T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ (*Apple mosaic virus;* ApMV) İZOLATLARININ TANILANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Esra KUNDAKÇI

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **17/06/2013**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ESRA KUNDAKÇI tarafından **Prof. Dr. Savaş KORKMAZ** yönetiminde hazırlanan "**ÇANAKKALE İLİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ (*Apple mosaic virus;* ApMV*)* İZOLATLARININ TANILANMASI ve KARAKTERİZASYONU"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

Danışman

Doç. Dr. Figen TÜRK

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Hakan ENGİN

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 17/06/2013

Doç. Dr. Zeki KARACA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Esra KUNDAKÇI

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a, değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Figen TÜRK'e ve Doç. Dr. Hakan ENGİN'e, Araştırma Görevlisi Hasan Tuna TUZLALI'ya, değerli meslektaşım Jose Alfonso SEGRERA-ROVİRA 'ya maddi ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen Lapseki Ziraat Odası Başkanı Sadık ÖZDEM'e ve değerli çalışma arkadaşlarıma ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra KUNDAKÇI

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
Bp	Base pair (baz çifti)
Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Santigrad derece
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleikasit
CP	Coat Protein (Kılıf protein)
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzım Linked Immunosorbent Assay
H_2O	Su
IgG	Antibadi
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
M	Molarite
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
mA	Miliamper
Nt	Nükleotid
ORF	Açık okuma alanı
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleikasit
SDS	Sodyum dedosil sülfat
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
Taq	Termo stabil polimeraz enzimi

TBE	Tris Borik Asit EDTA
TBS	Tris buffer saline
TBS-T	Tris buffer saline-Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	n,n,n,n tetrametiletilendiamin
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
ark.	Arkadaşları
rpm	Returns per munite
u	Ünite
V	Hacim

ÖZET

ÇANAKKALE İLİNDE ELMA MOZAİK VİRÜSÜ (*Apple mosaic virus;* ApMV) İZOLATLARININ TANILANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Esra KUNDAKÇI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

17/06/2013, 41

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde 2011-2012 üretim yılları içinde bir sörvey çalışması yürütülerek Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*; ApMV)'ne benzer simptom gösteren elma ağaçlarından 44 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler ApMV'nin varlığının belirlenmesi amacıyla DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda 44 örnekten 28'i (% 63) ApMV ile infekteli bulunmuştur. İnfekteli bulunan örnekler içerisinden seçilen 8 izolat, RT-PCR ürünleri kullanılarak Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (Single-stranded Conformation Polymorprhism; SSCP) yöntemi ile analiz edilmiş ve izolatlar arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucu pozitif olduğu bilinen bazı izolatlara yapılan Western blot analizi sonucunda 25 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Elma mozaik virüsü, DAS-ELISA, RT-PCR, SSCP.

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Apple mosaic virus* (ApMV) ISOLATES IN ÇANAKKALE PROVINCE

Esra KUNDAKÇI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Plant Protection Departmant Thesis, Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

17/06/2013, 41

In this study, a survey was conducted in Çanakkale Province and sub provinces on apple trees that show *Apple mosaic virus*-like symptoms between the years 2011-2012. A total of 44 samples were collected from these areas and tested by DAS-ELISA for the presence of ApMV. As a result of the DAS-ELISA analysis 44 out of 28 samples were found infected with ApMV. Eight isolates selected from the infected isolates were analyzed with RT-PCR products by using Single-stranded Conformation Polymorprhism (SSCP) method and the no difference was found among the isolates. As a result of Western blot analysis applied to positive isolates determined by the result of DAS-ELISA and RT-PCR analysis, 25 kDa weight proteins were obtained.

Keywords: Çanakkale, *Apple mosaic virus*, DAS-ELISA, RT-PCR, SSCP.

İÇERİK **Sayfa**

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vii
ABSTRACT viii
BÖLÜM 1 – GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
BÖLÜM 3- MATERYAL ve YÖNTEM 16
3.1. Arazi Çalışması 16
3.2. DAS-ELISA Testi 16
3.2.1. Plate'in antibadi ile kaplanması 17
3.2.2. Bitki örneklerinin plate'e yüklenmesi 17
3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) eklenmesi 17
3.2.4. Substrat eklenmesi 17
3.3. Western Blot Analizi 18
3.3.1. Örneklerin hazırlanması 18
3.3.2. Jel hazırlanması 18
3.3.3. Elektroforez aşaması 19
3.3.4. Blotlama işlemi 19
3.3.5. Bloklama 20
3.3.6. Özgül antikorlar ile kaplama 20
3.3.7. Proteinlerin görüntülenmesi 20
3.4. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı 20
3.5. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 21
3.5.1. Total RNA izolasyonu 21
3.5.2. Kılıf protein genlerinin çoğaltılması 21
3.6. Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) Analizi 22
BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 23
4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları 23
4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları 25
4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (RT-PCR) Bulguları 27
4.4. Western Blot Analizi Bulguları 29

4.5. Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) Analizi Bulguları.....30
BÖLÜM 5 – SONUÇ ve ÖNERİLER 34
KAYNAKLAR 37
Şekiller I
Özgeçmiş.....II

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Domingez ve ark. (1998), İspanya'nın kayısı üretiminin % 65'inin yapıldığı Murcia şehrinde Elma mozaik virüsü (ApMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) hastalıklarının varlığını belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında farklı alanlardan topladıkları 450 örneği adı geçen virüsler için DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. DAS-ELISA bulguları sonucunda örneklerin % 30'unun en az bu virüslerden biri ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak ACLSV infeksiyonlarını % 22.6, ApMV infeksiyonlarını % 15.7, PNRSV infeksiyonlarını % 10 ve PDV infeksiyonlarını ise % 0.4 olarak belirlemişler ve en sık görülen karışık infeksiyonun ACLS+PNRSV olduğunu bildirmişlerdir.

Sipahioğlu ve ark. (2004), Van ve yöresinde yürütmüş oldukları çalışmada yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyvelerde sorun olan viral ve fungal hastalıkları araştırmışlardır. Erik nekrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ringspot virus*; PNRSV), Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus;* ACLSV), Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus* ApMV), Erik cücelik virüsü (*Prune dwarf* virus; PDV) ve Erik şarka virüsleri (*Plum Pox*; PPV)'nin tespiti için sörveyler yapmışlardır. ELISA ile test ettikleri 306 ağaçtan 154'ünü kayısı, 45'ini kiraz, 23'ünü şeftali, 41'ini erik ve 32'sini vişne oluşturmuştur. Test ettikleri örneklerde PDV ve ACLSV infeksiyonları tespit etmişlerdir. ELISA testleri ile ortaya konan virüslerden biri olan PDV'nin neden olduğu infeksiyon oranını kayısıda % 0.6, kirazda % 7.1 ve vişnede ise % 31.2 olarak belirlemişlerdir. ACLSV infeksiyonuna sadece şeftalilerde % 39.1 oranında rastlamışlardır. Kayısı, erik, vişne, kiraz ve şeftali örneklerinin hiçbirinde PNRSV, PPV ve ApMV infeksiyonlarına rastlamamışlardır. Virüslerden kaynaklanan ortalama infeksiyon oranını ise % 7.8 olarak belirlenmişlerdir. Fungal etmenler açısından ise kayısı ağaçlarında % 78 oranında *Monilia laxa,* % 34 oranında *Coryneum beijerinckii,* % 25 oranında *Fusarium* spp. ve *Alternaria* sp. ve % 20 oranında *Chondrostereum purpureum* izole ederlerken, erik ağaçlarında ise % 44 oranında *Monilia laxa*, % 15 oranında ise *Taphrina pruni* izole etmişlerdir.

Sökmen ve ark. (2005), ülkemizde fındık bahçelerinde Elma mozaik virüsü'nün konukçusu olduğu yabancı otların belirlenmesi üzerine bir araştırma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında 2003-2004 yıllarında Samsun'un Merkez, Terme, Çarşamba ve Ondokuz Mayıs ilçeleri ile Ordu'nun Ünye ve Fatsa ilçelerinde 12 bahçede sörvey

yapmışlardır. Fındık bahçelerinde 16 familyadan (*Apiaceae, Araceae, Araliaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Convolvulaceae, Dryopteridaceae, Eupborbiaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Scropbulariaceae, Urticaceae*) 31 bitki türüne ait ApMV simptomu gösteren 70 yabancı ot örneği toplamışlar ve topladıkları örneklere DAS-ELISA ve biyolojik indeksleme yapmışlardır. DAS-ELISA bulguları sonucunda *Scandix sp.;* 1, *Artemisia vulgaris* L; 1, *Campanula* sp.; 1 *Galeopsis* sp.; 1 *Salvia verbenaca* L.; 1 *Prunella* sp.; 2 *Clematis vitalba* L; 1 *Rubus canescens.;* 5 adet olmak üzere toplam 13 örneği pozitif bulmuşlar ve bu bulgularını biyolojik indeksleme çalışmaları ile desteklemişlerdir.

Sanchez-Navarro ve ark. (2005), multiplex RT-PCR yöntemini kullanarak eş zamanlı olarak 8 sert çekirdekli virüsünün (ApMV, *Prunus necrotic ringspot virus*; PNRSV, *Prune dwarf virus*; PDV, *American plum line pattern virus*; APLPV, *Plum pox virus*; PPV, *Apple chlorotic leaf spot virus*; ACLSV, *Apricot latent virus;* ApLV ve *Plum bark necrosis stem pitting associated virus*; PBNSPaV) hastalıklarının teşhisi ve tanılaması üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaptıkları multiplex RT-PCR çalışmaları sonucunda ApMV'ye ait (RNA 3) 417 bp olmak üzere, ApLV (RNA 3) 717 bp, ACLSV 632 bp, APLPV (RNA 3) 563 bp, PDV (RNA 3) ait 517 bp, PNRSV (RNA 4) 346 bp, PPV 313 bp, PBNSPaV 270 bp boyutlarında bantlar elde etmişlerdir.

Birişik ve ark. (2005), Akdeniz Bölgesi elma yetiştiriciliğinin virüs hastalıkları açısından durumunun ortaya konması üzerine 2002-2005 yılları arasında bir proje yürütmüşlerdir. Adana, Antalya, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinde yapılan sörvey çalışmaları sonucunda ticari ve ev bahçelerinden, koleksiyon parsellerinden ve fidanlıklardan örnekler almışlardır. Çalışma boyunca 118 bahçeden 423 yaprak ve dormant sürgün örnekleri almışlar ve bu örnekleri Elma mozaik virüsü (ApMV), Elma kloritik yaprak lekesi virüsü (ACLSV) ve Elma gövde çukurlaşma virüsü (ASGV) açısından DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Ayrıca alınan örneklerden ELISA testleri sonucunda negatif, pozitif ve karışık infeksiyon veren 10 örnek için mekanik inokulasyon yapılmışlar ve topladıkları örneklerden 38 tanesini ACLSV (R 12740 7A), ASGV (Virginia Crab), ASPV (Malus Radiant) için odunsu indikatör bitkiler üzerine biyolojik indekslemeye tabi tutmuşlardır. DAS-ELISA verilerine göre Akdeniz Bölgesi elmalarında genel bulaşıklık oranını % 18.88 olarak tespit etmişlerdir. Bulaşma oranlarını en yüksek % 10.65 ile ACLSV, % 5.08 ASGV ve % 3.147 ile de ApMV olarak belirlemişlerdir. Biyolojik indeksleme çalışmaları neticesinde ise sırasıyla Elma gözenekleşme virüsü (ASPV) için % 55.26, ACLSV için % 34.21 ve ASGV için % 28.94 bulaşıklık oranlarını belirlemişlerdir.

Biyolojik indeksleme çalışmalarına göre Akdeniz Bölgesi elmalarının ortalama bulaşıklık oranı % 43.68 olarak tespit etmişler ve yaptıkları çalışma sonucunda Akdeniz bölgesi elma alanlarında yüksek oranda virüs enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişleridir.

Koblyko ve ark. (2005), Polonya'da 2001, 2003 ve 2004 yıllarında fidanlıklarda, koleksiyon parsellerinde, ev bahçelerinde ve doğal habitat içersinde bulunan farklı fındık çeşitlerinde Elma mozaik virüsü'nün neden olduğu zararları belirlemek amacıyla bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. 532 bitkiyi DAS-ELISA ile test etmişlerdir. DAS-ELISA bulguları sonucunda koleksiyon parselleri ve fidanlıkları kapsayan 27 çeşidin içerisinde yalnızca 'Negret' çeşidinde infekteli örneklere rastladıklarını bildirmişlerdir.

