



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADİYAMAN İLİ BADEM AĞAÇLARINDA ÖNEMLİ PRUNUS
VİRÜSLERİNİN DAS-ELISA ve RT-PCR ANALİZLERİ ile SAPTANMASI
ve KARAKTERİZASYONU**

SADIK AKGÜL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
EYLÜL - 2020



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADİYAMAN İLİ BADEM AĞAÇLARINDA ÖNEMLİ PRUNUS
VİRÜSLERİNİN DAS-ELISA ve RT-PCR ANALİZLERİ ile SAPTANMASI
ve KARAKTERİZASYONU**

SADIK AKGÜL
ORCID:0000-0003-3192-3994

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Mona GAZEL
ORCID: 0000-0001-7162-0336

HATAY
EYLÜL - 2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADİYAMAN İLİ BADEM AĞAÇLARINDA ÖNEMLİ PRUNUS
VİRÜSLERİNİN DAS-ELISA ve RT-PCR ANALİZLERİ ile SAPTANMASI ve
KARAKTERİZASYONU**

Sadık AKGÜL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Mona GAZEL danışmanlığında hazırlanan bu tez **11/09/2020** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mona GAZEL
Başkan

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Üye

Doç. Dr. Eminur ELÇİ
Üye

Kod No:

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: **18.YL.090**

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

11/09/2020

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Sadık AKGÜL

ÖZET

ADİYAMAN İLİ BADEM AĞAÇLARINDA ÖNEMLİ PRUNUS VİRÜSLERİNİN DAS-ELISA ve RT-PCR ANALİZLERİ ile SAPTANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Dünyada ve ülkemizde ekonomik önemi yıldan yıla artan badem ağaçlarında ekonomik kayıplara yol açan virüsler içerisinde elma mozaik virüsü (ApMV), prunus nekrotik halkalı leke virüsü (PNRSV), erik cücelik virüsü (PDV) şarka virüsü (PPV) ve elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV) en yaygın görülenlerdir. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmakta ve üretim de teşvik edilmektedir. Bu çalışma kapsamında Adıyaman ilinde badem bahçelerinde ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV ve PPV'nin varlığı Double Antibody Sandwich–Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) ve Ters Traskripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleri ile araştırılmış, belirlenen bazı izolatların biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Badem ağaçlarında görülen bu 5 virüsün varlığını belirlemek amacıyla yapılan DAS-ELISA testleri sonucunda 34 tane örnek PDV ile enfekteli bulunmuş ancak ACLSV, ApMV, PNRSV ve PPV tespit edilememiştir. RT-PCR analizleri ile testlenen 110 badem örneğinde sadece PDV'üne ait beklenen uzunluktaki (756 bp) DNA fragmenti 34 örnekte çoğaltılırken, testlenen örneklerde yine ApMV, ACLSV, PNRSV ve PPV saptanamamıştır. Testlenen badem örneklerinin PDV ile enfeksiyon oranı %30.90 olarak saptanmıştır. RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan PDV izolatları doğrudan dizilenerek nükleotid ve kodladıkları amino asit dizileri analiz edilerek Adıyaman'dan elde edilen PDV izolatlarının birbirleriyle ve Gen Bankasına kayıtlı diğer ülkelerin izolatlarıyla karşılaştırması yapılmış ve benzerlik oranları ile filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. PDV izolatlarına ait NJ (Neighbor Joining) dendogramı incelendiğinde Adıyaman PDV badem izolatlarının birbirine çok benzediği ve filogenetik ağaçta aynı grup içinde yer aldığı, gen bankasına kayıtlı diğer PDV izolatlarından ayrı bir grupta kümelendiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile PDV ilk kez Adıyaman ili badem plantasyonlarında saptanmıştır.

2020, 46 sayfa

Anahtar Kelimeler: Adıyaman, badem, DAS-ELISA, RT-PCR, sekans analizi, virüs

ABSTRACT

DETECTION and CHARACTERIZATION by DAS-ELISA and RT-PCR ANALYSIS of IMPORTANT PRUNUS VIRUSES on ALMOND TREES GROWING in ADIYAMAN PROVINCE of TURKEY

