

## Bazı virüs hastalıklarının ‘Granny Smith’ elma çeşidinde verim ve kaliteye etkisi<sup>1</sup>

**Yusuf ÖZTÜRK<sup>2</sup>**    **Suat KAYMAK<sup>3</sup>**    **Ersin ATAY<sup>2</sup>**  
**Mesut İŞÇİ<sup>2</sup>**    **Hamza ŞENYURT<sup>2</sup>**    **Bayram ÇEVİK<sup>4</sup>**

### ABSTRACT

#### The effect on yield and fruit quality of some virus diseases in ‘Granny Smith’ apple cultivar

In this study, the effect of mix infections of *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV), which are the most common viruses of pome fruits in Turkey and the world, on fruit yield and quality were investigated on apple trees. Statistical analysis of fruit quality and physiological measurements of viruses-infected and non infected trees revealed that fruit firmness in 2010, soluble solid content, pH and acidity in 2011 were statistically significant. This study proved that the effects of viruses on yield and quality of apple trees can be more effectively revealed with single inoculations in the controlled environments.

**Keywords:** DAS-ELISA, orchard, RT-PCR, plant physiology

### ÖZ

Bu çalışmada Türkiye’de ve dünyada yumuşak çekirdekli meyvelerde en yaygın görülen virüslerden Elma mozaik virüsü (ApMV), Elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV), Elma gövde yivlenme virüsü (ASGV) ve Elma gövde çukurlaşma virüslerinin (ASPV) karışık enfeksiyonları sonucu elma ağaçlarında neden oldukları verim ve kaliteye olan etkileri araştırılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda virüslerle enfekteli ağaçlar ile enfekteli olmayan ağaçlar arasında yapılan meyve kalite analizleri ve fizyolojik ölçümlerden 2010 yılında, meyve eti sertliği önemli bulunurken, 2011 yılında da meyve eti sertliği, ŞÇKM, pH ve titre

<sup>1</sup> Bu makale TAGEM tarafından desteklenen TAGEM–BS–09/04–06/02–07 numaralı “Elma Virüs Hastalıklarının ‘Granny Smith’ Elma Çeşidinde Verime ve Kaliteye Olan Etkisi” isimli projenin bir bölümüdür ve özeti Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi Bildiri Özetleri kitabında yayınlanmıştır.

<sup>2</sup> Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Eğirdir, Isparta.

<sup>3</sup> Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yenimahalle, Ankara.

<sup>4</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Isparta

Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: yosuf\_ozturk@hotmail.com

Alınış (Received): 15.05.2015, Kabul Ediliş (Accepted): 22.09.2015

edilebilirlik asitlik açısından önemli bulunmuştur. Bu çalışma virüslerin elma ağaçlarında verim ve kaliteye etkilerinin ancak kontrollü ortamlarda tekli inokulasyonlar yapılarak daha etkili bir şekilde belirlenebileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** DAS-ELISA, RT-PCR, meyve bahçesi, bitki fizyolojisi

## GİRİŞ

Elma, dünya üzerinde çok geniş yayılma alanı gösteren ve değişik ekolojilerde üretimi yapılabilen bir meyve türüdür. Dünya elma üretimi yaklaşık 76 milyon ton civarında gerçekleşmektedir. Türkiye, dünya elma üretiminde 2012 yılı verilerine göre 2.889.000 ton ile üçüncü sırada yer almaktadır (Anonymus 2014).

Türkiye'de elma yetiştiriciliği tüm illerde yapılmakla birlikte son yıllarda göller bölgesinde yoğunlaşmış durumdadır. Ülkemiz elma üretiminin büyük bir kısmı sırasıyla Isparta (634.800 ton), Karaman (388.404 ton) ve Niğde (317.300 ton) illerinde gerçekleştirilmektedir (Anonim 2014).

Yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde fitoplazma ile virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin önemi büyük olup bunların sayısı 40'ın üzerindedir. Virüslerin bir kısmı genel olarak enfekteli bitkilerin yapraklarında klorozlar, nekrozlar ve bitki büyümesinde duraklamaya, meyve verim ve kalitesinde azalmaya sebep olarak ekonomik ömürlerinin azalmasına neden olmaktadır (Nemeth 1986). Bununla birlikte, bu meyve ağaçlarını hastalandıran virüslerden bazıları ticari çeşitlerde gözle görülebilir belirti oluşturmazken, sadece duyarlı konukçularda belirgin belirtiler oluşturmaktadırlar.

Yumuşak çekirdekli meyvelerde üretimi sınırlayan dört önemli virüs bulunmaktadır. Bu virüsler: Elma mozaik virüsü (*Apple mosaic virus*, ApMV), elma klorotik yaprak leke virüsü (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), Elma gövde yivlenme virüsü (*Apple stem grooving virus*, ASGV) ve Elma gövde çukurlaşma virüsüdür (*Apple stem pitting virus*, ASPV) (Mink 1989, Desvignes 1999). ApMV dışındaki diğer üç virüs hastalığı ticari elma ve armut yetiştiriciliğinde çoğunlukla belirti oluşturmamaktadırlar.