Çağlayan ve ark. (2006), ülkemizde elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde elmalarda önemli dört virüs hastalığının yaygınlık durumlarını değerlendirmek amacıyla 2004 yılının ilkbahar döneminde bitki örnekleri toplamışlardır. Topladıkları bu örnekleri ApMV, ASGV ve ACLSV'ye karşı hem ELISA hem de RT-PCR yöntemleriyle test etmişlerdir. ASPV'ye karşı ise henüz ticari olarak üretilmiş antiserum bulamadıkları için sadece RT-PCR yöntemi kullanılmışlar ve sonuçları kıyaslamışlardır. Elde ettikleri toplam 174 örneği bakanlık ve üniversitelere ait olan çiftlik koleksiyon bahçelerinden ve ticari bahçelerden toplamışlar ve bu bitkilerden 126 tanesinin en az bir virüs ile infekteli olarak saptamışlardır. Hastalığın yaygınlık oranını ticari bahçelerde % 70.21 olarak saptarlarken çoğunluğu çiftlik bahçelerinden alınan gözlerle üretilen fidanlarla kurulmuş olan ticari bahçelerde ise infeksiyon oranı daha yüksek (% 75) olarak belirlemişlerdir. RT-PCR çalışmalarında ACLSV'ye ait 258 bp, ASGV 523 bp, ASPV 243 bp ve ApMV 262 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Viral etmenlerin tanılanmasında ELISA ve RT-PCR tekniklerinin kıyaslanması sonucu elde ettikleri bulgularda, RT-PCR yöntemi ile % 8.6 oranında daha fazla sayıda bitkinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Yetiştiricilik yapılan bahçelerde karışık infeksiyonu oldukça yaygın bulmuşlar ve karışık infeksiyonlar içinde en yaygın olanları sırasıyla ASPV + ACLSV (% 84.21), ASPV + ASGV (% 36.84), ACLSV +ASGV (% 26.32) ve ASPV + ApMV (% 5.26) olarak belirlemişlerdir. ASPV + ASGV + ACLSV üçlü infeksiyon oranını ise % 26.32 olarak saptamışlardır. Çalışma kapsamında elma virüs hastalıklarının Türkiye'nin farklı bölgelerinde özellikle de simptom göstermeyen ağaçlarda çok yaygın olduğunu ve RT-PCR yönteminin yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının sertifikasyon çalışmalarında başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Buzkan ve ark. (2006), tarafından Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ) Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Merkezi (SEKAMER) kayısı parselinde 2003-2004

yıllarında yürüttükleri virüs hastalıklarının teşhisi ve kontrolü amaçlı araştırmada ağaçlar üzerinde vejetatif gelişme (Mayıs) dönemlerinden başlayarak meyve oluşum ve olgunlaşma (Haziran-Temmuz) dönemlerinde simptomatolojik gözlemler yapmışlardır. Toplam 183 ağaçtan yaprak örnekleri alarak bu bitkileri Erik cücelik virüsü (*Prune dwarf virus*, PDV), Erik nektrotik halkalı leke virüsü (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), Erik beneklenme virüsü (*Plum pox virus*, PPV), Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV) ve Elma klorotik halka leke virüsü (*Apple chlorotic leafspot* virus, ACLSV)'ne karşı DAS-ELISA testi ile test etmişlerdir. Buna göre sırasıyla en fazla PNRSV (% 13.41), PPV (% 2.73) ve PDV ile ApMV (% 1.63) infeksiyonları tespit ederlerken, ACLSV infeksiyonları saptamamışlardır. Sadece bir ağaç üzerinde PNRSV ve PPV'nin karışık infeksiyonu tespit ettiklerini bildirmişleridir.

Yardımcı ve Eryiğit (2006), yürüttükleri çalışmada Isparta'daki elma alanlarında Elma mozaik virüsü'nün varlığını araştırmışlardır. Çalışma kapsamında 2003-2004 yılları arasında bahçelere sörveyler yapmışlar ve Golden Delicious, Starking Delicious, Granny Smith ve Imparator çeşitleri ile M9 anaçlarından mozaik belirtisi gösteren toplam 276 yaprak örneği toplamışlardır. DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin 82'sinde ApMV'nin varlığını saptamışlardır. Granny Smith, Imparator ve M9 anaçlarından alınan örneklerde ApMV'yi belirlerken, Golden Delicious ve Starking Delicious örneklerinde etmen virüsü saptayamamışlardır. Testler sonunda pozitif reaksiyon veren yaprak örnekleri ile otsu bitkilere mekanik inokulasyon yapmışlar ve mekanik inokulasyon sonucunda *Chenopodium amaranticolor'*da nekrotik benekler, *Cucumis sativus'*ta ise oldukça belirgin klorotik lokal lezyonlar saptamışlardır. Yürütmüş oldukları çalışma Isparta yöresindeki elma üretim alanlarında ApMV'nin belirlenmesine yönelik ilk çalışma olmuştur.

Uludağ (2007), Batı Akdeniz Bölgesi'nde 2005-2006 yıllarında yürüttüğü çalışmada Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Merkezi'nin damızlık blokları ile Korkuteli ilçesindeki bazı ticari elma bahçelerini Elma mozaik virüsü (*Apple Mosaic Virus*;ApMV), Elma gövde yivlenme virüsü (*Apple stem grooving virus*, ASGV), Elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*; ACLSV) ve Elma gövde çukurlaşma virüsleri (*Apple Stem Pitting Virus*; ASPV)'ne karşı ELISA ve RT-PCR yöntemiyle test etmiştir. ASPV'ye karşı ticari antiserumun son yıllarda üretilmiş olması nedeniyle bu virüsü sadece RT-PCR ile saptanamamıştır. Arazi çalışmalarında sadece ApMV'nin tipik belirtileri olan yapraklarda mozaikleşme ve klorotik alanlar gözlerken, diğer virüslere ait hiçbir belirti saptayamamıştır. Toplanan 72 örneğin tamamını RT-PCR ile test edilmiş ve 29 örnek hem ELISA hem de RT-PCR ile test edilerek sonuçları kıyaslamıştır. ELISA testi ile bu

örneklerin % 13.79'unun ApMV, % 31.03'nün ASGV ve % 44.82'sinin ACLSV ile infekteli olduğunu belirlemiştir. RT-PCR ile test ettiği örneklerin % 40.28'inin ASGV, % 56.94'ünün ApMV, % 58.33'nün ACLSV ve % 69.44'ünün ASPV ile infekteli olduğunu belirlemiştir. ApMV, ACLSV ve ASGV açısından kıyaslanan 29 örneğin ELISA ile 16 tanesi en az bir virüs ile infekteli bulunurken RT-PCR ile 28 bitkiyi infekteli olarak saptamıştır. Test ettiği örneklerde en yaygın karışık infeksiyon ACLSV+ASPV (% 44.44) olarak saptanırken ApMV+ACLSV (% 38.89), ApMV+ASPV (% 37.5), ASGV+ASPV (%33.33), ACLSV+ASGV (% 26.39) ve ApMV+ASGV (% 20.38) olarak belirlemiştir. ApMV+ACLSV+ASGV+ASPV dörtlü infeksiyon oranını ise % 18.06 olarak belirlerken RT-PCR sonuçlarında ise ApMV'de 262 bp, ACLSV'de 677 bp, ASGV'de 273 bp ve ASPV'de ise 370 bp büyüklüğünde bantlar elde etmiştir.

Usta ve ark (2007), *Apricot latent virus* (ApLV) ve *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV) etmenlerini tespit edebilmek amacı ile Doğu Anadolu Bölgesi'nde bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. ApLV'ünü tespit etmek için RT-PCR, PBNSPaV'ünü tespit etmek için ise Nested-RT-PCR teknikleri kullanılmışlardır. Test edilen 224 kayısı örneğinden üçünün simptom göstermeksizin ApMV ile infekteli olduğu tespit etmişlerdir. PBNSPaV için testlenen toplam 45 kiraz ve erik örneğinden ise 35'inin pozitif olduğunu saptamışlardır. PBNSPaV ile infekteli kiraz bitkilerinin gövdesindeki odun dokularında hastalığın tipik belirtisi olan iğnelenmeler ve oluklanmalar olarak gözlemlemişlerdir. Doğu Anadolu Bölgesi'nde ApLV'den kaynaklanan infeksiyon oranını %1.3, PBNSPaV'ten kaynaklanan infeksiyon oranını ise % 77 olarak tespit etmişler ve bu çalışma ile ApLV ve PBNSPaV virüsleri Doğu Anadolu Bölgesi'nde ilk defa rapor edildiğini bildirmişleridir.

Gümüş ve ark., (2007), Batı Anadolu'daki *Prunus* türlerinde yedi önemli virüs hastalığı ile iki önemli viroid hastalığının belirlenmesi amacı ile 2004 ile 2006 yılları arasında bir sörvey çalışması yürütmüşlerdir. 1732 örneği serolojik (ELISA) ve moleküler (PCR ve moleküler hibridizasyon) yöntemler ile test ettiklerie çalışmada *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apricot latent virus* (ApLV), *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV), *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) ve *Hop stunt viroid* (HSVd) hastalıklarını tespit etmişlerdir. 1225 örneğe yaptıkları ELISA sonuçlarına göre 365 örnekte yukarıda adı geçen hastalıklardan en az birisinin bulunduğu belirlemiş ve ApMV infeksiyonun % 0.8 olduğunu tespit etmişlerdir. Aşı ile taşınabilen bu hastalık etmenlerinden kaynaklanan bölgedeki toplam

hastalık oranını ise % 30 olarak saptamışlardır. Çalışma sonuçlarında bölgede bir sertifikasyon programının mutlak suretle gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yardımcı ve Çulal (2009), yaptıkları çalışmada Göller Bölgesi'nde 2006-2007 üretim sezonu içersinde yağ güllerinde *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV) hastalıklarının varlığını belirlemek üzere bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaptıkları sörveylerde 10 ayrı plantasyondan olmak üzere toplam 218 örnek toplamışlardır. Tüm örnekleri DAS-ELISA ile test etmişler ve infeksiyon oranlarını ArMV'de % 51.8, PNRSV'de % 35.7 ve ApMV'de % 17.8 olarak belirlemişler ve aynı zamanda da ArMV+PNRSV, ArMV+ApMV, PNRSV+ApMV ve ArMV+PNRSV+ApMV karışık infeksiyonlarının mevcut olduğunu bildirmişleridir. Mekanik inokulasyon çalışmaları kapsamında ArMV'yi inokule ettikleri hıyarlarda sistemik damar bantlaşmaları, fasulyelerde klorotik lokal lezyonlar ve börülcelerde ise mozaik belirtileri gözlemlemişlerdir. PNRSV'yi inokule ettiklerinde ise hıyarlarda mozaik belirtileri ile bodurlaşma ve damar bantlaşması, börülcede ise nekrotik lokal lezyonları gözlemlemişlerdir. ApMV'yi inokule ettiklerinde ise *Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quinoa*'da nekrotik lokal lezyonlar, hıyarlarda ise klorotik lokal lezyonlar, beneklenme ve mozaik belirtilerinin var olduğunu saptamışlardır. Bu çalışma ile aynı zamanda ülkemizde yağ güllerinde ApMV infeksiyonlarının varlığını ilk kez belirlemişler ve buna ek olarak sörvey yapılan plantasyonlarda *Rose spring dwarf virus* (RSDaV) ve *Rose rossette virus* (RRV) simptomlarını gözlemlemişlerdir.

Akbaş ve Değirmenci (2009), yürüttükleri çalışmada fındık bahçelerinde Elma mozaik virüsünün varlığını görsel, serolojik ve biyolojik indeksleme ile belirlemeyi amaçlamışlardır. 2005-2008 yılları arasında Batı Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Kocaeli, Sakarya, Düzce, Zonguldak ve Bartın illerinde 213 bahçede yürüttükleri sörveyler sonucu yaşları 2 ila 10 arasında olan ağaçlardan 1465 örnek toplamışlar ve bu izolatları test etmişlerdir. 84 bahçede ApMV'ye özgü olan simptomları gözlemlemişler ve örneklerin % 20'sini mekanik olarak *Chenopodium quinea* ve *Cucumis satimus* bitkilerine inokule etmişlerdir. DAS-ELISA bulguları sonucu 1465 örnekten 197'sini (% 13.6) ApMV ile infekteli olarak belirlemişlerdir. Viral etmenin etkisini belirlemek için 3 farklı ilde yaptıkları çalışmada ise ürün kayıplarının % 19.7 ile % 35.6 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Ertunç ve ark (2011), yaptıkları çalışma kapsamında ülkemiz fındık ve elma ekim alanlarında, Elma mozaik virüsüne ait izolatları toplamış ve patojenin varlığını, DAS-ELISA ve RT-PCR çalışmaları ile ortaya koymuşlardır. 2008 ve 2009 yıllarında

Ukrayna'nın Kiev kentinden topladıkları 18 elma, 3 gül, 2 *Berberis thunbergii*, 3 gürgen, 1 fındık izolatından örnekleme yapmışlar ve bu örneklerde sistemik mozaik şeklinde belirtiler gözlemlemişlerdir. Bu izolatlar içerisinde 18 elma örneğinin 6'sı, 2 *Berberis thunbergii* örneği ve 3 gül örneğinin 1'inin DAS-ELISA testi sonucunda ApMV antiserimuna karşı pozitif reaksiyon gösterdiğini, 3 gürgen ve 1 fındık örneğinin ise hiçbir reaksiyon göstermediğini bildirmişlerdir. Topladıkları izolatları, ellerinde bulunan ve ELISA sonuçları pozitif olan 14 elma ve 44 fındık izolatı ile karşılaştırılmışlardır. İnfekteli örneklerden total RNA izolasyonunu, silika yöntemi kullanılarak yapmışlar ve RT-PCR analizi sonucunda 262 bp uzunluğunda PCR ürünü elde etmişlerdir. Tüm PCR ürünlerini, *Hinf I, BamH I, Ava I, EcoR I, Ssp I, Rsa I, Hind III, Hinc II* enzimleri ile enzimatik kesime maruz bırakmışlar ve bunlardan sadece *Ava I, BamH I, Hinf I, SspI* enzimleri ile kesim sağlayabilmişlerdir. Yapılan analiz sonucunda Türk izolatlarının 9 genotipe ayrıldığını tespit etmişlerdir. Yine bu analizler sonucunda Türk izolatlarının değişken olduklarını, buna karşılık Ukrayna elma izolatlarının ise oldukça benzer olduklarını belirlemişleridir. Her iki ülkeye ait elma izolatlarının baz dizilerini karşılaştırdıklarında ise oldukça benzerlik gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Değirmenci ve Akbaş (2011a), yürüttükleri çalışmada Amasya ve Tokat illerinde 2008–2010 yılları arasında erik plantasyonlarında *European plum line pattern* hastalığının etmeni olan Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV)'nün tespiti ve yaygınlığını araştırmışlardır. Bu amaç doğrultusunda erik bahçeleri ve diğer meyve plantasyonlarında sörveyler yapıp, erik ağaçlarını makroskobik olarak incelenmişlerdir. Üç yıl süreyle yaptıkları sörveylerde 549 erik örneği toplanmışlardır. Toplanan örnekleri laboratuar çalışmalarında DAS-ELISA ve RT-PCR test metotları ile Elma mozaik virüsü'ne karşı test etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda sadece süt eriği olarak nitelendirilen *Prunus ceresifera* türüne ait örneklerde bu hastalığa neden olan virüsü saptamışlardır. Amasya ve Tokat illerinde süt eriği ağaçlarında hastalığın yaygınlık oranını sırasıyla % 46.1 ve % 16.6 olduğunu belirlemişlerdir. ELISA test sonuçlarına paralel olarak yürüttükleri RT-PCR testlerinde de 262 bp boyutunda bantlar elde ederek *European plum line pattern* hastalığına neden olan ApMV'nin varlığını moleküler yollarla doğrulamışlardır.