There are viral diseases causing economic losses on almond trees whose economic importance is increasing by year in the world and also in our country. Among these viruses, apple mosaic virus (ApMV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (PPV) and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) are the most common viruses. Although commercial almond cultivation is a new product for Adiyaman province, the number of enclosed orchards is increasing day by day and its production is also encouraged. Within the scope of this study, the presence of ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV and PPV on almond orchards in Adiyaman province were investigated by Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA), Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis and molecular characterization of some isolates has been made. As a result of the DAS-ELISA tests performed to determine the presence of these 5 viruses seen in almond trees, 34 samples were found to be infected with PDV and ACLSV, ApMV, PNRSV and PPV were never found in tested samples. In 110 almond samples tested with RT-PCR analysis, only the expected length (756 bp) DNA fragment of PDV was replicated in 34 samples, while ApMV, ACLSV, PNRSV and PPV were not detected in the tested samples. The infection rate of PDV in tested almond samples was found to be 30.90%. PDV isolates amplified by RT-PCR method were directly sequenced and nucleotide and amino acid sequences they encoded were analyzed, PDV isolates obtained from Adiyaman with each other and with different countries isolates deposited in Gen Bank were compared and their similarity rates and phylogenetic relationships were revealed. When the NJ (Neighbor Joining) dendrogram of PDV isolates was examined, it was determined that Adiyaman PDV almond isolates were very similar to each other and included in the same group in the phylogenetic tree, clustered in a separate group from other PDV isolates registered in the gene bank. PDV was detected for the first time in almond plantations in Adiyaman province by this study.

2020, 46 pages

Key Words: Adiyaman, almond, DAS-ELISA, RT-PCR, sequencing, virus

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırmanın yapılmasında ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarımda yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Yüksek Ziraat Müh. Bahar TUNÇ'a çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan canım aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Dünyada Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıkları Konusunda Yapılan Çalışmalar ..	7
2.2. ..Ülkemizde Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıkları Konusunda Yapılan Çalışmalar	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem	13
3.2.1. Arazi Çalışmaları ve Örneklem	13
3.2.2. DAS-ELISA Testlemeleri.....	13
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	15
3.2.3.1. Badem örneklerinden Total Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu	15
3.2.3.2. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri.....	16
3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Analizi	18
3.2.3.4. DNA Dizileme, Blast ve Filogenetik Analizler	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	19
4.1. Arazi Çalışmaları.....	19
4.3. Moleküler Çalışmalar	24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	42
EKLER.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen damar bantlaşması ve halkalı leke belirtileri	20
Şekil 4.2. Adıyaman ilinde halkalı leke ve şiddetli mozaik belirtilerinin gözlemlendiği badem ağaçları.....	20
Şekil 4.3. Adıyaman ilinde badem ağaçlarında gözlenen sararma belirtileri	21
Şekil 4.4. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen kurumalar	21
Şekil 4.5. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen damar bantlaşması belirtileri.....	22
Şekil 4.6. Adıyaman ilinde damar bantlaşması belirtilerinin gözlemlendiği badem yaprakları.....	22
Şekil 4.7. Adıyaman ilinde mozaik lekelerin gözlemlendiği badem yaprakları	23
Şekil 4.8. Rott ve Jelkmann (2001)'in yöntemi kullanılarak Adıyaman ilinden toplanan 73 numaralı badem bitkisinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD).	25
Şekil 4.9. Rott ve Jelkmann (2001)'in yöntemi kullanılarak Adıyaman ilinden toplanan 101 numaralı badem bitkisinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD).	25
Şekil 4.10. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PD3-331F/PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 22, 23, 38, 39, 24, 25, 47, 50, 51, 52, 56, 58, 65, 70, 71, 73, 78, 85, 90, 91, 92, 93, 97, 99, 100: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.	26
Şekil 4.11. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)'ünün tespiti için a/b primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.	27
Şekil 4.12. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde apple mosaic virus (ApMV)'ünün tespiti için Ap1/Ap2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.	27
Şekil 4.13. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)'ünün tespiti için sense/antisense primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.	28
Şekil 4.14. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde plum pox virus (PPV)'ünün tespiti için P1/PM primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.	28
Şekil 4.15. 23 nolu PDV badem izolatının NCBI'da yapılan BLAST analizi sonucu....	30
Şekil 4.16. Bademlerden elde edilen PDV izolatlarının aminoasit dizilerinin karşılaştırmaları	31

Şekil 4.17. Bademlerden elde edilen PDV izolatlarının nükleotid dizilerinin çoklu karşılaştırmaları.....	32
Şekil 4.18. Geneious Prime software programında oluşturulan prune dwarf virus izolatlarına ait nükleotid dizi benzerlik analiz tablosu.....	33
Şekil 4.19. Adıyaman ilinde badem ağaçlarından elde edilen PDV izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı PDV izolatlarının nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve % 50' nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını (0.02) göstermektedir.	34