Virüsler elma yetiştiriciliği açısından önemli olan bölgelerde hızla yayılabilme özelliğine sahiptir. Özellikle 'Granny Smith' çeşidiyle kurulmuş elma bahçelerinde ApMV yoğun olarak görülmekte olup üreticiler bu hastalıkla mücadele konusunda zorluklar yaşamaktadırlar. Virüs hastalıklarında, hastalık şiddetinin bitkideki virüs yoğunluğuna ve çevre şartlarına bağlı olarak farklılık göstermesi, hastalık belirtilerinin besin noksanlığı ve fizyolojik hastalıklarla karıştırılması, üreticilerin virüs hastalıklarıyla mücadelede gereken önemi vermesini zorlaştırmaktadır. Bu durumda hastalıkla mücadele güçleşmekte, elma yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde virüs hastalıkları hızla yayılmaktadır.

Virüs hastalıklarının bir kısmı doğrudan doğruya meyveye zarar verirken; bir kısmı da, ağacın büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyerek meyve verim ve kalitesini

dolaylı olarak düşürmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada ApMV'nin, ağacın büyümesini % 50, gelişmesini % 20 geriletmekte, meyve verimini de % 30 düşürdüğü bildirilmiştir (Meijneke et al. 1963). Ayrıca Klinkowski (1960)'a göre elma mozaik virüs hastalığının, elma fidanlarının gelişmesini olumsuz yönde etkilediğini bildirmiştir.

Türkiye'de elmada ACLSV, ApMV, ASGV ve ASPV ile yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Akbaş ve İlhan (2005) Orta Anadolu da, Çağlayan ve ark. (2006) Doğu Akdeniz de, Yardımcı ve Eryiğit (2006) Batı Akdeniz de, Korkmaz ve ark. (2013) Doğu Anadolu, Marmara ve Orta Anadolu da, Ertunç ve ark. (2014), Orta Anadolu da, Apmv' nin, Ulubaş ve Ertunç (2005) Doğu Anadolu da ACLSV'nin, Birişik ve ark. (2008) Doğu Akdeniz de ASPV, ASGV, ACLSV ve ApMV' nin varlığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar genelde sürveyler sonucu durum tespiti, yaygınlık ve moleküler karakterizasyon şeklinde sonuçlanmıştır. Ancak ülkemizde hangi virüsün hangi bitkide ne kadar zarar verdiği, bu zararların verim ve kaliteye olan etkisi ve ekonomik analizi ile ilgili veriler henüz yeterince mevcut değildir.

Bu çalışmada; Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonunda bulunan tam verim çağındaki MM.106 anacı üzerine aşılı 'Granny Smith' elma çeşidi ağaçlarında, ApMV, ACLSV, ASPV ve ASGV'nin karışık enfeksiyonlarında verim ve kaliteye olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Araştırma alanı ve bitki materyali**

Bu çalışma 2010 ve 2011 yıllarında Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonunda yürütülmüştür. Araştırma alanı olan bahçe 37° 49' kuzey enlemi, 30° 52' doğu boylamı noktasında ve killi-tınlı bünyede bir toprağa sahiptir. Denemenin bitkisel materyalini 4 x 3 m aralıklarla dikilmiş, MM 106 anacına aşılı ve merkezi lider terbiye sistemi uygulanmış olan tam verim çağındaki 'Granny Smith' elma çeşidine ait ağaçlar oluşturmuştur.

### **Örnek alma**

Örnekler serolojik testlemeler ve nükleik asit izolasyonu için kullanılıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır. Meyve kalite analizleri için ise meyve örnekleri, hasat olumu döneminde alınmıştır.

### **Laboratuvar çalışmaları**

#### **DAS-ELISA testi**

Toplanan tüm örneklerle; ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV virüslerinin varlığını saptamak amacıyla "Double Antibody Sandwich-ELISA" (DAS-ELISA) yöntemi uygulanmıştır (Clark and Adams 1977). Yapılan DAS-ELISA testinde Bioreba firmasından temin edilen poliklonal antiserum içeren ELISA kitleri kullanılmıştır.

Her bir virüs için üretici firmanın önerileri doğrultusunda DAS-ELISA testi yapılmıştır.

### Moleküler çalışmalar

Toplanan örneklerde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV'nin moleküler olarak tespit edilmesinde, DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren bitkiler kullanılmıştır. Bu amaçla, Çizelge 1 'de yer alan ve Biomers firmasından temin edilen her bir virüse spesifik primer çiftleri kullanılmıştır.