Bulut ve ark (2011), yapmış oldukları çalışmada, PCR çalışmalarının geçerliliği ve standardizasyonu için, üç ticari PCR cihazının PCR sonuçlarına olan hassas etkisini ölçülmüşlerdir. PCR sonuçlarını değerlendirebilmek için bütün cihazlarda Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu testlerini (RT-PCR) eş zamanlı olarak yürütmüşlerdir. Gerçekleştirilen teşhis çalışmalarında, *Apple mosaic virus* (ApMV),

Zuchini yellow mosaic virus (ZYMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), ve *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) hastalıklarını referans izolatlar olarak kullanılmışlardır. PCR cihazlarını çoğunlukla üreticilerin belirttiği aralıklarda çalıştırmışlar ve elde ettikleri ürünlerde hafif farklılıklar olmuşsa da, test edilen bütün cihazların beklenen büyüklükte ve doğrulukta PCR ürününü çoğalttıklarını bildirmişlerdir. Her bir patojen için iki pozitif numune kullandıkları testlerde, tekrarlanabilirliğin her üç cihaz için gösterildiğini bildirmişlerdir. Testte kullanılan cihazların marka ve modeline bakılmaksızın, RT-PCR yöntemi ile elde edilen tüm PCR sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, benzer sonuçlar elde etmede kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu sonucuna varmışlardır.

Fajardo ve ark. (2011), yılında meyve ağaçlarında bazı Ilarvirüs ve Ampelovirüs'lere ait kılıf protein genlerinin tanısı ve moleküler karakterizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında şeftali, elma ve asma yapraklarından elde ettikleri ekstraklarla total RNA izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. ApMV, PDV, *Grapevine leafroll-associated virus* 1 (GLRaV-1) virüslerinin tanısı ve moleküler karakterizasyonu üzerine yapmış oldukları çalışma kapsamında spesifik primerler kullanarak RT-PCR analizleri yapmışlar ve amplifiye ettikleri cDNA ürünlerini kullanarak klonlama ve sekans analizlerini tamamlamışlardır. Klonlama ve sekans analizleri sonucunda Brezilya izolatlarının diğer ülke izolatlarına göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Virüslerin kılıf protein genlerinin ağırlıklarının belirlenmesi için yaptıkları Western blot çalışmalarında ise yaklaşık olarak ApMV'ye ait 26 kDa, PDV'ye ait 24 kDa ve GLRaV-1'e ait 39 kDa büyüklüğünde kılıf protein geni ağırlıkları belirlemişlerdir.

Akbaş ve Değirmenci (2011b), ApMV'nin elma, erik ve findik izolatlarının kılıf protein gen bölgelerinin sekans analizlerinin belirlenmesi üzerine yürüttükleri çalışmada ApMV ile infekteli olduğunu DAS-ELISA ile belirledikleri 9 adet elma, 13 adet erik ve 16 adet fındık izolatı kullanılmışlardır. Elma örneklerini Isparta, erik örneklerini Amasya ve Tokat, fındık örneklerini ise Bartın ve Düzce illerinden temin etmişlerdir. Silica jel ekstraksiyon metodu kullanarak virüsün total RNA'ları elde etmişlerdir. ApMV'nin CP gen bölgesine spesifik primerleri kullanarak RT-PCR amplifikasyonu gerçekleştirmişler ve elde ettikleri RT-PCR ürünleri agoroz jel elektroforezde 262 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. Forward primer kullanarak 5 izolata ait RT-PCR ürünlerinin cDNA sekanslarını çıkartmışlardır. Elde ettikleri cDNA sekanslarını NCBI'daki diğer ApMV sekansları ile karşılaştırmışlar ve izolatlar arasında % 88-99 oranlarında benzerlik tespit etmişlerdir.

Dolunay ve Sertkaya (2011), Hatay ilinde böğürtlen üretim alanlarında önemli virüslerin varlığını araştırmak amacı ile sörvey çalışmaları yapmışlardır. Virüslere özgü simptom oluşturan ve simptomsuz bitkilerden ilkbahar, yaz, sonbahar (2009) ve kış (2010) dönemlerinde yaprak ve sürgün örnekleri almışlar ve topladıkları örneklerde Elma mozaik virüsü (ApMV), Hıyar mozaik virüsü (CMV), Tütün halkalı leke virüsü (TRSV), Domates halkalı leke virüsü (ToRSV), Ahududu çalımsı bodurlaşma virüsü (RBDV) ve Ahududu halkalı leke virüslerini (RpRSV) biyolojik (mekanik inokulasyon) ve serolojik (DAS-ELISA) yöntemlerle araştırmışlardır. Sonbahar örneklerinde ELISA ile yaptıkları incelemelerde 3 bitkide (Navaho çeşidi) ToRSV infeksiyonunu belirlemekle birlikte, ilkbahar, yaz ve kış aylarında topladıkları simptomlu bitki örneklerinde tekli veya karışık virüs infeksiyonu belirlemişlerdir. Yapraklarda şekil bozukluğu, nekroz oluşumları, damarlarda sararma, meyvelerde küçülme ve/veya şekil bozukluğu gibi simptom gösteren bitkilerin *Rubus* türlerinde görülebilen diğer virüsler tarafından infekteli olabileceğini ve bazı böğürtlen alanlarındaki bitkilerin yeni fidanlar üretmek için kaynak olarak kullanılması ve bu bitkilerde değişik virüs benzeri belirtiler gözlenmesi nedeni ile böğürtlenlerde görülebilen diğer virüslerin incelenmesi yönünde çalışmalarını devam ettirdiklerini bildirmişlerdir.

Koç ve ark. (2011), Pozantı ilçesindeki kiraz ve vişnelerde bazı sert çekirdekli meyve virüslerini belirlemek için 2009-2010 yılları arasında Adana ilinin Pozantı ilçesinde yetiştirilen kiraz ve vişne bahçelerinde arazi gözlemleri gerçekleştirilmişlerdir. Saçma deliği, nekrotik ve klorotik halka belirtilerini örnekleme yapılan birkaç bahçede saptamışlardır. Bu belirtilere paralel DAS-ELISA testleri sonucu *Prune dwarf ilarvirus*, (PDV), *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV) hastalıklarına karşı pozitif; *Plum pox potyvirus* (PPV) *Apple mosaic ilarvirus*, (ApMV) ve *Apple chlorotic leafspot trichovirus*, (ACLSV), *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Tobacco black ring nepovirus* (TBRV) hastalıklarına karşı ise negatif yanıtlar almışlardır. Hastalıkların yaygınlık oranlarını örneklenen materyal içinde sırasıyla % 6.9 (PDV); % 2.3 (PNRSV) şeklinde ölçülmüşlerdir. Ek olarak örneklenen kiraz bahçesi içinde şüpheli bulunmuş bir adet kayısı örneğini test etmişler ve PPV infekteli olarak saptanmasına rağmen kiraz ağaçlarının hiç birinde PPV infeksiyonlarını saptamamışlardır.

Korkmaz ve ark. (2011), Elma mozaik virüsü (ApMV)'ne karşı RNA probu geliştirerek virüsün Van ve Malatya illerinde elmalardaki yaygınlığının moleküler hibridizasyon yöntemi ile araştırılması isimli çalışmalarında Radyoaktif olmayan dot blot moleküler hibridizasyon tekniğini ApMV'nin teşhisi için optimize ederek Van ilindeki

elma bahçelerinde ApMV infeksiyonlarını araştırmışlardır. Ön hibridizasyon testlerinde test edilen üç farklı ekstraksiyon yönteminden ApMV'yi tespit etmede en iyi sonucu veren yöntemin silika jel ekstraksiyonu adı verilen yöntem olduğunu bildirmişlerdir. 2010 yılı Haziran ve Temmuz aylarında Van ilindeki ticari elma bahçelerinden 447 elma örneği toplanmışlar ve moleküler hibridizasyon yöntemi ile test edilen numunelerin hiçbirinde ApMV infeksiyonuna rastlanmamışlardır. Hibridizasyon testlerinde kullanılan RNA ekstraksiyonlarının %10'unu spesifik primerlerin kullanıldığı RT-PCR yöntemi ile de test etmişlerdir. RT-PCR yöntemi ile test ettikleri örneklerin hiçbirinde ApMV infeksiyonuna rastlanmamalarını Van ilinde sörvey yürütülen elma bahçelerinin bu virüsten ari olduğu şeklinde açıklamışlardır. Malatya ilinde ise ApMV ile şüpheli bir bahçeden temin edilen 14 elma numunesini RT-PCR yöntemi ile test etmişler ve örneklerden altısının ApMV ile infekteli olduğunu tespit etmişlerdir. Malatya elma numunelerinde tespit ettikleri iki ApMV izolatının (ApMV-2 ve ApMV-6) genomik RNA'ları üzerinde yer alan kılıf protein (CP) genlerinin tamamını klonlanmışlar ve nükleotid dizileri ile amino asit dizilerini saptamışlardır. Yaptıkları analizler sonucunda her iki ApMV izolatının 672 nükleotidden oluştuğunu ve bu izolatların yaklaşık 25.2 kDa büyüklüğündeki kılıf proteinini kodladığını tespit etmişlerdir. Her iki izolatın kılıf proteinlerinin 224 amino asit rezüdüsünden oluştuğunu ve nükleotid dizileri arasında da yüksek düzeyde (% 99) bir benzerliğin var olduğunu tespit etmişlerdir. ApMV-2 ve ApMV-6 izolatlarını karşılaştırıldıklarında ise diğer 18 dünya izolatları ile % 88-98 arasında değişen bir varyasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gazel ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nde kurulu olan elma adaptasyon parselindeki ağaçlarda *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) ve *Apple stem pitting virus* (ASPV) hastalıklarının infeksiyon durumunu Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Tesadüfi hekzamer primer kullanılarak RNA'lardan komplementer DNA elde etmişler ve bu ürünlere virüslere spesifik özel primer çiftleri ile RT-PCR testi uygulamışlardır. Mozaik simptomları gösteren elma ağaçlarının yanı sıra herhangi bir simptom göstermeyen ağaçlardan da örnekler toplamışlardır. Topladıkları örneklerin yaprakları ile gerçekleştirdikleri RT-PCR testleri sonucu örneklerin % 22.2'sinin ASGV ve ACLSV ile % 88.8'inin ASPV ve % 5.5'inin ApMV ile infekteli olduğunu saptamışlardır. Simptom göstermeyen ağaçların % 88.8'inin elma virüsleri ile infekteli olduğunu saptamaları,

özellikle gen kaynağı olarak kullanılacak bitki materyallerinin bu virüsler açısından test edilme zorunluluğunu ortaya çıkardığını bildirmişlerdir.

Öztekin ve Buzkan (2012), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'nde badem bahçesinde sert çekirdekli meyve türleri virüslerinin yaygınlığı ve şiddetini araştırmışlardır. Topladıkları 222 örneği, DAS-ELISA ile Erik nekrotik halkalı leke virüsü (PNRSV), Erik cücelik virüsü (PDV), Erik beneklenme virüsü (PPV), Elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV) ve Elma mozaik virüsü (ApMV) için test etmişlerdir. Test edilen örneklerin % 23.4'ünün en az bir virüsle infekteli olduğunu ve bu oranı takiben PNRSV'nin % 20.2, ACLSV'nin ise % 3.2 oranında olduğunu bildirmişler ve aynı zamanda beklentilerinin aksine diğer virüslerin tek veya karışık infeksiyonlarına rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışması

Arazi çalışması elma üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2011 ve 2012 üretim sezonlarında yürütülmüştür (Şekil 3.1). Üretim sezonu boyunca arazi çıkışları yapılmış, bitkiler görsel olarak incelenmiş ve ApMV simptomlarına benzer simptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Elma üretimi yapılan bahçelerin seçimi tamamen tesadüfî olarak yapılmış ve her bir üretim bölgesinden örnekleme yapılmasına özen gösterilmiştir. Toplanan örnekler soğuk zincirde muhafaza edilerek laboratuara getirilmiştir.



Şekil 3.1. Elma mozaik virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri.

3.2. DAS-ELISA Testi

Elma mozaik virüsü'nün serolojik bir yöntem olan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi ile tanılanmasında Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan ELISA komple kiti ve 96 çukur içeren Microtiter plate'ler kullanılmıştır. Toplanan örnekler serolojik yöntem olan DAS-ELISA ile test edilmiştir. ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clark ve Adams (1977)'ın belirttiği yöntem temel alınarak yapılmıştır.

