lasallia pustulata</i>                 | Norveç          |



**5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Bu çalışmayla, Konya ve Niğde illerinde yeni kurulmuş olan elma bahçelerinde elma mozaik virüsünün yaygınlığının belirlenmesi, ayrıca ApMV'yi saptayarak bu çalışmada kullanılacak olan izolatların elde edilmesi; Konya ve Niğde illerinden elde edilen bazı ApMV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda, virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen elma ağaçlarından örnek dokular alınarak, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (RT-PCR) yöntemler ile testlenmiş ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında saptanan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a) Yeni kurulan elma bahçelerine yapılan arazi çıkışları sonucunda toplam 6220 dönümlük alanda yaklaşık 1.800.000 adet elma ağacı simptomolojik olarak incelenerek 130 adet elma ağacından örnek toplanmış ve ApMV tespiti için DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur.
- b) Konya ilinden 66 örnek ve Niğde ilinden ise 64 örnek toplanmıştır.
- c) ELISA testi sonuçlarına göre 28'i Kutören (Konya), 1'i Zengen (Niğde) ve 3 tanesi de Çukurkuyu (Niğde)'dan olmak üzere toplam 32 ağacın ApMV ile bulaşık olduğu saptanmıştır.
- d) ELISA testi ile ApMV ile infekteli olduğu saptanan bu 32 örnek çeşit bazında incelendiğinde çeşitlerin 28 tanesi *Granny Smith*, 1 tanesi *Scarlet Spur* ve 3 tanesi ise *Gala* olarak belirlenmiştir. Böylelikle ApMV'nin en yaygın olduğu çeşit *Granny Smith* olarak belirlenmiştir.
- e) Total NA ekstraksiyon çalışmalarında CTAB ve TNA olmak üzere her iki yöntem de kullanılmış ancak TNA yöntemiyle RNA izolasyonu daha başarılı olmuştur.



- f) RT-PCR çalışmalarında DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren bu 32 örnek ApMV'ye karşı testlenmiş ve 8 örnek ApMV primeri ile band vermiştir.
- g) RT-PCR çalışmalarında ApMV ile infekteli olduğu saptanan 8 izolatin da hepsi Kutören (Konya) mahallesinden alınmıştır.
- h) RT-PCR aşamasında TNA preparasyonları, Petrizk, (2005) (672 bp) ve Petrizk and Lenz, (2002) (820 bp) tarafından bildirilen primer çiftleri ile amplifiye olmamış ve sonuç elde edilememiştir.
- i) 92D9UP(1) ve 1425RE(2) primer çifti ile yapılan ApMV izolatlarının (ApMV-2, ApMV-3, ApMV-4, ApMV-7, ApMV-15 ve ApMV-33) yer aldığı filogenetik ağaç incelendiğinde, ApMV-2 (Kutören 3-2) ve ApMV-33 (Kutören4-1 ) izolatları diğer izolatlarla benzerlik taşımasıyla birlikte farklı olarak kendi aralarında bir grup oluştururken, ApMV-3 (Kutören 3-3) ve ApMV-4 (Kutören 3-4) izolatları seçilen dünya izolatları (Türkiye (KX034209.1), Güney Kore ( LC006865.1), Kanada ( KY971021.1), Çek Cumhuriyeti (LT574872.1), Hindistan (FN564150.1), Slovakya (HG328268.1), Avusturalya (KY883320.1), Belarus (HG328270.1), Antarktika ( KC4690368.1), Brezilya ( GQ13185.1), İtalya ( AY542546.1) ve Norveç ( KC469067.1)) ile aynı gruba dahil olmuştur. Buna karşılık ApMV-15 (Kutören 1-3) izolatu diğer izolatlarla %80 benzerlik göstermesine rağmen kendi başına farklı bir grup oluşturmuştur. ApMV-7 (Kutören 3-7) izolatu ise, Türkiye izolatu (JX155668.1) ile aynı grupta yer almıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda alınan örneklerle serolojik testler uygulandığında ApMV ile bulaşıklık oranı %24,6 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak yürütülen tez çalışmasında elma yetiştiriciliğinde sorun olan ve kimyasal mücadelesi olmayan ApMV'nin tanınması ve karakterizasyonu amacıyla

serolojik ve moleküler yöntemler uygun bir şekilde gerçekleştirilerek pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmasının yapıldığı Konya ve Niğde illerinde yıllık 450 bin tonun üzerinde üretimi yapılan elma bölge için önemli ürünlerden biridir. Aynı zamanda elmanın gıda sanayinde birçok alanda kullanımının artması ve ihracatta önemli ürünler içinde yer alması, bölgede yoğun şekilde ticari üretim yapan bahçelerde üründe meydana gelecek en ufak bir zararı dahi tolera edemeyecek duruma gelmiştir. Bölgede farklı illerden gelen fidanlarla bahçe kurulumu yapıldığı için, etmen virüsün yayılmasını kontrol altına almak oldukça güçtür. Etmenin vegetatif olarak aşı ile ve ayrıca polen ile yayılması, etkili bir kimyasal mücadelesinin olmaması önemini arttırmıştır.