Çizelge 1. RT-PCR testlerinde kullanılan primer çiftleri

Virüs	Primer Baz dizisi (5'—3')	Beklenen bant büyüklüğü
ACLSV	F5'-TTCATGGAAAGACAGGGGCAA-3'	677 bç
	R5'-AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA-3' Menzel et al (2002)	
ASPV	F5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3'	264 bç
	R5'-ATAGCCGCCCGGTTAGGTT-3' Jelkman and Keim-Konrad (1997)	
ApMV	F5'-ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA-3'	262 bç
	R5'-GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA-3' Menzel et al (2002)	
ASGV	F5'-GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA-3'	499 bç
	R5'-AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA-3' James (1999)	

### Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu yapılarak söz konusu virüslerin varlığını moleküler olarak doğrulamak amacıyla RT-PCR testi yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonunda Li et al. (2008)'in modifiye ettiği CTAB nükleik asit izolasyon yöntemi ve Qiagen RNeasy Plant Mini Kit kullanılarak 2 farklı yöntem uygulanmıştır.

### Tersine transkripsiyon (RT)

RT çalışmaları Kundu (2002)'ye göre yapılmıştır. Enfekteli bitki dokusundan izole edilen toplam RNA'dan virüslerin kılıf protein genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lar dan revers transkriptaz enziminin sağlandığı firmanın (MBI Fermentas) önerilerine göre komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla 5 µl total RNA, 1µl 200 pmol random primer eppendorf tüp içine konularak distile su ile 12µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 65 °C 5 dk inkübasyondan sonra hemen buza alınarak 5dk bekletilmiş ve RNA'ların denatürasyonu sağlanmıştır. Denatürasyonu yapılan RNA'lara ayrı bir tüpte son hacmi 20 µl olacak şekilde 4 µl 5x reaksiyon tamponu (250mM Tris-HCl pH 8.3, 250mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 2 µl 10mM dNTP karışımı (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 U RNase inhibitörü, 20 U RevertAid Reverse transkriptaz

eklenerek RT karışımı hazırlanmıştır. PCR makinesi 25°C 5 dk, 42°C 60 dk, 70°C 5dk ve 4°C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır.

### **Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)**

PCR çalışmaları Kundu (2002)'ye göre yapılmıştır. PCR tüplerine 2.5 µl cDNA, her bir virüse spesifik 20 pmol primer çifti 0,5 mM dNTP'ler, 1X reaksiyon tamponu (50 Mm KCL, 10 mM Tris HCL 25 °C Ph 9., 0,1 %Trilton X-100 ), 2.5 ünite Ex Taq DNA polimeraz enzimi içeren ve su ile 25µl'ye tamamlanan PCR karışımı hazırlanmıştır. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır. Test edilecek her bir virüs için spesifik olan program uygulanmıştır. Buna göre, ACLSV ve ApMV için PCR karışımı 94°C 2dk, 34 defa tekrarlanan 94°C 30 s 62°C' de 30 s ve 72°C 1dk dan sonra 72°C'de 10dk ve 4°C. ASPV için PCR karışımı 94°C 2dk, 35 defa tekrarlanan 94°C 45 s 55°C' de 1dk ve 72°C 1dk dan sonra 72°C'de 10dk ve 4°C. ASGV için PCR karışımı 94°C 2dk, 35 defa tekrarlanan 94°C 30s 55°C' de 45s ve 72°C 1dk dan sonra 72°C'de 10dk ve 4°C bekleyecek şekilde programlanan PCR cihazına konularak istenilen bölgenin çoğaltılması sağlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri %1 agarose jeline yüklenerek, elektroforez yöntemi kullanılarak, büyüklük markörleriyle birlikte ayrıştırılmıştır. Elektroforez 1XTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 2.5µl yükleme boyası (6X; 15ml için 150mg bromophenol blue, 18gr gliserol, 6ml 50XTAE) ile birlikte 10µl yüklenen RT-PCR ürünleri, 100V'da 30dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. PCR ürünleri Etidium bromid ile boyandıktan sonra jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

### **Verim ve meyve kalite kriterleri**

Meyve kalitesi ölçüm ve analizleri tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü yapılmıştır. Fiziksel analizlerde (ortalama meyve ağırlığı, meyve eni, meyve eti sertliği) her tekerrür için 10 adet meyve (her uygulama için toplam 30 adet meyve) ölçülmüş, kimyasal analizlerde (SÇKM, meyve suyu pH'sı, asitlik) ise her tekerrürden alınan 1 adet örnek (her uygulama için toplam 3 analiz) kullanılmıştır. Meyve kalite analizleri Atay et al. (2010)'a göre yapılmıştır. Ağaç başı verim değerleri kg/ağaç olarak her tekerrürde bulunan 1 adet ağaçtan (her uygulama için toplam 3 ağaç) elde edilmiştir.

### **Yaprak analizleri**

Deneme ağaçlarından, çiçeklenmeden 8-12 hafta sonra alınan yapraklarda makro ve mikro besin elementleri analizleri Ryan et al. (2001)'e göre yapılmıştır.