3.2.1. Plate'in antibadi ile kaplanması

ELISA testinde ilk adımda plate virüse spesifik antibadi ile kaplanmıştır. Her bir çukura, önceden hazırlanmış kaplama solüsyonu (50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH: 9.6, % 0.02 NaN_3) alınarak içine 1:1000 oranında sulandırılan virüse özgü antibadi eklenmiştir. Bu karışımdan 200 µl alınarak plate'e ekleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra plate 34^oC'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra artık maddelerin temizlenmesi için plate 4'er dakika arayla 3 kez yıkama (10 mM fosfat buffer pH: 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, % 0.05 Tween 20) işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Bitki örneklerinin plate'e yüklenmesi

Gerçekleştirilen sörveyler sonucunda toplanan örnekler havan ve havaneli yardımı ile ekstraksiyon solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, % 2 PVP, % 0.05 mM Tween 20 ve % 0.02 NaN_3) kullanılarak ezilmiştir. Ezilen örnekler tüplere alınmış ve plate'lere yükleme işlemi tamamlanmıştır. Her bir örnek için kontrol amaçlı iki çukur kullanılmış ve çukurlara örneklerden 200'er µl ilave edilmiştir. Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e pozitif ve negatif kontrol konulmuş ve buzdolabında +4 ^oC'de bir gece süreyle bekletilmiştir.

3.2.3. Konjugat eklenmesi

Bir gece boyunca +4°C'de bekletilen örneklerle kaplı plate çıkarılarak 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Konjugat solüsyonu (20 mM Tris buffer pH: 7.4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, % 2 PVP, % 0.05 Tween 20, % 0.2 BSA ve % 0.02 NaN_3) 1:10 oranında sulandırılıp 1:1000 oranında konjugat IgG eklenerek plate'lere yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu plate 34°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4. Substrat eklenmesi

İnkübasyon işleminin tamamlanmasının ardından plate 4'er dakika ara ile 3 kez yıkanmıştır. Substrat solüsyonu (1 M diethanolamine pH: 9.8, % 0.02 NaN_3,) 1:5 oranında sulandırılıp içerisine bir plate için bir adet olmak üzere pNPP tablet (p-nitro-phenyl-phosphate) (Bioreba, İsviçre) eklenmiştir. Hazırlanan substrat çözeltisi plate'e yüklenmiş ve oda sıcaklığında 30-60 dak bekletilmiştir. Daha sonra plate MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma işlemine tabi tutulmuştur. Negatif kontrolün 2 katı ve üzerinde olan örnekler infekteli olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Western Blot Analizi

Farklı aşamalardan oluşan Western blot yönteminde öncelikle örneklerin ezilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Ezilen bu örnekler eppendorf tüpler içine konulmuş ve buz kabı içerisinde bekletilmiş ve ardından elektroforez işlemi için jel hazırlanmıştır. Elektroforez aşamasından sonra ise sırasıyla blotlama ve bloklama işlemleri yapılmıştır. Son aşamada ise özgül antikorla kaplama işlemi yapılmış ve ardından nitroselüloz membrana aktarılan proteinlerin görüntülenmesi ile yöntem sonuçlandırılmıştır.

3.3.1. Örneklerin hazırlanması

Western Blot analizi çalışmalarında materyal olarak kullanılan ApMV ile infekteli bitkilerin yaprak dokularından yaklaşık olarak 100 mg alınıp havan ve havaneli yardımıyla ezilmiştir. Ezilen örnekler eppendorf tüpler içerisine konulup, buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra her bir örnek üzerine 100 µl Western ekstraksiyon bufferından (0.5 M Tris, % 20 Gliserol, % 1 DDT, % 6 SDS ve % 0.002 Bromophenol blue) eklenmiş ve örnekler vortekslenmiştir. Elde edilen karışım 95ºC'de 3-5 dakika kaynatıldıktan hemen sonra buz içine alınmış ve tekrar vortekslenip düşük hızda santrifüj edilmiştir. Örnekler elektroforez aşamasına kadar tekrardan buz kabı içerisinde bekletilmiştir.

3.3.2. Jel hazırlanması

Bu aşamada separating jel ve stacking jel olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Öncelikle seperating jel hazırlanmış ve polimerize olması beklendikten sonra stacking jel hazırlanıp sisteme yüklenmiştir.

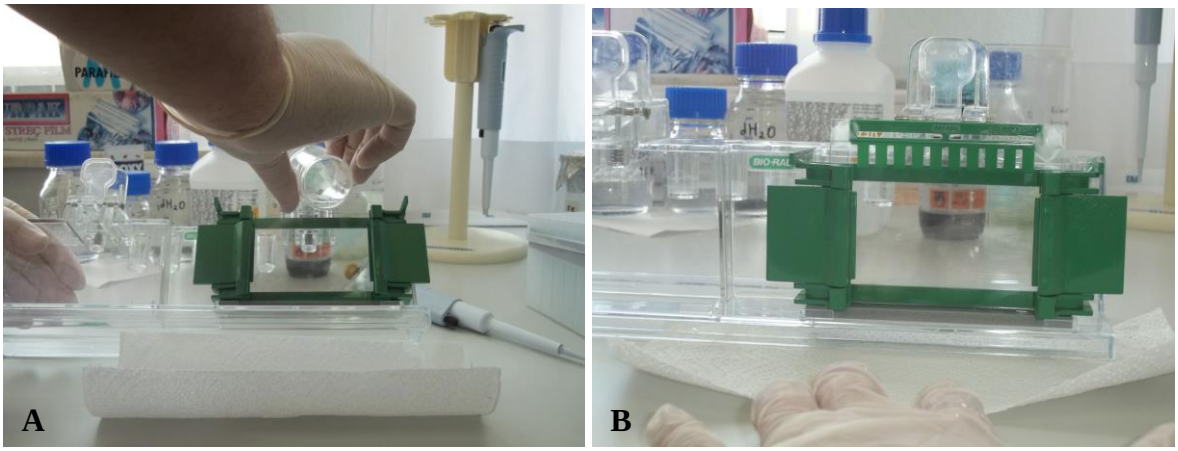
Seperating jel hazırlanmasında (% 12'lik SDS Jel); 1400 µl Acrylamide monomer solüsyonu, 1200 µl dH_2O, 900 µl 4X Gel Running Buffer (1.5 M Tris-Cl pH: 8.8), 40 µl % 10'luk Sodyum Dedosil sülfat (SDS), 18 µl Amonyum Persülfat (APS) ve 2 µl TEMED kullanılmıştır.

Hazırlanan solüsyon jel aparatına eklenmiş ve jelin üst kısmında kalan boşluğa pipet yardımı ile saf su eklenmiş ve daha sonra jelin polimerize olması için bir süre beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra stacking jel hazırlanmıştır.

Stacking jel hazırlanmasında; 500 µl 4X Stacking gel buffer (0.5 M Tris-Cl pH: 6.8), 1200 µl dH_2O, 280 µl Acrylamide monomer solution, 10 µl APS ve 2 µl TEMED kullanılmıştır.

Separating jelin hazırlanması için eklenen su döküldükten sonra kurutma kağıdı yardımı ile jel kurulanmıştır. Ardından hazırlanan stacking jel, separating jel üzerine

dökülüp polimerize olması için 20-30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jel aparatı elektroforez setine yerleştirilmiştir.



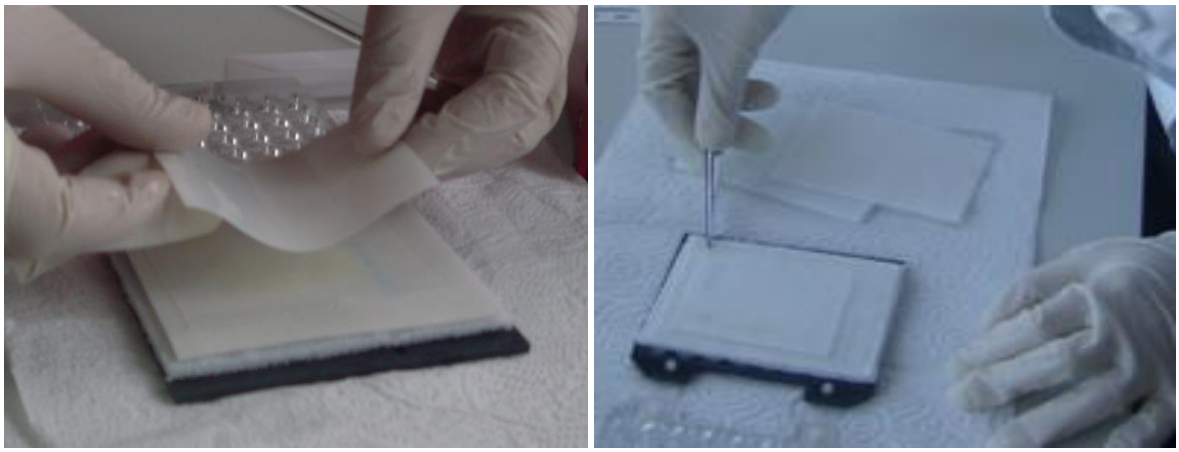
Şekil 3.2. Separating jel hazılanması (A), Stacking jel hazırlanması (B).

3.3.3. Elektroforez aşaması

Önceden hazırlanan her bir örnekten 10 µl, boya maddesinden ise 1 µl alınıp karıştırılmıştır. Markerdan ise 5 µl alınıp elektroforez sistemine yüklenmiştir. Tankın içi Tank buffer (0.025 M Tris pH: 3.0, 0.192 M Glycine, % 1 SDS) ile doldurulmuştur ve 100 voltta 1.5 saat elektroforez yapılmıştır.

3.3.4. Blotlama işlemi

Elektroforez işlemi bittikten sonra stacking jel çıkarılıp separating jelden ayrılmıştır. Ardından jel önce transfer buffer içine daha sonra ise jel nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Aktarma işlemi sırasında öncelikle; jel boyutunda nitroselüloz membran kesilmiş, alt kısımda bulunan pad'in üzerine filtre kağıdı konulmuş ve onun üzerine de jel yerleştirilmiştir. Pad ve filtre kağıtları yerleştirilmeden önce transfer bufferına batırılmıştır. Jelin üzerine de nitroselüloz membran ve tekrardan filtre kağıdı ile pad konulup jel holder kaset kapatılmıştır. Kapatılan jel holder kasetin beyaz kısmı tankın kırmızı yüzeyine, siyah kısmı da siyah yüzeye gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Tankın içerisi transfer buffer ile tamamen doldurulmuştur. 30 Voltta 90 miliamperde tüm gece elektroforez yapılmıştır.



Şekil 3.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması.

3.3.5. Bloklama işlemi

Elektroforez işleminin ardından nitroselüloz membran çıkarılmıştır. Membran TBS buffer içerisine alınıp bir çalkalayıcıda 2-3 dakika süreyle çalkalanmıştır. Daha sonra bloklama solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon hazırlanmasında için 0.6 g süt tozu, 0.2 g albümin tartılıp TBS buffer içerisine alınmıştır. Bloklama solüsyonu içerisinde 30-45 dakika süreyle çalkalanmıştır. Bloking yapılan şerit membranlar, 3 kez Tris buffer salin-Tween 20 (TBS-T) ile 3 er dakika ara ile yıkanmıştır.

3.3.6. Özgül antikorlar ile kaplama

Membran virüse özgü konjugat antibadisi ile kaplanıp 1 saat inkübe edilmiştir. Membran 3 defa TTBS ile 5 dakika ara ile yıkanmıştır.

3.3.7. Proteinlerin görüntülenmesi

200 ml saf su içerisinde substrat maddesi (BCIP-NBT) (Sigma, ABD) eritilip membrana karıştırılmış ve ardından renk oluşumu gözlenmiştir.

3.4. Oligonükleotid Primerlerin Hazırlanışı

Çalışma kapsamında PCR analizlerinde kullanılmak üzere bir primer çifti tasarlanmıştır. Tasarlanan primer ApMV kılıf protein geninin 668 bç'lik bölgesini içeren SK9ApMV CP-F 3' ATGGTCTGCAAGTACTGTA3' ve SK10ApMV CP-R 5' GTATTTGCACCGGTGGTAAC 3' adı ve dizisine sahip spesifik primerlerdir.

3.5. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilecek ürünleri Tek sarmal konformasyonel polimorfizm (SSCP) çalışmalarında kullanılmak üzere bazı ApMV izolatlarına RT-PCR analizi yapılmıştır. RT-PCR analizinde kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından edilmiş ve firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. PCR aşamaları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

3.5.1. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonunda Qiagen (Almanya) firmasına ait RNeasy izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu, üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmış ve izolasyon öncesi RNA konsantrasyonunu arttırmak amacı ile RPE solüsyonuna 20 µl 2M dithiothreitol (DDT), yıkama aşamasında kullanılan RPE solüsyonuna ise 4 hacim % 96'lık (44 ml) etil alkol eklenmiştir. İzolasyonda, öncelikle havan içerisinde 20 mg doku örneği ezilmiş ve üzerine guanidine thiocyanate içeren RLT bufferdan 600 µl konulup 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra maksimum hızda 3 dk santrifüj edilip, elde edilen sıvı kısım (süpernatant) yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine 500 µl % 70'lik etil alkol konulmuştur. Elde edilen toplam hacmin 700 µl'si Spin Column'a aktarılmış ve 20 sn 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra arta kalan kısım uzaklaştırılmıştır. Ardından Spin Column'a etil alkol içeren RW 1 yıkama solüsyonundan 700 µl eklendikten sonra 20 sn 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve altta kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra Spin Column'a 500 µl RPE yıkama solüsyonu eklenip 20 sn 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra alt kısmı uzaklaştırılmış ve aynı işlem bir kez daha tekrar edilmiştir. Daha sonra Spin Column yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve membranın kurutulması için maksimum hızda 1 dk santrifüj edilmiş ve son olarak üzerlerine saf su eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

3.5.2. Kılıf protein genlerinin çoğaltılması

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan Random primer ve Power Script reverse transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir.