Bu virüse karşı, yapılacak olan en etkili mücadele yöntemi, ismine doğru virüsten ari üretim materyalinin kullanılması, koruyucu kültürel uygulamalar, dayanıklı veya tolerant çeşitlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılması, virüs ile bulaşık olan bitkilerin üretim alanından uzaklaştırılarak imha edilmesi. Aynı zamanda üreticilerin sertifikalı fidan kullanımı hususunda daha hassas ve dikkatli olmaları sağlanmalıdır.



## KAYNAKLAR

- Agrios, (1997). *Plant Pathology*. Academic Press Inc. New York: USA. 635p.
- Akpınar, G., (2009). Türkiye’de Trakya Bölgesi’nde Güllerde Görülen Virüslerin Biyolojik Ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması Üzerine Araştırmalar. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, (32), (26-28).
- Akbaş ve İlhan, (2005). Widespread Distribution of *Apple mosaic virus* on Apple in Turkey. APS Plant Disease Vol.89, No.9 September 2005
- Anonymous, 2017. <http://www.meyed.org.tr/tr/meyed-tarim/bahcecilik/elma>. (Erişim Tarihi: 01.09.2017).
- Anonymous, 2017. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (Erişim tarihi: 01.09.2017).
- Anonymous, 2014. Faostatagriculturedata<http://www.fao.org/page/form?collection=Production&Domain=Production&servlet=1&language=EN&hostname=apps.fao.org&version=default>.
- Aramburu, Rovira, (2000). Incidence and natural spread of *Apple mosaic virus* in hazel in north-east Spain. *Plant Pathology* 49, 423–427.
- Barbara, (1988). Apple virus in European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publication Oxford. 17-19 p:13-14, U.S.A.
- Baumann G, (1972). Wichtige Viruserkrankheiten des Kern-und Steinobstes. Erkennung und Verhütung. Erwerbsobstbau.14: 175-198.
- Brunt A.A, Crabtree K., Dallwitz, M. J, Gibbs. A.J, Watson. L, (1996). Viruses of plants. Ed: A. Brunt, K. Crabtree, M. Dallwitz, A. Gibbs, L. Watson, University Press Cambridge, England, pp: 100-105.
- Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., Gazel, M, Jelkman, W. (2006). Detection of four apple viruses by Elisa and RT-PCR assay in Turkey. Turk. J. Agric For. 30: 241-246.
- Campbell. A. I, (1963). The Effect of some latent virus infections on the growth and cropping of apples. J. Hort.Sci., 38: 15-19.

- Casper, R. (1973). Serological properties of *Prunus necrotic ringspot* and *Apple mosaic virus* isolates from rose. *Phytopathology* 63, 238–240.
- Clark, M. ve Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. of Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Değirmenci, K. Akbaş, B. 2011. Amasya ve Tokat illerinde yetiştirilen eriklerde Elma mozaik virüs (*Apple mosaic virus*, ApMV)’ü enfeksiyonu ve yaygınlığı. *Bitki Koruma Bülteni*, 2.207-213.
- Dursunoğlu, Ş. ve Ertunç, F. 2006. Distribution of Apple Mosaic Virus in Turkey. XX. International Symposium on Virus and Virus Like-Diseases of Temperate Fruit Crops and XI. International Symposium on Small Fruit Virus Diseases. 104 p.
- Ertunç, F., Sokmen, M.A., Sezer, A., Canik, A., 2009. Current Status of *Apple mosaic virus* in Turkey. *21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops Germany*, 5 - 10. July.
- Fidan, Ü., 1994. Indexing of apple trees for Apple Mosaic Virus, Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple Stem Grooving Virus by ELISA. *Journal Turkish Phytopathology*, 23: 127-132.
- Fulton, R.W., 1983. İlarvirus Group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 213, Kew, Surrey, UK.
- Grimova, L., Winkowska, L., Kondray, M. ve Rysanek, P. 2016. Apple mosaic virüs. *Phytopathologia Mediterranea*, 55-1: 1-19.
- Howell, W. E., Parish, C. L., ve Mink, G. I., 1991. In: Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. (Eds.). *Compendium of Apple and Pear Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 77.
- Kaygısız, H. 2002. *Elma Yetiştiriciliği*, Hasat Yayıncılık, İstanbul.
- Klinkowski, M. 1960. *Pflanzliche Virologie*. Band II. Akademik Verlag, Berlin, 279 p.