### **İstatistiksel analizler**

Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her tekerrürde 1 adet ağaç yer almıştır. Elde edilen veriler SAS-JMP 7.0 paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve aralarında farklılık bulunan

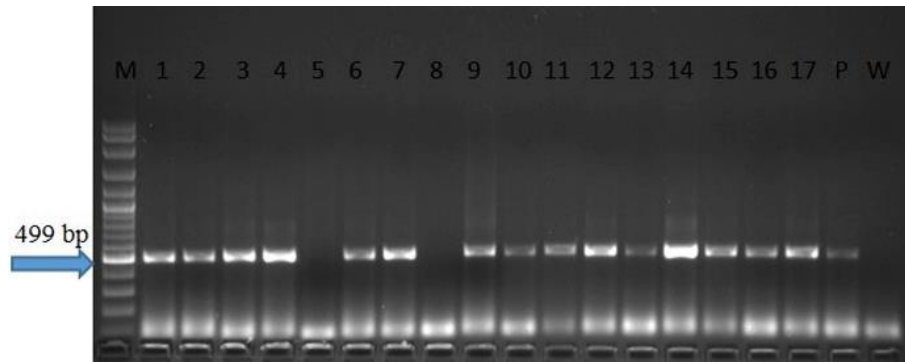
ortalamalar LSD (Least Significant Difference) çoklu karşılaştırma testi ile gruplandırılmıştır (Çalhan ve ark. 2012).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

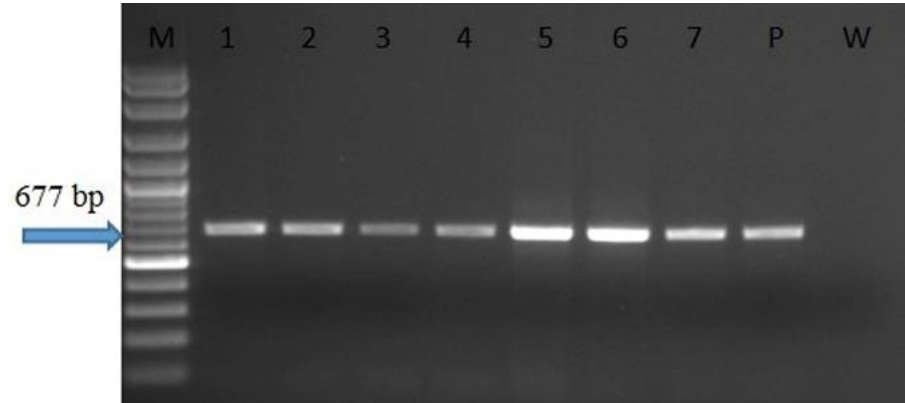
### Elma bahçesinde virüs enfeksiyonunun DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle belirlenmesi

Elma bahçesinde ApMV, ACLSV, ASGV ve ASPV'nin varlığını saptamak amacıyla yapılan çalışmada, 58 örnek 2010 yılında DAS-ELISA ve RT-PCR, 2011 yılında ise 58 örnek sadece RT-PCR ile test edilmiştir.

2010 yılında yapılan DAS-ELISA testinde 4 örnekte ApMV, 16 örnekte ACLSV ve 2 örnekte de ASPV tekli enfeksiyon olarak tespit edilmiştir. 2011 yılında yapılan RT-PCR testinin sonuçlarına göre ise hiçbir ağaçta tekli enfeksiyon tespit edilememiş ağaçların çoğu farklı virüsle enfekteli bulunmuştur (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. ASGV'ye ait RT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü M:Markör, 1-2-3-4-6-7-9-10-11-12-13-14-15-16-17: Pozitif örnekler, 5-8: Negatif örnekler, P: Pozitif kontrol, W:Negatif kontrol (su).



Şekil 2. ACLSV'ye ait RT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü M:Markör, 1-2-3-4-5-6-7: Pozitif örnekler, P: Pozitif kontrol, W:Negatif kontrol (su).

2011 yılında yapılan RT-PCR test çalışmaları sonucunda virüslerin karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir. En sık görülen virüs ASGV+ASPV+ACLSV karışık enfeksiyonu olurken bunu ASGV+ACLSV+ASPV+ApMV takip etmiştir. Verim denemelerinde sağlıklı kontrol olarak kullanabilecek sadece 2 ağaç belirlenebilmiştir. Buna göre dört virüsten hiçbiri tek başına hiçbir örnekte bulunmazken, virüslerin çoğu iki ve daha fazla virüsün karışık enfeksiyon halinde bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2. 2010-2011 yılında yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonuçları

Tespit Edilen Virüs	DAS-ELISA	RT-PCR
	2010	2011
ApMV	4	
ASGV		
ACLSV	16	
ASPV	2	
ASGV+ASPV		2
ASGV+ACLSV	1	8
ApMV+ASGV		
ASPV+ACLSV		2
ApMV+ACLSV	12	
ApMV+ASPV		2
ASPV+ASGV+ACLSV	1	18
ApMV+ASGV+ASPV		
ApMV+ASGV+ACLSV		9
ApMV+ASPV+ACLSV	10	2
ApMV+ASGV+ASPV+ACLSV	4	13
Toplam virüslü	50	57
KONTROL	8	2
TOPLAM	58	58
Enfeksiyon oranı(%)	86	98,2