Bu amaçla 5 µl total RNA, 20 pmol random primerden 1 µl, 10 mM dNTP'den 1 µl olmak üzere bir tüp içerisine konularak su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 65°C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza konulup 2 dakika bekletilerek RNA'ların denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyonu yapılan RNA ve primer karışımına Reverse transkriptaz

tampon solusyonundan (50 mM Tris HCl pH:8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$) 0.5 µl, 5x Prime script buffer'dan 4 µl, RNAz inhibitörden 0.5 µl, 20 pmol random primerden 1 µl, 10 mM dNTP'den 1 µl ve 3 µl H_2O eklenerek, RT-karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi 30°C 10 dakika 42°C 45 dk ve 70°C 15 dakika daha sonra da 4°C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Daha sonra sentezlenen cDNA'lardan ApMV kılıf protein genine spesifik SK9ApMV ve SK10ApMV primerleri kullanılarak kılıf protein geni çoğaltılmıştır. Bu amaçla 10x PCR tampon solusyonundan (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl 25°C pH: 9.0, % 1 Triton X-100) 2.5 µl, 10 mM dNTP solusyonundan 1 µl, ApMV kılıf protein genine spesifik primerlerden 0,5 µl, Taq polimeraz solusyonundan 0.25 µl, cDNA'lardan 5 µl ve sudan 15.25 µl eklenerek toplam hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 94°C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 94°C' de 30 sn 55°C' de 30 sn ve 72°C' de 45 sn, 72°C' de 5 dakika daha sonra da 4°C' de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 100-1000 DNA büyüklük markörleriyle birlikte % 1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Major Science UVDI jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.6. Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) Analizi

SSCP analizi çalışması Rubio ve ark (1996)'nın belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Yöntemde RT-PCR ürünlerinden 1 µl alınarak üzerine 9 µl denatüre edilmiş solüsyon (95 % formamide, 20 mm EDTA, pH: 8.0 ve 0.5 mg/ml bromophenol blue) ile karıştırılmış ve 99°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Sıcaklık uygulamasının ardından örnekler hemen buz içerisine konularak denatürasyon sağlanmıştır. Toplam 10 µl örnek DNA kollarını birbirinden ayırmak amacı ile non-denatüre poliakrilamid (% 8 acrylamide) jelde TBE (89 mmTris-borate, 2 mM EDTA, ph: 8.0) tampon çözelti içerisinde 200 V 3 saat süre ile dikey elektroforezde ayrıştırılmıştır. Poliakrilamid jelde ayrıştırılan DNA'lar gümüş nitrat ile boyanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

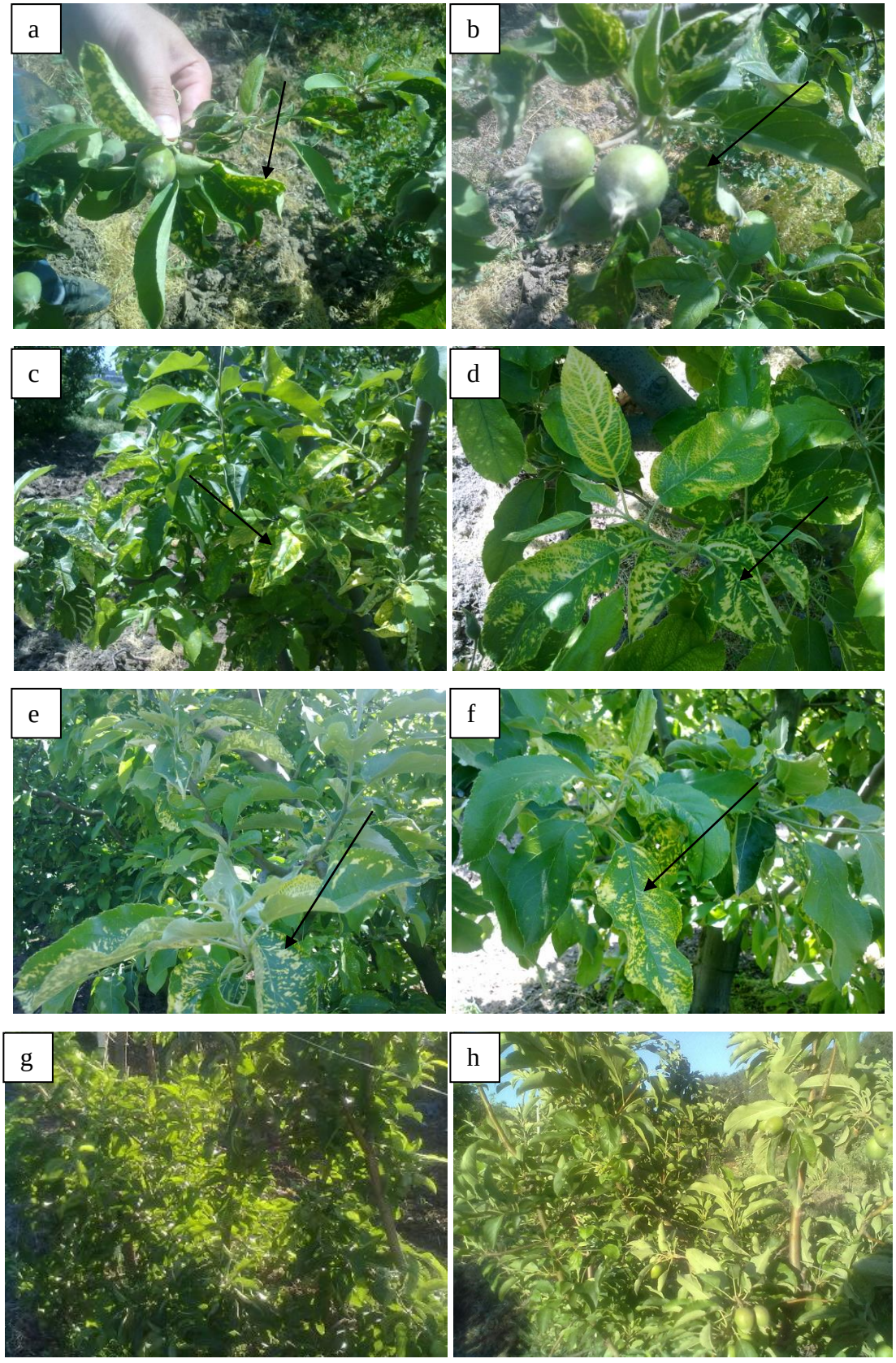
4.1. Arazi Çalışmaları Bulguları

Arazi çalışmaları elma üretiminin yapıldığı Çanakkale ili ve ilçelerinde 2011 ve 2012 üretim sezonlarında gerçekleştirilmiştir. Elma üretimi yapılan bahçeler rastgele seçilmiş ve sörveyler gerçekleştirilmiştir. Bitkiler görsel olarak incelenmiş ve ApMV simptomlarına benzer simptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Yapılan sörveyler sonucunda 2011 yılında 25, 2012 yılında ise 19 olmak üzere toplam 44 örnek toplanmıştır.

Örnekleme yapılırken bahçe seçimleri tesadüfi olarak yapılmış ve Çanakkale Merkez ilçe, Lapseki ilçesi ve Bayramiç ilçesinden olmak üzere, tipik ApMV simptomu gösteren ve ApMV ile şüpheli olduğu düşünülen ağaçlardan yaprak örnekleri alınmıştır. Bahçe büyüklüğüne göre değişmekle birlikte her bir bahçeden en az bir en fazla üç örnek alınmıştır. Yapılan sörveyler süresince örnekleme yapılırken ApMV'nin tipik simptomu olan, yapraklarda açık sarı kenarları belirgin lekeler ve mozaik oluşumları ile yine yaprak damarlarında renk açılmalarının gözlendiği yapraklardan örnekler alınmıştır. Yapılan sörveyler sonucunda elde edilen sağlıklı ve infekteli bitkilerden bazıları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Elma mozaik virüsü ile infekteli olmayan elma ağaçları.



Şekil 4.2. Elma mozaik virüsü ile infekteli ve sağlıklı elma ağacı yapraklarının görünümü. (a, b, c, d, e ve f infekteli, g ve h sağlıklı, ok işaretleri mozaik simptomlarını göstermektedir).

ApMV simptomları, konukçularına göre farklılık gösterebilmekle birlikte genel olarak yapraklarda sararmalara ve mozaik oluşumlarına neden olmaktadır. Benzer çalışmalarda Buzkan ve ark (2006) yaptıkları sörveyler sonucunda ApMV'nin kayısı yapraklarında neden olduğu simptomların, yapraklarda uç kısımlardan başlayıp geriye doğru ilerleyen sarılık şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Yardımcı ve Eryiğit (2006), Isparta'daki elma alanlarında Elma mozaik virüsü'nün varlığını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışma kapsamında yapmış oldukları mekanik inokulasyonlar sonucunda *Chenopodium amaranticolor'*da nekrotik benekler, *Cucumis sativus'*ta ise oldukça belirgin klorotik lokal lezyonlar saptamışlardır. Uludağ (2007) Batı Akdeniz Bölgesi'nde elmalarda görülen bazı virüs hastalıklarının belirlenmesi konulu çalışmasında ApMV'nin tipik belirtileri olan yapraklarda mozaikleşme ve klorotik alanları gözlerken, diğer virüslere ait hiçbir belirti saptayamamıştır.

Yardımcı ve Çulal (2009) Göller Bölgesi'nde yağ güllerinde *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV) hastalıklarının varlığını belirlemek üzere yaptıkları çalışma kapsamında ApMV'yi indikatör bitkilere inokule ettiklerinde *Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quinoa*'da nekrotik lokal lezyonlar, hıyarlarda ise klorotik lokal lezyonlar ile beneklenme ve mozaik belirtilerinin var olduğunu saptamışlardır. Akbaş ve Değirmenci (2009) yürüttükleri çalışma kapsamında, fındık bahçelerinde Elma mozaik virüsü'nün varlığını görsel, serolojik ve de biyolojik indeksleme yöntemleri ile belirlemeyi amaçlamışlardır. Simptomolojik gözlemleri sonucunda ApMV'nin fındık ağaçlarının tek bir dalında veya sadece bir kısmında sarı halkalar ve beneklenmeler oluşturduğunu, buna ek olarak meşe yaprağı deseni ve damar bantlaşmaları oluştuğunu belirtmişlerdir. Ertunç ve ark (2011) yaptıkları çalışmada ülkemiz fındık ve elma ekim alanlarında, Elma mozaik virüsü'ne ait izolatları toplamışlar ve topladıkları elma, gül, *Berberis thunbergii*, gürgen ve fındık izolatlarında hakim belirtiyi sistemik mozaik şeklinde belirtiler olarak gözlemlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada diğer çalışmalara paralel olarak ApMV ile infekteli elma ağaçlarında genel olarak açık sarı belirgin lekeler, mozaik oluşumları ve yaprak damarlarında renk açılma belirtileri gözlemlemişlerdir.

4.2. DAS-ELISA Testi Bulguları

Çalışma kapsamında 2011 ve 2012 yıllarında yapılan sörveyler sonucu toplanan 44 örnek DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Yapılan testler sonucunda 44 örneğin 28'inin (% 63) ApMV ile infekteli olduğu belirlenmiştir. ApMV'nin elma ağaçlarında çok

tipik simptom göstermesi ve bu simptomların oldukça kolay gözlemlenebilir olması DAS-ELISA bulguları sonucunda infekteli bitki sayısının yüksek bulunmasında önemli bir etkendir. ELISA testi verilerine dayanarak oluşturulan infekteli bitki sayılarının veya infeksiyon oranlarının hesaplanmasında konukçu bitki aralığının genişliği, bitki türü, viral etmenin virulensliği, sörvey yöntemi ve sörvey yapılan alanın genişliği vb. birçok faktör sonuçların değişen oranlarda çıkmasına etken olabilmektedir. ApMV'nin DAS-ELISA ile belirlenmesi üzerine yapılmış benzer çalışmalarda Domingez ve ark (1998), İspanya'nın Murcia şehrinde Elma mozaik virüsü (ApMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) virüslerinin varlığını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışma kapsamında DAS-ELISA bulguları sonucunda örneklerin % 30'nun en az bu virüslerden biri ile infekteli olduğunu ve ApMV infeksiyonlarının ise % 15.7 olduğunu bildirmişlerdir.

Birişik ve ark (2005) Akdeniz Bölgesi elma yetiştiriciliğinin virüs hastalıkları açısından durumunun ortaya konması için yürüttükleri sörveylerde örnekleri Elma mozaik virüsü (ApMV), Elma kloritik yaprak lekesi virüsü (ACLSV) ve Elma gövde çukurlaşma virüsleri (ASGV) açısından DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. DAS-ELISA verilerine göre ApMV infeksiyon oranlarını % 3.147 olarak belirlemişlerdir.

Bir başka çalışmada Yardımcı ve Eryiğit (2006) Isparta'daki elma alanlarında Elma mozaik virüsü'nün varlığını araştırmışlar ve mozaik belirtisi gösteren toplam 276 yaprak örneği toplamışlardır. Topladıkları örneklere uyguladıkları DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin 82'sinde (% 29.71) ApMV'nin varlığını saptamışlardır. Gümüş ve ark (2007) Batı Anadolu'daki *Prunus* türlerinde bazı önemli virüs hastalıklarının belirlenmesi amacı ile bir çalışma yürütmüşler ve elde ettikleri 1732 örneğin 1225 tanesini DAS-ELISA ile test etmişler ve bulgularında 365 örnekte araştırdıkları hastalıklardan en az birisinin bulunduğu belirlemişler ve ApMV infeksiyonun ise % 0.8 olduğunu bildirmişlerdir.