- Korkmaz, G., Sipahioğlu, H.M., Usta, M. 2013 . Survey of *Apple mosaic virus* in apple-growing provinces of East Anatolia (Malatya and Van) by RNA probe hybridization assay and RT-PCR. Turkish Journal of Agriculture and Forestry,37: 711-718 .
- Kutluk Yılmaz, N. D., Yanar,Y., Kadioğlu, İ., Yanar, D. 2005. Tokat ili elma bahçelerinde Apple Mosaic Virus (Apmv)'un yayılış durumunun belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (3): 12-15.
- Meijneke, R.A.C., Posnette, A. F., Schuch, K. 1963. The economic importance of virus diseases of apples and pears. Virüs Diseases of Apples and Pears, Editor A.F. Posnette. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal Bucks, England. p:1-4.
- Menzel,W., Jelkmann,W.,ve Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. Virol. Methods 99: 81-92.
- Nemeth, M., 1986. *Viruses, mycoplasma and rickettsia diseases offruit trees*. Kluwer academic publishers, Norwell, MA, USA, 841 pp.
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik (KıGın Yaprğını Döken Meyve Türleri). Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Adana. No: 128, Ders kitabı: 11.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyoğlu, M. 2004. Ilıman iklim meyve türleri (Yumuşak çekirdekli meyveler). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Cilt 2. Yayın No: 556. İzmir.
- Özdemir, S. Kaya, A. 2006. Determination of viruses in imported fruit propogation materials. XX.International Symposium on Virus and Virus Like-Diseases of Temperate Fruit Crops and XI. International Symposium on Small Fruit Virüs Diseases. Acta Hort. Volume 781, 143-146.
- Öztürk, Y., Kaymak, S., Atay, E., İşçi, M., Şenyurt, H., Çevik, B. 2011. Bazı virüs hastalıklarının Granny Smith elma çeşidinde verim ve kaliteye etkisi.Bitki Koruma Bülteni 2015,55(4):317-330.

- Petrzik, K. ve Lenz, O., 2002. Remarkable variability of apple mosaic virus capsid protein gene after nucleotide position 141. *Archives of Virology* 147: 1275-1285.
- Polak, Z.ve Zieglerova, J., 1997. Spontaneous occurrence of apple mosaic virus in some forest and ornamental woody species. In: Proc., XIVth Slovak and Czech Plant Protection Conference, Nitra 1997, 87-88.
- Polak, J., Zieglerova, J., Bouma, J. 1997. Diagnosis and distribution of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus in pome fruits in the Czech Republic. *Zahradnictvi. Hort. Sci. (Pague)*, 24: 89-94.
- Poniedzialek, W., Nosal, K., Porebski, S., Banach, P. 2001. Evaluation of 'Jonagold' apple trees on M9 rootstock produced in different nurseries. II. Virus diseases. *Folia Horticultural*, 2: 23-29.
- Posnette, F. A., 1989. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit and Simulating noninfectious Disorders. Cooperative Extension. College of Agriculture and Home Economics. Washington State University. Pullman, Washington. p 330.
- Postman, J. D., ve Mahlenbacher, S. A. 1994. *Apple mosaic virus* in Hazelnut Germplasm. *Acta Horticulturae* 351: 601-605.
- Salem, N., Mansour, A., Al-musa, A. 2005. Viruses of pome fruit trees in Jordan. *Journal of Plant Pathology*. Volume: 87, No: 2: 123-126.
- Sano, T. Sasaki, M.ve Shikata, E. 1985. *Apple mosaic virus* isolated from hop plants in Japan. *Annals of Applied Biology*, 106: 305-312.
- Şevik, M. A. 2009. Fındıkta (*Coryllus Avellana* L.) Yaygın Bir Virüs: *Elma Mozayik Virüsü* (*Apple Mosaic Virus*; Apmv). *Bahçe* 38,2:15-19.
- Sökmen, A. M., 2003. A Preliminary Study on Molecular Differentiation of Apple and Hazelnut Isolates of Apple Mosaic Virus (APMV). *The J. of Turkish Phytopatology*, 32 (3): 115-122.
- Svoboda, J. ve Polák, J. 2010. Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. *Horticulture Science* 37, 22-26.