ACLSV, ASPV, ASGV ve ApMV'nin tespitinde DAS-ELISA yönteminin bazı olumsuzluklarına rağmen kullanılabilineceğini göstermiş ancak RT-PCR'in daha güvenilir ve etkili olduğu belirlenmiştir. DAS-ELISA testinde tespit edilemeyen virüsler aynı örnekte RT-PCR testi yapıldığında pozitif bulunmuştur. Dal Zotto and Nome (1999) ve Torrance (1981), serolojik kökenli bir test olan ELISA'nın güvenilirliği ve kullanımının bazı sınırlamalara bağlı olduğunu, özellikle odunsu bitkilerde, düşük virüs konsantrasyonu ile virüsün ağaçtaki heterojen dağılımı gibi unsurlar dikkate alındığında bu yöntemin mevsimsel olarak yanlış sonuçlar vermesini mümkün kılabilirdiğini belirtmişlerdir. Park et al. (2006), tarafından yapılan ASGV ve ACLSV için ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada RT-PCR sonuçlarının genel olarak ELISA sonuçlarından iki kat daha fazla pozitif verdiği rapor edilmiştir. Birişik (2009), ASPV ve ASGV virüslerinin teşhisinde RT-PCR testinin tercih edilmesini belirtmiştir. Ayrıca RT-PCR' in sürvey çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı olan ELISA'ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı olduğu

belirlenmiştir (Vunsh et al. 1991; Rowhani et al. 1995). Bu yüzden daha duyarlı ve güvenilir teknik olarak bilinen ve özellikle de mevsime bağlı farklı virüs konsantrasyonlarından az etkilenen PCR sayesinde ELISA'da yaşanan birçok problem ortadan kalkmıştır (Smith et al. 1998). Bu sonuçlar verim ve kalite üzerine virüslerin etkilerinin araştırmaya başlanmadan önce seçilecek ağaçların virüsle bulaşık olup olmadıklarının sadece ELISA ile yapılmasının yeterli olmadığı daha hassas bir yöntem olan RT-PCR kullanılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Çağlayan et al. (2006), Türkiye'nin önemli elma yetiştiricilik alanlarından 174 örnek toplamış ve bu örneklerin 126 tanesinin ApMV, ACLSV, ASPV veya ASGV ile enfekteli olduğunu ve özellikle ACLSV/ASPV karışık enfeksiyon oranının %84 gibi oldukça yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Uludağ (2007)'nin yaptığı başka bir araştırmada da, Eğirdir ilçesinden alınan örneklerde ApMV, ASGV ve ACLSV test edilmiş ve enfeksiyon oranını %67 olarak bulmuştur. ELISA testi sonucunda örneklerin daha çok ACLSV ile enfekteli olduğu ve bunu sırasıyla ASGV ve ApMV'nin izlediği görülmüştür. Yapılan RT-PCR sonuçlarında da bu bahçelerdeki genel enfeksiyon oranını ise %97 olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular literatür bilgileriyle örtüşmekte olup bu virüslerin elma bahçelerinde yaygın olarak bulunduğunu teyit etmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar ve bu çalışmanın sonuçları doğal bir ortamda tekli enfeksiyon bulmanın zor olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan arazi gözlemlerinde tespit edilen dört virüsten sadece ApMV'e ait belirtiler görülmüş (Şekil 1) ancak ACLSV, ASPV ve ASGV'e ait tipik belirleyici belirtiler gözlenmemiştir. Bunun nedeninin de; bitkide şiddetli ırkların yerine, zayıf ırkların bulunmasından dolayı çapraz koruma oluşturması veya virüslerin belirti vermeden latent olarak kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Birişik (2009), ASPV ve ASGV'nin ayva ve armutta daha belirgin belirtiler verirken elmada daha az belirti oluşturduğu ve bu virüslerin genelde latent olarak kaldığını belirtmiştir. ApMV bulaşmış yapraklarda genellikle sarımsı beyaz lekeler yanında mozaik belirtileri ile birlikte küçük sarı lekeler de olduğu görülmüştür (Şekil 3). Gözlemlenen bu belirtiler daha önceki çalışmalarda farklı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Özkan ve Kurçman 1976).





Şekil 3. ApMV' nin 'Granny Smith' deki belirtileri.

### Meyve kalite analizleri

2010 ve 2011 yılında aynı sonuçları veren virüs kombinasyonları dikkate alınarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

2010 yılında yapılan meyve kalite analizlerden ağaç başı verim, meyve eti sertliği, SÇKM, pH, meyve ağırlığı, meyve eni, ve titre edilebilir asitlik analizleri sonucunda virüsler arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edilirken, meyve eni sertliği açısından ise ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 3).