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ülkemizde ve Adıyaman ilinde 2015-2019 yılları arası badem üretim miktarı (ton) ve meyve veren yaşıta ağaç sayısı (Anonim, 2019).....	4
Çizelge 3.1. Badem örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri	17



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
Ha	: Hektar
mg	: miligram
g	: gram
mL	: mililitre
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)
da	: Dekar
ss	: Single stranded
nm	: Nanometre

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
PNRSV	: Prunus necrotic ringspot virus
ACLSV	: Apple chlorotic leaf spot virus
ApMV	: Apple chlorotic leaf spot virus
PDV	: Prune dwarf virus,
PPV	: Plum pox virus
CLRV	: Cherry leaf roll virus
SLRSV	: Strawberry latent ringspot virus
TBRV	: Tomato black ring virus
RpRSV	: Raspberry ringspot virus
ArMV	: Arabis mosaic virus
ToRSV	: Tobacco ringspot virus
RT	: Reverse Transcription
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
PCR	: Polymerase Chain Reaction
MP	: Hareketlilik proteini
CP	: Kılıf proteini
UV	: Ultraviyole
EtBr	: Ethidium Bromid

1. GİRİŞ

Türkiye'nin Doğu Karadeniz'in kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylalar dışında her yöresinde badem (*Prunus amygdalus* Bathsch.) yetiştirilmektedir. 2019 yılı verilerine göre ortalama 150.000 ton üretimi ile ülkemiz (Anonim, 2019), dünyanın önde gelen badem üreticisi ülkelerden birisi olmasına rağmen badem ihtiyacını karşılayamamakta ve iç badem ithalatında bulunmaktadır. Türkiye ekolojisi badem üretimi için büyük bir potansiyel içermektedir ve ülkemiz bu değerli meyve türünde iddialı bir konuma gelecek durumdadır. Badem ülkemizde birçok ilde kapama bahçeler ve plantasyonlar halinde üretilmekte ve üretimi de teşvik edilmektedir. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Adıyaman ili badem yetiştiriciliğinde üretim alanı bakımından İstatistik Veri Ağı (İVA) 2017 yılı tahmini verilerine göre 51.495 da ile Türkiye'de ilk sırada yer almaktadır. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları büyük sorunlara neden olmaktadır (Dunez, 1988; Dunez, 2000). Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi badem ağaçlarında virüs hastalıkları genellikle yaprak ve meyvede renk bozulmalarına, gövdede deformasyona, üründe azalmalara ve aşı uyumsuzluklarına ve hatta ileri aşamalarda ağaçlarda ölümlere neden olmaktadır (Kahn, 1976). Bunun yanında virüs enfeksiyonları badem ağaçlarından alınacak ürünün kalite ve kantite değerleri üzerine olumsuz etki yapmaktadırlar. Sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunan virüsler arasında badem ağaçlarında da ekonomik zarar yapan virüsler; erik nekrotik halkalı leke virüsü (*prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), elma klorotik yaprak leke virüsü (*apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), erik cücelik virüsü (*prune dwarf virus*, PDV), elma mozayik virüsü (*apple mosaic virus*, ApMV) ve erik şarka virüsü (*plum pox virus*, PPV)'dür (Nemeth, 1986; Dunez, 1988). Yapılan pek çok çalışma bu virüslerin başta Avrupa olmak üzere tüm dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir (Dunez, 1988; Myrta ve ark., 2003). Ancak badem ağaçlarının diğer sert çekirdekli meyve ağaçlarına oranla daha az sayıda virüs ve virüs benzeri etmen tarafından enfekte edildiği bildirilmiştir (Digiaro ve ark., 1992). Literatürlerde badem ağaçlarında 10'dan daha az sayıda virüs hastalığı rapor edilmiş olmasına karşın bu sayı vişnede 39, şeftalide ise 37'dir (Nemeth, 1986).

Ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarında virüslerin saptanması konusunda çok çalışma bulunmasına karşın, yalnızca badem virüsleri konusunda Kahramanmaraş ve Tekirdağ illerinde yapılmış iki farklı çalışma bulunmakta ancak Adıyaman ili badem ağaçlarında virüslerin tespiti konusunda bir çalışma bulunmamaktadır.