- Turk, B.A.1996. Detection of *Apple mosaic virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Apple stem grooving virus* in apple trees by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using different plant tissues. *Reports Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana* 67, 151-157.
- Tzanetakis, I.E. ve Martin, R.R. 2005. First Report of strawberry as a natural host of *Apple mosaic virus*. *Plant Disease* 89, 431.
- Ulubaş, Ç., Ertunç, F. (2003). The Use of RT-PCR for specific detection of Apple Mosaic Virus (ApMV) in apple. *J. Turkish Phytopath.* 32 (2): 91-97.
- Uzunoğulları, N. ve İlbağı, H. 2009. Güneydoğu Marmara Bölgesinde Yumuşak Çekirdekli Meyvelerde *Apple mosaic virus* (ApMV)'un Saptanması. *Bahçe* 38, 2: 9-14
- Watpade, S., Raigond, B., Pramenick, K., Sharma, N., Handa, A., Sharma. 2013. Simultaneous detection of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* and *Apple mosaic virus* in crab apples and apple rootstocks by duplex RT-PCR. *Scientia Horticulturae*, 164:88-93
- Yardımcı, N., Eryiğit, H. 2006. Isparta ili elma üretim alanlarında Apple Mosaic Virus (Elma Mozayik Virüsü) (ApMV)'unun Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10-2: 185-187.
- Zeki, C., 1991. Elma Bahçelerinde Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 81s.





## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Mersin Tarsus'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Yenice'de tamamladı. Lise öğrenimini ise Tarsus'ta tamamladı. 2008 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden 2012 yılında ziraat mühendisi olarak mezun oldu. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı'na kaydoldu. 2019 yılında Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansını tamamladı.





# **EKLER**



Ek. 1.

### ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat Tampon Çözeltisi)

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

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf su içerisinde eritilip pH'sı 0.1N olan NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve +4 C'de muhafaza edilmiştir.

#### 2. Coating Buffer Ph 9.6 (Kaplama Tampon Çözeltisi)

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 2.93 g | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |
| 2.94 g | NaHCO <sub>3</sub>              |
| 0.2 g  | NaN <sub>3</sub>                |

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH ayarlaması yapılmış ve + 4C°'de saklanmıştır.

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

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

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

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

**5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat Tampon Çözeltisi)**

Bir litre örnek tamponu çözeltisi içine 2 g ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

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

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilmiş ve 0.2 g  $\text{NaN}_3$  konarak Ph 9.8'e ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmıştır.



## **Ek. 2.**

### **Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar**

**Ekstraksiyon Buffer** (100 Mm Tris-HCl Ph. 8.0, 50 Mm EDTA Ph. 7.0, 500 g NaCl, 100mM 2. Mercapto-ethanol (1/1000))

|          |          |
|----------|----------|
| Tris-HCl | 2.4228 g |
| EDTA     | 3.7224   |
| NaCl     | 5.844 g  |

Yukarıda verilen kimyasallar 150 ml saf su içerisinde sırayla çözülerek Ph ayarlanmış ve son hacmi 200 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol eklenmiştir.

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

Sodium Dodecyl Sülfattan 20 g alınarak 80 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **Potassium asetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) (5M)**

Potassium asetat 49.075 g alınarak 60 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **Sodium asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (3M)**

Sodium asetat 40.824 g alınarak 60 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **% 70 lik Ethanol**

% 100'lük ethanol 70 ml alınarak 30 ml saf su ile karıştırılıp elde edilmiştir.

### Ek. 3.

#### Agaroz Jel Elektrophorezde Kullanılan Tampon Çözeltiler

**1. TBE Buffer (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) (pH:8,3)**

10.777 g Tris-Base, 5.502 g boric asit ve 0.744 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TBE buffer hazırlanmıştır.

**2. TAE Buffer (10 mM Tris, 5 mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA) (pH:8,3)**

1.211 g Tris-Base, 0.680 g sodyum asetat ve 0.186 g EDTA alınarak 900 ml saf su içinde eritildikten sonra çözeltinin pH'sı 8.3 olarak ayarlanarak ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1X TAE buffer hazırlanmıştır.

**3. Etidyum Bromid**

10 mg etidyum bromid 1 ml saf su içerisinde eritilmiş ardından 30 µl alınıp 100 ml saf su içine eklenmiştir.