Buna göre ağaç başı verim en yüksek tek başına ASGV+ACLSV ile bulaşık ağaçlarda (60.21 kg/ağaç) tespit edilirken en düşük ASGV+ASPV+ACLSV (40.96 kg/ağaç) karışık enfeksiyonunda bulunmuştur. Kontroldeki ağaç başı verim ise 42.34 kg olarak belirlenmiştir. Meyve ağırlığı incelendiğinde en yüksek değerin 189.71 g ile ASGV+ACLSV+ApMV virüsü ile bulaşık olan ağaçlarda olurken, en düşük ağırlık 175.84 g ile ASGV+ACLSV+ASPV+ApMV kombinasyonu oluşturmuştur. Meyve eni sonuçları incelendiğinde ASGV+ASPV karışık enfeksiyonu 76.65 mm ile en yüksek, ASGV+ApMV+ACLSV+ASPV karışık enfeksiyonu 74.24 mm ile en düşük oranlarda bulunmuştur. Meyve eti sertliği açısından ise ASGV+ACLSV+ApMV karışık enfeksiyonu diğer virüslerden en yüksek değere

sahipken, kontrolü oluşturan sağlıklı ağaçlar en düşük sertliğe sahip olmuş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Suda çözünebilir kuru madde (SÇKM) miktarı açısından en yüksek ASGV+ACLSV olurken, en düşük ASGV+ACLSV+ApMV üçlü enfeksiyonu tespit edilmiştir. pH değeri en yüksek virüs kombinasyonu ASGV+ACLSV+ApMV, ASGV+ASPV+ACLSV+ApMV dördü enfeksiyonu ise en düşük pH değerine sahip olmuştur. Titre edilebilir asitlik değerleri ölçüldüğünde ASGV+ASPV+ACLSV en yüksek, ASGV+ACLSV ise en düşük değere sahip olmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. 2010 yılında yapılan meyve kalite analizleri

Uygulama	Ağaç Başı Verim (kg/ağaç)	Meyve Ağırlığı (g)	Meyve Eni (mm)	Meyve Eti Sertliği (kg)	Sçkm (%)	pH	TEA (%)
Kontrol	42.34	183.68	74.95	6.54 c	10.67	2.98	0.8
ASGV+ASPV	48.00	188.77	76.65	7 ab	10.7	2.96	0.63
ASGV+ACLSV	60.21	189.02	76.14	7.08 ab	11.1	2.98	0.54
ASGV+ASPV+ACLSV	40.96	188.3	75.05	6.76 bc	10.4	3.00	0.86
ASGV+ACLSV+ApMV	46.18	189.71	76.53	7.29 a	9.67	3.04	0.58
ASGV+ASPV+ACLSV+ApMV	56.29	175.84	74.24	6.95 ab	10.57	2.9	0.63

2011 yılında, ağaç başı verim, meyve ağırlığı ve meyve eni sonuçları farklı virüsler ile bulaşık ağaçlar arasında istatistik olarak fark yaratmamıştır. Bununla birlikte SÇKM, pH, meyve eti sertliği ve titre edilebilir asitlik açısından ise ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4).

Çizelge 4. 2011 yılında yapılan meyve kalite analizleri

Uygulama	Ağaç Başı Verim (kg/ağaç)	Meyve Ağırlığı (g)	Meyve Eni (mm)	Meyve Eti Sertliği (kg)	SÇKM (%)	pH	TEA (%)
Kontrol	32.37	223.15	78.64	8.72 a	12.86 c	3.01 c	0.78 a
ASGV+ASPV	38.31	218.25	78.93	8.15 b	13.13 bc	3.12 a	0.52 b
ASGV+ACLSV	43.54	197.49	75.93	8.05 b	13.46 a	3.06 abc	0.72 a
ASGV+ASPV+ACLSV	31.33	211.4	76.44	8.27 b	13.00 bc	3.08 ab	0.72 a
ASGV+ACLSV+ApMV	35.6	209.82	77.94	8.11 b	13.23 ab	3.03 bc	0.71 a
ASGV+ASPV+ACLSV+ApMV	32.32	200.42	76.7	8.10 b	13.33 ab	3.04 c	0.73 a

2011 yılında ağaç başı verim en yüksek ASGV+ACLSV (43.54 kg/ağaç)'de tespit edilirken en düşük ASGV+ASPV+ACLSV (31.33 kg/ağaç) karışık enfeksiyonunda bulunmuştur. Kontroldeki ağaç başı verim ise 32.37 kg olarak belirlenmiştir. Meyve ağırlığı incelendiğinde en yüksek değer 223.15 g ile kontrol de olurken, en düşük ağırlığa sahip virüs kombinasyonu ASGV+ACLSV karışık enfeksiyonu 197.49 g ile

belirlenmiştir. Meyve eni sonuçları incelendiğinde ASGV+ASPV karışık enfeksiyonu 78.93 mm ile en yüksek. ASGV+ACLSV karışık enfeksiyonu 75.93 mm ile en düşük oranlarda bulunmuştur. Meyve eti sertliği açısından ise kontrol diğer virüslerden en yüksek değere sahipken (8.72). ASGV+ACLSV en düşük sertliğe (8.05) sahip olmuşlardır. Suda çözünebilir kuru madde (SÇKM) miktarı açısından en yüksek ASGV+ACLSV olurken en düşük kontrol de tespit edilmiştir. pH değeri en yüksek virüs kombinasyonu ASGV+ASPV çıkmıştır. Kontrol ağacı ise en düşük pH değerlerine sahip olmuştur. Titre edilebilir asitlik değerleri ölçüldüğünde kontrol en yüksek olurken ASGV+ASPV ise en düşük değere sahip olmuştur (Çizelge 4).