Akbaş ve Değirmenci (2009) yürüttükleri çalışmada fındık bahçelerinde Elma mozaik virüsünün varlığını görsel, serolojik ve biyolojik indeksleme ile belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu bağlamda çalışmalarının serolojik kısmını oluşturan DAS-ELISA bulguları sonucu 1465 örnekten 197'sini (% 13.6) ApMV ile infekteli olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma kapsamında ise DAS-ELISA bulguları sonucunda infeksiyon oranını % 63 olarak belirlenmiştir.

Bilindiği üzere elma bahçelerinde elma üretimini kısıtlayan başka virüs ve virüs benzeri hastalıklar da bulunmakta ve bu hastalık etmenleri, ApMV ile karışık infeksiyon şeklinde bulunarak elmalarda kalite ve kantite kayıplarının artmasına neden

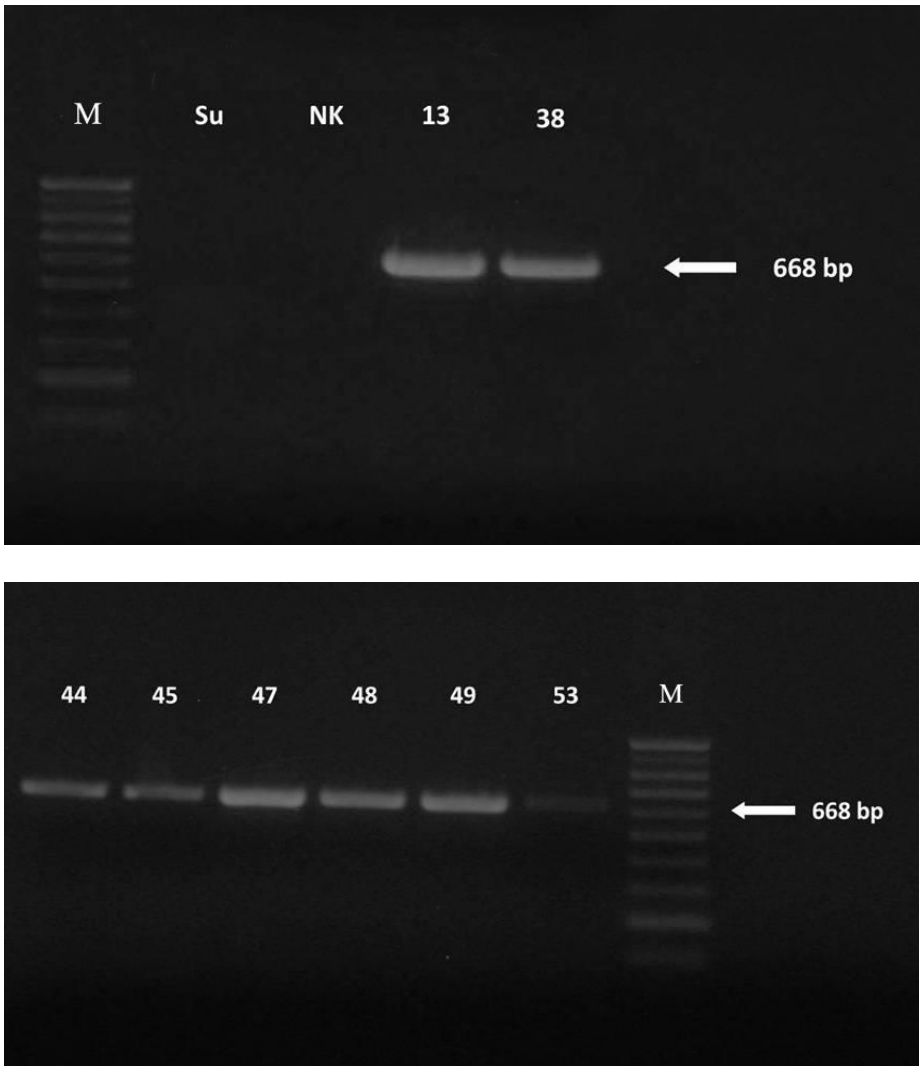
olabilmektedirler. Çağlayan ve ark. (2006) ülkemizde elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde elmalarda önemli dört virüs hastalığının yaygınlık durumlarını değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışma kapsamında DAS-ELISA bulguları sonucunda yetiştiricilik yapılan bahçelerde karışık infeksiyon oranlarını oldukça yaygın olarak belirlemişler ve karışık infeksiyonlar içinde en yaygın olanları sırasıyla ASPV + ACLSV (% 84.21), ASPV + ASGV (% 36.84), ACLSV +ASGV (% 26.32) ve ASPV + ApMV (% 5.26) olarak belirlemişlerdir. ASPV + ASGV + ACLSV üçlü infeksiyon oranını ise % 26.32 olarak saptamışlardır. Uludağ (2007) Batı Akdeniz Bölgesi'nde yürüttüğü ve farklı elma virüslerinin belirlenmesi amacıyla yaptığı çalışmada DAS-ELISA bulguları sonucunda ACLSV+ASPV (% 44.44) olarak saptarken ApMV+ACLSV (% 38.89), ApMV+ASPV (% 37.5), ASGV+ASPV (%33.33), ACLSV+ASGV (% 26.39) ve ApMV+ASGV (% 20.38) olarak belirlemiştir. ApMV+ACLSV+ASGV+ASPV dörtlü infeksiyon oranını ise % 18.06 olduğunu bildirmiştir.

4.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi (RT-PCR) Bulguları

Moleküler bir yöntem olan RT-PCR yöntemi, DAS-ELISA yöntemine göre daha duyarlı bir yöntemdir. Araştırıcıların yaptıkları RT-PCR çalışmaları öncesi uyguladıkları total RNA izolasyon yöntemleri çalışma niteliğine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu çalışmada RNA izolasyonunda Qiagen (Almanya) firmasına ait RNeasy izolasyon kiti kullanılmış ve total RNA izolasyonu başarı ile sonuçlanmıştır.

Analiz kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ApMV izolatlarının bir kısmına SSCP çalışmalarında kullanmak üzere RT-PCR yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarında kılıf protein geninin bir kısmına spesifik olan ve yaklaşık olarak 668 bp büyüklüğünde korunmuş bir bölgeyi çoğaltan SK9ApMV ve SK10ApMV primerleri kullanılmıştır. RT-PCR için kullanılan 13, 38, 44, 45, 47, 48, 49 ve 53 numaralı izolatların tamamı DAS-ELISA testi sonucunda pozitif olduğu bilinen örneklerden seçilmiştir. Bu izolatlar beklenildiği üzere yaklaşık 668 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. ApMV izolatlarına ait RT-PCR sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

RT-PCR sonucunda tüm izolatlarda belirgin bantlar oluşurken, sadece 53 numaralı izolatta zayıf bant oluşumu gözlenmiştir. Bu durum, total RNA izolasyonu ile ilgili bir sorundan ya da virüs konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.3. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000bp) NK: Negatif kontrol. 13, 38, 44, 45, 47, 48, 49, 53: Elma mozaik virüsü ile infekteli izolatlar.

ApMV'nin varlığının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, RT-PCR analizi sonuçlarında elde edilen bant büyüklüklerinin farklı olması genom içerisinde yer alan, dizisi belli iki segment arasında çoğaltılması istenen özgün bölgenin belirlenmesi ile ilişkilidir. RT-PCR çalışmalarında yapılan tüm modifikasyonlar araştırmacıların çalışma amaçlarına göre farklılıklar gösterebilmekte ve bu nedenle de farklı büyüklükte bantlar elde edilebilmektedir.

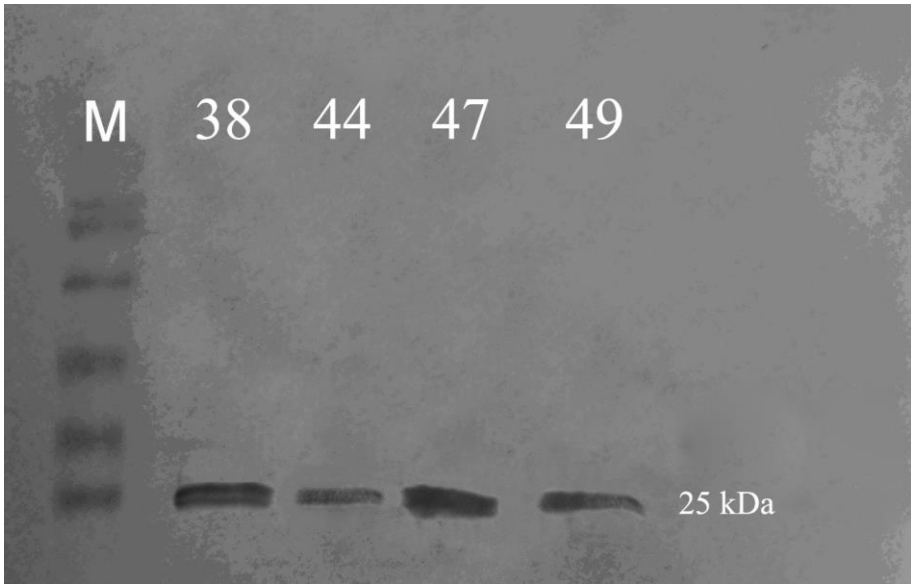
Benzer çalışmalarda Sanchez Navarro ve ark. (2005) multiplex RT-PCR yöntemini kullanarak eş zamanlı olarak 8 sert çekirdekli virüsünün ApMV, PNRSV, PDV, *American plum line pattern virus* (APLPV), PPV, ACLSV, *Apricot latent virus* (ApLV), ve *Plum bark necrosis stem pitting associated virus* (PBNSPaV) teşhis ve tanılaması üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaptıkları multiplex RT-PCR çalışmaları sonucunda ApMV'ye ait

(RNA 3) 417 bp olmak üzere, ApLV (RNA 3) 717 bp, ACLSV 632 bp, APLPV (RNA 3) 563 bp, PDV (RNA 3) ait 517 bp, PNRSV (RNA 4) 346 bp, PPV 313 bp, PBNSPaV 270 bp boyutlarında bantlar elde etmişlerdir.

Çağlayan ve ark. (2006) ülkemizde elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde elmalarda önemli dört virüs hastalığının yaygınlık durumlarını değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışma kapsamında yaptıkları RT-PCR sonuçlarında ApMV'de 262 bp ACLSV'de 258 bp, ASGV'de 523 bp ve ASPV'de 243 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Uludağ (2007) Batı Akdeniz Bölgesi'nde bazı ticari elma bahçelerinde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV'nin varlılığını belirmek amacı ile yaptığı RT-PCR analizi sonuçlarında ApMV'de 262 bp, ACLSV'de 677 bp, ASGV'de 273 bp ve ASPV'de ise 370 bp büyüklüğünde bantlar elde etmiştir.

4.4. Western Blot Analizi Bulguları

Western blot analizinde DAS-ELISA testlerinde kullanılan poliklonal antibadiler kullanılmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen ve rast gele seçilen 38, 44, 47 ve 49 numaralı ApMV örnekleri kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda kılıf proteinine ait yaklaşık 25 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir. ApMV izolatlarına yapılan Western blot analizi sonucunda oluşan bantlar şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Western blot analizi sonuçları.

ApMV'nin kılıf protein genlerinin ağırlıklarının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında beklenildiği üzere yapılan bu çalışma ile çok yakın sonuçların

alındığı gözlenebilmektedir. Fajardo ve ark. (2011) yılında meyve ağaçlarında ApMV, PDV, Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) virüslerinin tanısı ve moleküler karakterizasyonu üzerine yapmış oldukları çalışma sonucunda bu virüslerin kılıf protein ağırlıklarını belirlemiş ve elde ettikleri bulgular sonucunda Çanakkale izolatlarında elde edilen sonuca benzer bir şekilde ApMV'ye ait yaklaşık 26 kDa büyüklüğünde kılıf protein geni ağırlığını belirlemişleridir.

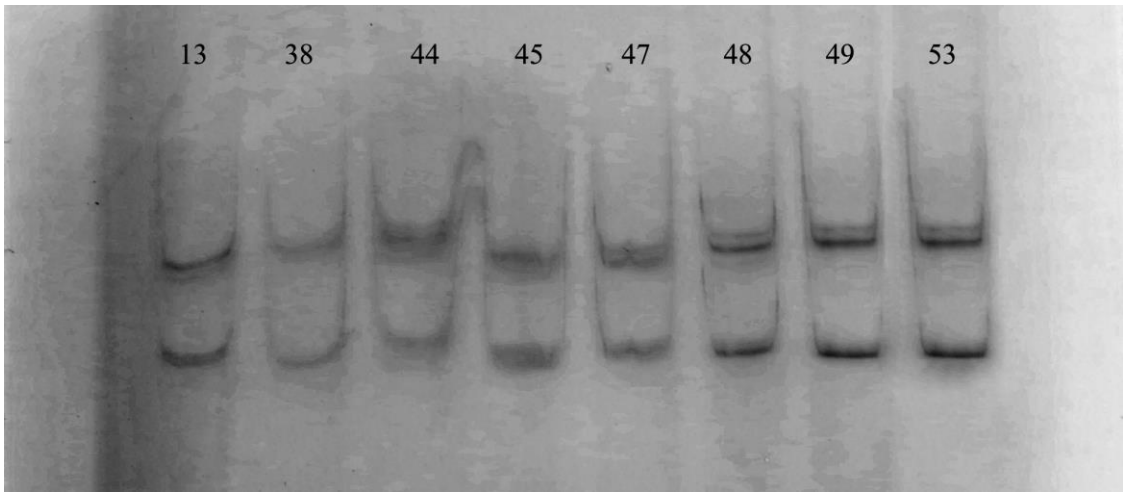
Alrefai ve ark. (1994) yaptıkları ve ApMV'nin kılıf protein geninin nükleotid sekansının belirlenmesi ve *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Brome mosaic virus* (BMV) ve Hıyar mozaik virüsü ile kılıf protein genlerinin benzerliklerini araştırdıkları çalışma kapsamında ApMV'nin yaklaşık 25 kDa ağırlığında kılıf protein genlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Benzer bir başka çalışmada ise Korkmaz ve ark. (2011) Elma mozaik virüsüne karşı RNA probu geliştirerek virüsün Van ve Malatya illerinde elmalardaki yaygınlığının moleküler hibridizasyon yöntemi ile araştırılmasını amaçladıkları çalışma kapsamında yaptıkları Western blot analizleri sonucunda çalışma kapsamında elde ettikleri her iki izolatın da yaklaşık 25.2 kDa büyüklüğündeki kılıf proteinini kodladığı tespit etmişlerdir.