Meydana gelen farklılıkların, virüslerden ziyade ağaç başına düşen ürün yükünden kaynaklandığını düşünülmektedir. Nitekim birim gövde kesit alanına düşen ürün yükü azaldıkça en, boy, ağırlık gibi kriterler tarafından belirlenen meyve iriliği artmakta ve buna bağlı olarak bazı kalite kriterleri değişmektedir (Karaçalı 2009).

Kontroldeki ağaçların ağaç başı verim, meyve ağırlığı ve meyve eni gibi verilerin daha yüksek olması beklenirken genelde ikili ve üçlü enfeksiyonların daha yüksek olduğu, aralarında düzenli bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir. Minoiu et al (1986), ASPV ile enfekteli armut ağaçlarında sağlıklı bitkilere oranla %13.4 ile %69.7 arasında değişen büyüme geriliğini tespit etmişlerdir. Penrose et al. (1988), üç farklı elma çeşidini virüsler açısından test etmişlerdir. Çalışma sonucunda 'Jonathan' elma çeşidinde %56, 'Granny Smith' çeşidinde %41 ve 'Richared Delicious' çeşidinde ise %40 verim kaybı olduğu rapor edilmiştir.

Ancak bu çalışmada virüs enfeksiyonlarının bitki büyüme ve gelişmesine yada verim ve kaliteye etkisi yukarıda verilen literatür sonuçları kadar belirgin olmamıştır. Sağlıklı kontrol bitki sayısının az olması ve çalışmanın sadece iki yıllık verilerle sınırlı olmasının bunun nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bitkilerin virüsle enfekte olma dönemi ve süreleri de enfeksiyonların bitki büyüme gelişme yanında verim ve kaliteye etkili olabilmektedir. Söz konusu zayıf ırklar ve çapraz koruma olasılığı karışık enfeksiyonlu ağaçların verim ve kalite bakımından sağlıklı kontrol ağaçlarıyla aynı ve hatta daha iyi sonuçlar vermesine neden olmuş olabilmektedir.

### **Makro ve mikro besin analizleri**

2011 yılında virüs kombinasyonlarına makro-mikro besin analizleri hesaplanmış, elde edilen bulgulara göre sonuçlar arasında istatistiki olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. 2011 yılında yapılan makro-mikro analizler

Uygulama	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	B
Kontrol	2,35	0,17	1,25	0,75	0,28	55,69	12,06	19,15	13,5	35,3
ASGV+ASPV	2,61	0,19	1,53	0,73	0,25	55,19	11,01	20,87	10,9	31,8
ASGV+ACLSV	2,28	0,17	1,22	0,76	0,21	55,81	10,54	16,51	12,0	33,8
ASGV+ASPV +ACLSV	2,25	0,2	1,57	0,81	0,28	53,57	13,74	19,87	12,4	43,8
ASGV+ACLSV +ApMV	2,42	0,17	1,31	0,74	0,26	55,37	10,11	17,36	11,0	32,9
ASGV+ASPV+ ACLSV+ApMV	2,31	0,18	1,25	0,8	0,23	49,31	9,14	19,23	10,9	31,5

Yapılan çalışma sonucunda erken ilkbahar döneminde ACLSV, ASPV, ASGV ve ApMV'nin tespitinde DAS-ELISA yönteminin bazı olumsuzluklarına rağmen kullanılabilineceğini göstermiş ancak RT-PCR'ın daha güvenilir ve etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar verim ve kalite üzerine virüslerin etkilerinin araştırmaya başlanmadan önce seçilecek ağaçların virüsle bulaşık olup olmadıklarının sadece ELISA ile yapılmasının yeterli olmadığı daha hassas bir yöntem olan RT-PCR kullanılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Nükleik asit izolasyonunda kullanılan CTAB nükleik asit izolasyon yönteminin elmalarda ve belirtilen virüslerin tespitinde de rahatlıkla kullanılabilineceğini göstermiştir.

Meyve ağaçlarında verim ve kaliteyi etkileyen pek çok çevresel ve yetiştiricilik faktörünün olması, virüslerin etkisini tespit edilmesini zorlaştırmıştır. Virüslerin verim ve kaliteye etkileriyle ilgili yapılacak çalışmaların, fidan döneminden itibaren bulaştırılacak virüslerin gözlenmesine dayanarak planlanmasıyla elde edilecek sonuçların daha güvenilir olacağı belirlenmiştir. Virüs hastalıklarının etkilerinin belirlenmesinde, ancak meyve ağaçlarındaki verim ve kalite kriterlerindeki değişikliklerin uzun yıllar etkileri belirlenerek daha net ortaya konulabilecektir.