4.5. Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) Analizi Bulguları

Tek sarmal konformasyonel polimorfizm (SSCP) DNA'nın çift sarmalının denatürasyon yolu ile ayrılması sonucunda elde edilen iki tek zincirli DNA molekülünün kendi içlerinde oluşturdukları yapının poliakrilamid jelde oluşturdukları profile göre DNA'lar arasındaki farklılıkları belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Bu çalışmada SSCP yöntemi ApMV izolatları arasında nükleotid düzeyinde oluşabilecek farklılıkların belirlenmesi amacı ile uygulanmıştır.

SSCP analizi kapsamında 38, 44, 45, 47, 48, 49 ve 53 numaralı örneklerin RT-PCR ürünleri kullanılmıştır. Örneklerin tamamında bant oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SSCP analizi sonuçları.

SSCP yöntemi bilindiği üzere bir gende bulunan küçük farklılıkları dahi ortaya koyan tek zincir DNA'nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (sekonder yapıların) oluşmasına ve poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir.

SSCP, PCR kullanımını içeren mutasyon saptama yöntemlerinden birisidir **(**Öner, 2002). Bilindiği gibi canlıların evriminde genetik çeşitlilik çok önemlidir. Canlılarda çeşitliliğin kaynağı ise genetik varyasyonlardır. Bir popülasyondaki genetik varyasyonun kaynağı mutasyonlardır. Organizmaların çoğunda, genetik materyal aslının aynı olarak replikasyon yoluyla çoğalarak nesilden nesile aktarılır. Ancak replikasyon sırasında ve sonrasında mutasyona yol açan hatalar olmaktadır. Genetik materyali RNA olan virüslerde mutasyon ve genetik varyasyon daha fazladır. RNA virüs izolatları genellikle aynı dizilime sahip bir RNA veya RNA'lar içermez. Birbirleriyle yakından ilişkili dizi varyantlarının oluşturduğu bir popülasyon içerirler. Bu populasyona "quasispecies" adı verilmektedir. RNA virüs popülasyonları içerisindeki bu varyasyonların nedenleri; replikasyon sırasında RNA polimeraz enziminin yapmış olduğu hatalardan, arazi koşullarında gerçekleşen tekrarlı inokülasyonlardan, popülasyon içerisindeki varyantlar arasında oluşan rekombinasyonlardan kaynaklanmaktadır (Moreno ve ark. 2008). Aynı zamanda RNA üzerinde oluşan silinmeler de mutasyonlara neden olabilmektedir. Bu ve benzeri olaylar dizileme üzerinde değişikliklere neden olabilmekte bu değişiklikler SSCP yöntemi ile belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada ApMV genlerinin tamamının iki band içerdiği görülmüştür. SSCP profillerine göre ApMV izolatları arasında önemli derecede farklılıklar görülmediği ve

izolatlar arasında birbirlerinin aynısı ya da çok yakın bandlar oluşturdukları ortaya çıkmıştır. Bu durumun başlıca nedenleri arasında çalışma kapsamında elde edilen izolatların birbirine yakın kaynaklardan elde edilmesi ve bu kaynakların da orijinlerinin aynı olmasından kaynaklandığı söylenebilinir. Bununla birlikte ApMV bilindiği üzere vektörlerle taşınmamakta ve bu nedenle olması muhtemel diğer streynlerin de taşınma işlemi gerçekleşmemektedir. Bu bağlamda SSCP sonuçları incelendiğinde izolatların tamamının iki band içerdiği ve elde edilen ApMV izolatlarının tek bir streynden oluştuğu ve mevcut ApMV izolatlarının karışık streynleri içermediği gözlenebilmektedir.

SSCP yöntemi kullanılarak viral etmenlerin farklı DNA'ları arasında farklı profillerin elde edilmesine yönelik çalışmalarda Turunçgil tristeza virüsü (*Citrus tristeza virus*; CTV) ile ilgili yapılan çalışmalar önemli bir yer tutar. CTV'nin yaprak bitleri ile taşınması ve karışık streynlerin oluşması daha iyi SSCP profillerin oluşmasında önemli bir etkendir. Rubio ve ark. (1996) farklı coğrafik bölgelerden aldıkları 15 CTV izolatının kılıf protein genlerini RT-PCR yoluyla çoğaltarak SSCP yöntemiyle analiz etmişlerdir. Kılıf protein genlerinin tamamının veya farklı enzimlerle kesilen kısımlarına yaptıkları SSCP analizleri sonucunda elde edilen profillerle 15 izolatın birbirinden ayrıldığını gözlemlemişlerdir. CTV için ilk kez kullandıkları bu yöntemle kılıf protein geninde sadece birkaç baz farklılık gösteren ve diğer yöntemlerle ayrılamayan CTV izolatlarının birbirinden farklı olduklarını SSCP yöntemiyle göstermişlerdir.

D'urso ve ark. (2003) CTV'nin iki farklı genom bölgesine SSCP uygulayarak İspanya'nın doğu kısımlarından aldıkları CTV izolatlarında popülasyonlarda bulunan genetik varyasyonları belirleyerek farklı haplotiplerin yaygınlıkları ve genetik farklılıklarını araştırmışlardır. 14 farklı yer ve 125 farklı ağaçtan aldıkları toplam 254 örnekten CTV'nin p20 geni ve ORF1 içerisinde A bölgesini RT-PCR yoluyla çoğaltılarak SSCP yöntemiyle analiz etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda p20 geninde sekiz, A bölgesinde beş farklı haplotip belirlemişler ve belirledikleri farklı haplotiplerin örnek alınan yer, ağacın yaşı ve kullanılan anaca göre dağılımlarını istatiksel olarak belirlemişler ve birbirlerine çok yakın ağaçlarda farklı haplotiplerin olduğu saptanmışlardır.

Iglesias ve ark. (2008) iki farklı genom bölgesine SSCP uygulayarak Arjantin'de *T. citricida'*nın yaygın olarak bulunduğu iki önemli turunçgil üretim bölgesinden CTV izolatlarının popülasyon yapılarını ve genetik çeşitliliklerini belirlemişlerdir. İki farklı üretim bölgesinden aldıkları 11 CTV izolatının p23, p25 ve p27 genlerini RT-PCR yoluyla çoğaltılarak SSCP yöntemiyle analiz etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda izolatların çoğunun yüksek düzeyde izolat içi varyasyon gösterdiğini tespit etmişler ve izolatlar

içerisinde farklı değerlere sahip varyantların bulunmasının nedenini arazideki ağaçların tekrar tekrar infekte olmasından kaynaklandığını bildirmişleridir. Bu genin DNA dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda yaptıkları filogenetik analizlerde izolatların her üç gene göre de benzer gruplamalar gösterdiğini belirlemişlerdir.

BÖLÜM 5
SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinde Elma mozaik virüsü (ApMV) simptomlarına benzer simptom gösteren elma ağaçlarından örnekler alınarak DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiş, infekteli çıkan örneklerden bazıları RT-PCR ürünleri kullanılarak Tek Sarmal Konformasyonel Polimorfizm (Single-stranded Conformation Polymorprhism; SSCP) yöntemi ile analiz edilerek izolatlar arasındaki farklılıklar bulunmadığı belirlenmiş ve yapılan Western blot analizi ile de virüs kılıf protein genlerinin ağırlıkları saptanmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen ApMV izolatları Çanakkale ili ve ilçelerinde elma üretiminin yapıldığı alanlardan elde edilmiştir. Yapılan sörveyler sonucunda ApMV'ye benzer belirti gösteren ve ApMV ile infekteli olduğu ya da şüpheli olduğu düşünülen toplam 44 adet bitki örneği toplanmıştır. Örnekleme yapılırken bahçe seçimleri tesadüfi olarak yapılmış ve tipik ApMV simptomu gösteren ve ApMV ile şüpheli olduğu düşünülen ağaçlardan yaprak örnekleri alınmıştır. Örnekleme yapılırken bahçe büyüklüğü de göz önüne alınarak her bir bahçeden en az bir en fazla üç örnek alınmıştır. Yapılan sörveylerde genel olarak ApMV'nin tipik simptomu olan, yapraklarda açık sarı kenarları belirgin lekeler ve mozaik oluşumları ile yine yaprak damarlarında renk açılmaları kolaylıkla gözlenmiş ve çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda da bu belirtileri gösteren örneklerin ApMV ile infekteli olduğu belirlenmiştir.

DAS-ELISA testi bulguları sonuçlarında 2011 yılı üretim sezonunda toplanan 25 örnekten 9'u (% 36) ve 2012 yılı üretim sezonunda toplanan 19 örneğin tamamı (% 100) olmak üzere toplamda 44 örneğin 28'i (% 63) ApMV ile infekteli olarak bulunmuştur. Pozitif bulunan 28 örneğin tamamını, arazi çalışmaları sırasında belirgin bir biçimde ApMV simptomlarını gösteren bitkiler oluşturmuştur. 2011 yılı DAS-ELISA bulguları sonucu ile 2012 yılı verileri sonuçları arasındaki farkın bu kadar fazla olmasının nedeni, ilk yıl yapılan sörveylerde tipik ApMV simptomu göstermeyen fakat yine de infekteli olabileceği düşünülen bitkilerin de arazi çalışmalarına dahil edilmesinden kaynaklanmıştır. İkinci yıl yapılan sörveylerde ise belirgin ApMV simptomları gösteren bitkiler toplanmış ve bu bitkilerin DAS-ELISA testi sonucunda infekteli olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere DAS-ELISA bulguları sonucunda infekteli bitki sayısının yüksek bulunmasında ApMV'nin elma ağaçlarında çok tipik simptom göstermesi ve bu simptomların oldukça kolay gözlemlenebilir olmasının etkisi oldukça büyüktür.

Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan 8 ApMV izolatına Tek sarmal konformasyonel polimorfizm (SSCP) çalışmalarında kullanmak üzere RT-PCR analizi yapılmıştır. RT-PCR

çalışmalarında kılıf protein geninin bir kısmına spesifik olan ve yaklaşık olarak 668 bp büyüklüğünde korunmuş bir bölge çoğaltılmıştır. RT-PCR analizi için kullanılan 13, 38, 44, 45, 47, 48, 49 ve 53 numaralı izolatların tamamını, DAS-ELISA testi sonucunda pozitif olduğu bilinen örnekler oluşturmuştur. Bu izolatlar beklenildiği üzere yaklaşık 668 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. RT-PCR sonucunda 53 numaralı izolat dışında tüm izolatlarda belirgin bantların oluştuğu gözlenmiştir. 53 numaralı izolatta zayıf bant oluşması muhtemelen virüs konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanabilmekle birlikte total RNA izolasyonu ile ilgili bir sorundan da bu durumun kaynaklanabilmesi mümkündür.

Tek sarmal konformasyonel polimorfizm analizi, PCR kullanımını içeren mutasyon saptama yöntemlerinden birisidir **(**Öner, 2002). SSCP yöntemi bilindiği üzere aynı zamanda bir gende bulunan küçük farklılıkları dahi ortaya koyan tek zincir DNA'nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılması ile değişik konformasyonların (sekonder yapıların) oluşmasına ve poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Çalışmada elde edilen ApMV izolatlarınına ait genlerinin tamamının iki band içerdiği görülmüştür. SSCP profilleri izlendiğinde ApMV izolatları arasında önemli derecede farklılıklar görülmediği ve izolatların kendi aralarında birbirlerinin aynısı ya da çok yakın bantlar oluşturdukları ortaya çıkmıştır. Bu durumun başlıca nedenleri arasında çalışma kapsamında elde edilen izolatların birbirine yakın kaynaklardan elde edilmesi ve bu kaynakların da orijinlerinin muhtemelen aynı olmasından kaynaklandığı söylenebilinir. Çalışmada elde edilen izolatlara ait SSCP sonuçlarına bakıldığında tamamının iki band içerdiği ve elde edilen ApMV izolatlarının tek bir streynden oluştuğunu ve karışık streynleri içermediği gözlenebilmektedir.

ApMV izolatlarının kılıf protein genlerinin ağırlıklarının belirlenmesi amacı ile yapılan Western blot analizinde DAS-ELISA testinde kullanılan poliklonal antibadilerden faydalanılmıştır. Analizde rast gele seçilen ve DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçlarında infekteli olduğu belirlenen 38, 44, 47 ve 49 numaralı ApMV izolatları kullanılarak Western blot analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda tüm örneklerde kılıf proteinine ait yaklaşık 25 kDa ağırlığında proteinler elde edilmiştir.