### KAYNAKLAR

- Akbaş B. and İlhan D. 2005. Widespread Distribution of Apple mosaic virus on Apple in Turkey, *Plant Disease*, 89:1010
- Anonim 2014. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 02.10.2014).
- Anonymous 2014. <http://faostat.fao.org> (Erişim tarihi: 02.10.2014).
- Atay E., Pırlak L. and Atay A. N. 2010. Determination of fruit growth in some apple varieties. *Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences*, 16: 1-8.
- Birişik N. 2009. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında gövde zararlanmalarına neden olan viral etmenlerin biyolojik serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 179 s.

- BiriŖik N., Myrta A., Hassan M. and Balođlu S. 2008. A preliminary account on apple viruses in Mediterranean region of Turkey, *Acta Horticulturae*, 781:125-130.
- Clark M. F. and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- ađlayan K., Serçe . U., Gazel M. and Jelkman W. 2006. Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assay in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 30: 241-246.
- alhan ., Eren İ., Onursal C. E. and Güneyli A. 2012. Granny Smith Elma eŖidinin Dinamik Kontrollü Atmosferde (DKA) Depolanması. V. Bahe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu, 18-21 Eylül 2012, İzmir, 145-152.
- Dal Zotto A. and Nome S. F. 1999. Fluctuations of Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) at Various Phenological Stages in Peach Cultivars. *Plant Disease*, 83: 1055-1057.
- Desvignes C. J. 1999. *Virus Diseases of Fruit Trees*. Citfl, Paris, 202 p.
- Ertunç F., Topaya Ŗ. and Sezer A. 2014. Distribution and molecular detection of ApMV in apple and hazelnut in Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 5: 3144-3149.
- James D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *Journal of Virological Method*, 83: 1-9.
- Jelkman W. and Keim-Konrad R. 1997. Immuno captive polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for detection of apple stem pitting virus. *Journal of Phytopathology*, 145: 499-503.
- Karaalı İ. 2009. Bahe Ürünlerinin Muhafazası ve Pazarlaması. Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 486 s.
- Klinkowski M. 1960. *Pflanzliche Virologie. Band II*. Akademic Verlag, Berlin, 279 p.
- Korkmaz G., Sipahiođlu H. M. and 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 Forestry*, 37: 711-718.
- Kundu 2002. The application of RT-PCR Assay for the Detection of Apple Stem Pitting Virus and Apple Stem Grooving Virus in Four Apple Cultivars, *Plant Protection Science*, 38:13-17.
- Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J. and Kinard G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154: 48-55.
- Meijneke R. A. C., Posnette A. F. and Schuch K. 1963. The economic importance of virus diseases of apples and pears. In: Posnette A. F. (ed). *Virus Diseases of apples and pears*, pp.1-4. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal Bucks, England.
- Menzel W., Jelkman W. and Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81-92.

- Mink G. I. 1989. Apple chlorotic leaf spot. In: Fridlund P. R. (ed). *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders* Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, pp.34-39. Washington State University, Pulman.
- Minoiu N., Vladianu D., Pattantus K., Cracium C., Cracium V., Parnia P. and Stirban M. 1986. Investigations on pear vein yellows in nursery. *Acta Horticulturae*, 193: 77-82.
- Nemeth M. 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands and Akademi Kiado, Hungary, 838 p.
- Özkan M. ve Kurçman S. 1976. Orta Anadolu elma bahçelerinde görülen virüs hastalıkları. *Bitki Koruma Bülteni*, 16(2): 106-115.
- Park H., Yoon J., Kim H. and Baek K. 2006. Multiplex RT-PCR Assay for the Detection of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus in Infected Korean Apple Cultivars. *Plant Pathology Journal*, 22: 168-173.
- Penrose L. J., Davis K.C. and Valentine B. J. 1988. Comparative performance of three apple clones derived from a virus-tested scheme with clones infected with latent viruses and a mycoplasma. *Scientia Horticulturae*, 36: 55-65.
- Rowhani A., Maningas M.A., Lile L.S., Daubert S.D. and Galino D.A. 1995. Development of a detection system for viruses of wood plants based on PCR analysis of immobilized virions, *Phytopathology*, 85: 347-352.
- Ryan J. G. and Estafan Raşid A. 2001. *Soil and Plant Analysis Laboratory Manuel*. 2 nd. Ed. ICARDA and NARS. Aleppo, Syria, 172 p.
- Smith I. M., Dunez J., Philips D. H., Lelliot R. A. and Archer S. A. 1998. *European Handbook of Plant Diseases*, Blackwell Scientific Publ., 583p.
- Torrance L. 1981. Use of Forced Buds to Extend the Period of Serological Testing in Surveys for Fruit Tree Viruses. *Plant Pathology*, 30: 213-216.
- Ulubaş Ç. and Ertunç F. 2005. Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) Status in Turkey and Sensitive Detection Using Advanced Techniques, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29: 251-257.
- Uludağ Y. 2007. Batı Akdeniz Bölgesi'nin önemli elma yetiştiriciliği yapılan yörelerinde bazı virüs hastalıklarının ELISA ve RT-PCR yöntemiyle tanınması. Yüksek lisans tezi, M. K. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya, 56 s.
- Vunsh R.A., Roster A. and Stein A. 1991. Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction, *Annals of Applied Biology*, 119: 289-294.
- 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, 10:185-187.