Bilindiği üzere Elma mozaik virüsü, vejetatif olarak üretim materyali, budama, aşı gözü ve polen ile yayılmakta ve elmanın yanı sıra gül, fındık, atkestanesi, ahududu, böğürtlen, şerbetçi otu ve sert çekirdekliler olmak üzere konukçu tür ve çeşidine bağlı olarak değişen oranlarda kalite ve kantite kayıplarına neden olmaktadır. Bitki virüs

hastalıkları, özellikle diğer hastalık etmenlerinde olduğu gibi kimyasal mücadele yöntemlerinin bulunmaması nedeni ile ayrıca bir öneme sahiptirler. Bu bağlamda infeksiyon öncesi alınacak tedbirler epidemilerin oluşmasının engellenmesi adına büyük önem taşımaktadırlar. Elma mozaik virüsü'nün en çok aşı ile yayıldığı bilinmektedir. Gerek ticari bahçelerde gerekse de hobi bahçelerinde bilinçsiz vejetatif taşınmaların gerçekleşmesi hastalığın sağlıklı bitkilere taşınmasında kuşkusuz önemli rol oynamaktadır. Tüm bahçelerin tesisinde olduğu gibi elma bahçeleri tesisinde de sertifikalı fidanların üretimde kullanılması büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde teknolojinin gelişmesi ve ülkemiz gibi gelişmekte olan ve gelişmiş tüm ülkelerde, teknolojinin gelişimine paralel olarak bilimsel çalışmaların da artması, hastalık ve zararlılarla mücadelede önemli mesafelerin kat edilmesine öncülük etmiştir. Üniversiteler ve araştırma kurumlarının bitki virüs hastalıklarına karşı dayanıklı çeşitler oluşturulması adına yaptıkları tüm çalışmalar, virüs hastalıklarının engellenmesi adına son derece önemlidir. Tüm bu çalışmaların başarı ile sonuçlanabilmesi için hastalık etmeninin mevcut durumunun araştırılması büyük önem taşır. Daha sonraları yapılacak çalışmalar için bir ön hazırlık niteliğinde olabilecek bu çalışmada Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen Elma mozaik virüsü izolatlarının varlığı, moleküler ve serolojik olarak belirlenmiş ve hastalığın ilimizde mevcut olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

Akbaş B. ve Değirmenci K., 2011b. *Apple Mosaic Ilarvirus* (ApMV)'un Elma, Erik ve Fındık İzolatlarının Kılıf Protein Gen Bölgelerinin Sekans Analizleri. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş s. 93

Akbaş K. ve Değirmenci B., 2009 Incidence and Natural Spread of *Apple Mosaic Virus* on Hazelnut in the West Black Sea Coast of Turkey and It's Effect on Yield. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3): 767-771.

Alrefai R.H., Shiel P.J., Domier L.L, D' Arcy C.J., Berger P.H. ve Kobran S.S., 1994. The Nucleotide Sequence of *Apple Mosaic Virus* Coat Protein no Similarity of with Other Bromoviridae Coat Protein Genes. *Journal of General Virology*, 75 (10): 2847-2850.

Anonim, 2010. http: //www.tuik.gov.tr/Veribilgi. Erişim tarihi: 04.04.2013.

Anonim, 2011. http: //www.tuik.gov.tr/Veribilgi. Erişim tarihi: 04.05.2013.

Birişik N., Myrta A. ve Baloğlu S., 2005. Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Elmalarda Virüs Hastalıklarının Saptanması. *Bitki Koruma Araştırma Enstitüsü*, Adana. s: 21

Brunt A., Crabtree K., Dallwitz M., Gibbs A. ve Watson L., 1996. Viruses of Plants, *CAB International*, p: 1484.

Bulut D., Sipahioglu H.M. ve Usta M. 2011. Performance Evaluation of Different Brands of Thermal Cyclers Used For Diagnostic Testing. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 21 (1): 35-41.

Buzkan N., Öztekin V., Demir M., Onur D. ve Ilgın M., 2006. SEKAMER Kayısı Koleksiyon Parselindeki Ağaçlarda Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Çözüm Yolları. *Fen ve Mühendislik Dergisi*, s: 3-9.

Çağlayan K., Ulubaş Ç. S., Gazel M. ve Jelkmann W., 2006. Detection of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assays in Turkey. *Turk J Agric For,* 30: 241-246.

Chamberlain E.E., Atkinson J.D., Hunter J.A. ve Wood G.A., 1971. Effect of *Apple Mosaic Virus* on Growth and Cropping of 'Freyberg' Apple Trees. *Ibid.*, 14: 936-943.

Clark M.F. ve Adams A.N., 1977. Characteristic of The Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Değirmenci B. ve Akbaş K., 2011. Amasya ve Tokat İllerinde Yetiştirilen Eriklerde Elma Mozaik Virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV) Enfeksiyonu ve Yaygınlığı. *Bitki Koruma Bülteni*, 51 (2): 207-213.

Dolunay H.E. ve Sertkaya G., 2011. Hatay İli Böğürtlen Alanlarında Virüslerin Araştırılması. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, Kahramanmaraş s. 404.

Dominguez S., Aparicio F., Sánchez-Navarro J. A., Pallás, V., García-Brunton J. ve Cano A., 1998. Studies on the Incidence of Ilarviruses and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in Apricot Trees in Murcia Region (Spain) Using Serological and Molecular Hybridization Methods. *XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops*,USA. 472: 203-210.

D'urso F., Sambade A., Moya A., Guerri J. ve Moreno P., 2003. Variation of Haplotype Distributions of Two Genomic Regions of *Citrus tristeza virus* Populations From Eastern Spain, *Mol Ecol.* 12 (2): 517-26.

Ertunç F., Canik D, Gospodaryk A, Budzanıvska I.G., ve Polischuk V.P., 2011. Elma Mozaik Ilarvirusu Türkiye ve Ukrayna İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 17: 95-104.

Fajardo T.V.M., Nickel O. ve Eiras M., 2011. Detection and Molecular Characterization of Ilarvirus and Ampelovirus Coat Protein Genes Infecting Temperate Fruit Trees. *Ciencia Rural*, 41 (1): 5-9.

Fulton R.O., 1952. Mechanical Transmission and Properties of *Rose mosaic virus*. *Phytopathology*, 42: 413-416.

Fulton R.W., 1972. Apple Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. CMI/AAB. No. 83. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.

Gazel M., Serçe U.Ç., Yiğit T. ve Çağlayan K., 2011. Malatya'da Yetiştirilen Bazı Elma Çeşitlerindeki Virüslerin RT-PCR ile Saptanması. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, Kahramanmaraş s. 423

Gümüş M., Sipahioglu H.M., Paylan I.C. ve Erkan S., 2007. Optimization of cDNA Amplification of *Apricot latent virus* (ApLV) From Various Plant Tissue Sources. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (6): 936-940.

Hunter J.A., Chemberlain E.E. ve Atkinson J.D., 1958. Note on Transmission of Apple Mosaic by Natural Root Grafting. *Ibıd.,* 1: 80-82.

Iglesias N.G., Gago-Zachert S.P., Robledo G., Costa N., Plata M.I., Vera O., Grau O. ve Semorile L.C., 2008. Population Structure of *Citrus tristeza virus* from Field Argentinean Isolates. *Virus Genes.*, 36 (1): 199-207.

Khan J.A. ve Dijkstra J., 2006. Handbook of Plant Virology. Food Products Press. New York, London, Oxford p: 425.

Kobylko T., Nowak B. ve Urban A., 2005. Incidence of *Apple mosaic virus* (ApMV) on Hazelnut in South-East Poland. *Folia Horticulturae*, 17 (2): 153-161.

Koç G., Fidan H., Baloğlu S. ve Endes A., 2011. Pozantı İlçesindeki Kiraz ve Vişnelerde Bazı Sert Çekirdekli Meyve Virüslerinin Sörveyi. *Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, Kahramanmaraş s: 417.

Korkmaz G., Sipahioğlu M.H. ve Usta M., 2011. Elma Mozaik Virüs (ApMV)'üne Karşı RNA Probu Geliştirerek Virüsün Van ve Malatya İllerinde Elmalardaki Yaygınlığının Moleküler Hibridizasyon Yöntemi ile Araştırılması. Türkiye *IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, s: 421.

Makarski J. ve Agrios G.N. 1973. Respiration, Organic Acid and Sugar Composition of Apple Fruits Collected from Apple Mosaic Virus- or Russet Ring Virus-Infected Trees. *Phytopathology*, 63: 1483-1488.

Mink G.I., 1989. In Virus and Virus Like Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders. Ed. Fridlund P.R. Washington State University, Pullman, 34-39.

Moreno P., Ambrós S., Albiach-Martí M.R., Guerri J. ve Peña L., 2008. *Citrus tristeza virus*: A Pathogen That Changed the Course of the Citrus Industry, *Mol Plant Pathol*., 9 (2): 251-268.

Nagiac B.B. ve Vashisth K.S., 1963. *Apple Mosaic* in Simla Hills. *Indian Pyhtopath*., 16: 354-361.

Nemeth M., 1986. *Virus, Mycoplazma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees* (10th ed). Budapest, Hungary. 838 p.

Öner C., 2002. Genetik Kavramlar (6 th ed.). Ankara Palme Yayıncılık, s: 517,744, 746.

Öztekin V. ve Buzkan N., 2012. Prevalence of Some Stone Fruit Viruses in the Almond Orchard of Kahramanmaras Sutcu Imam University. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 15 (1): 30-33.

Posnette F.A., 1989. Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruit Simulating Noninfections

Disorders. Cooperative Extension. Colloge of Agriculture and Home Economics. Washington State University. Pulman, Washington. p: 330.

Rubio L., Ayllon M.A., Guerri J., Pappu H.R., Niblett C.L. ve Moreno P., 1996. Differentiation of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) Isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the Coat Protein Gene, *Ann. App. Biol.*, 129: 479-489.

Sanchez-Navarro J.A. ve Pallas V., 1997. Evolutionary Relationship in the Ilarviruses Nucleotid Sequence of *Prunus necrotic ringspot virus* RNA-3. *Archieves of Virology*, 14: 749-763.

Sanchez-Navarro J.A., Aparicio F., Herranz M.C., Minafra A., Myrta A. ve Pallas V., 2005. Simultaneous Detection and Identification of Eight Stone Fruit Viruses by One Step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 77-84.

Shiel P.J. ve Berger P.H., 2000. The Complete Nucleotid Sequence of ApMV RNA1 and RNA 2: ApMV is More Closely Related to *Alfalfa mosaic virus* Than to Other Ilarviruses. . *Journal of General Virology*, 81: 273-278.

Sipahioğlu H.M., Demir S., Polat B., Akköprü A. ve Usta M., 2004. Van ve Civarında Yetiştiriciliği Yapılan Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Tespit Edilen Viral ve Fungal Hastalık Etmenleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 14 (2): 133-139.

Sökmen M.A., Yılmaz K.N.D., Mennan H. ve Sevik M.A., 2005. Natural Weed Hosts of *Apple Mosaıc Virus* in Hazelnut Orchards in Turkey. *Journal of Plant Patholog.*, 87 (3): 239-242.

Sutic D.D., Ford R.E. ve Tosic M.T., 1999. *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Uludağ Y., 2007. Batı Akdeniz Bölgesinin Önemli Elma Yetiştiriciliği Yapılan Yörelerinde Bazı Virüs Hastalıklarının ELISA ve RT-PCR Yöntemiyle Tanılanması (Yüksek Lisans Tezi). Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.

Usta M., Sipahioglu H.M., Ocak M. ve Myrta A., 2007. Detection of *Apricot Latent Virus* and *Plum Bark Necrosis Stem Pitting-associated Virus* by RT-PCR in the Eastern Anatolia *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 181-185.

Yardımcı N. ve Çulal H., 2009. Occurrence and Incidence of Prunus Necrotic Ringspot

Virus, Arabis Mosaic Virus and Apple Mosaic Virus on Oil Rose (Rosa damascena) in the Lakes Region of Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37: 95-98.

Yardımcı N. ve Eryiğit H., 2006. Isparta İli Elma Üretim Alanlarında *Apple mosaic virus* (Elma mozaik virüsü; ApMV)'nün Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (2): 185-187.

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1.1. Elma mozaik virüsü genom şeması 3

Şekil 3.1. Elma mozaik virüsü izolatlarının toplandığı Çanakkale ili ve ilçeleri 16

Şekil 3.2. Separating jel hazılanması (A), Stacking jel hazırlanması (B)..... 19

Şekil 3.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması..... 20

Şekil 4.1. Elma mozaik virüsü ile infekteli olmayan elma ağaçları 23

Şekil 4.2. Elma mozaik virüsü ile infekteli ve sağlıklı elma ağacı yapraklarının görünümü (a, b, c, d, e ve f infekteli, g ve h sağlıklı, ok işaretleri mozaik simptomlarını göstermektedir)..... 24

Şekil 4.3. RT-PCR analizi sonuçları. M: Marker (100-1000bp) NK: Negatif kontrol. 13, 38, 44, 45, 47, 48, 49, 53: Elma mozaik virüsü ile infekteli izolatlar..... 28

Şekil 4.4.Western blot analizi sonuçları 29

Şekil 4.5. SSCP analizi sonuçları..... 31

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Esra KUNDAKÇI

Doğum Yeri: Çerkezköy

Doğum Tarihi: 07.01.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Lapseki Ziraat Odası 2010 –

Öz Emek Kırsal Kalkınma ve Tarımsal Danışmanlık LTD. ŞTİ. 2009-2010.

İLETİŞİM

zmesrakundakci@hotmail.com