Batı Akdeniz Bölgesi'nde bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne ait badem bahçesinde virüslerin yaygınlığının araştırıldığı bir çalışmada toplanan 222 örnek, DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile PNRSV, PDV, PPV, ACLSV ve ApMV'lerinin saptanması amacıyla testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemiyle testlenen 222 badem ağacının 52 tanesinde (% 23.4) PNRSV ve ACLSV'lerinin tekli enfeksiyonları saptanmıştır. Yapılan testlemelerde en yaygın virüs PNRSV (%20.3) olarak saptanırken, onu ACLSV (%3.2) takip etmiştir. Testlenen badem örneklerinde PDV, ApMV ve PPV'leri bulunmamıştır (Öztekin, 2006).

Badem ağaçlarında virüs hastalıklarını saptamak amacıyla 2010 yılında yapılan survey çalışmalarında, Trakya Bölgesi'nde Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerine bağlı 10 ilçede, 158 çiçek ve 260 adet yaprak örneği toplanmıştır. Survey yapılan alanlardan toplanan toplam 418 bitki örneğinde ELISA ve Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testleri ile PPV, PNRSV ve PDV'lerinin tanıları gerçekleştirilmiştir. Serolojik ve moleküler testlemeler sonucunda Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarının %31.15 oranında PNRSV, %4.23 PDV ve %2.31 ise PPV ile enfekteli oldukları saptanmıştır. Trakya Bölgesinde yapılan bu çalışma sonucunda 260 yaprak örneğinden %38.84'ü virüslerle enfekteli bulunmuştur. Türkiye'deki badem ağaçlarında PPV'nün hem yaprak hem çiçek örneğinde bulunuşu ilk defa bu çalışma ile kanıtlanmıştır (Karabacak, 2012).

Sipahioğlu ve ark., (1999) Doğu Anadolu Bölgesinde virüslerle bulaşıklık oranının kayısıda %0.3'den az, kirazda %2 ve bademde %33 olduğunu bulmuştur. Survey yapılan sert çekirdekli türlerinde PPV, ApMV, TBRV (tomato black ring virus, domates siyah halka virus), RpRSV (rasberry ringspot virus, ahududu halka leke virus), SLRSV (strawberry latent ringspot virus, çilek latent halkalı leke virüsü), CLRV (cherry leafroll virus, kiraz yaprak kıvrıcıklığı virüsü), ArMV (arabis mosaic virus, arabis mozayik virüsü) ve ToRSV (tobacco ringspot virus, tütün halka leke virus)'nün olmadığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı Adıyaman ilinde badem ağaçlarında vir surveyi yapılarak, simptomolojik gözlemlerin yapılması, şüpheli örneklerin elma mozaik virüsü (ApMV), elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV), erik cüceleşme virüsü (PDV), erik nekrotik halkalı leke virüsü (PNRSV) ve erik şarka virüsü (PPV)'lerine karşı DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ve RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) yöntemleri ile testlenerek bu virüslerin yaygınlık oranlarının belirlenmesi ve elde edilecek virüs izolatlarının DNA sekans analizi yöntemiyle karakterizasyonunun yapılmasıdır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ülkemizde 2019 yılı verilerine göre meyve veren yaşıta badem ağaç sayısı 9.521.707 iken meyve vermeyen yaşıta ağaç sayısı ise 6.333.129 ve verim 150.000 tondur. Badem ülkemizde birçok ilde kapama bahçeler ve plantasyonlar halinde üretilmekte ve üretimi de teşvik edilmektedir. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde ve Adıyaman ilinde son 5 yılda badem üretim miktarı ve meyve veren yaşıta ağaç sayısı Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ülkemizde ve Adıyaman ilinde 2015-2019 yılları arası badem üretim miktarı (ton) ve meyve veren yaşıta ağaç sayısı (Anonim, 2019)

Yıllar	Adıyaman		Türkiye	
	Meyve veren yaşıta ağaç sayısı	Üretim miktarı (ton)	Meyve veren yaşıta ağaç sayısı	Üretim miktarı (ton)
2015	155.588	1.800	5.863.629	80.000
2016	352.965	3.576	6.663.996	85.000
2017	530.858	4.593	6.810.165	90.000
2018	1.204.200	11.747	8.490.351	100.000
2019	1.685.485	15.470	9.521.707	150.000

Adıyaman ilinde badem yetiştiriciliği en çok Kahta, Besni, Gölbaşı ve Merkez ilçelerinde yapılmakta olup, bu ilçelerde badem üretim miktarları sırasıyla 10.455, 2.284, 1.430 ve 697 tondur (Anonim, 2019).

Ülkemiz meyvecilik üretim potansiyeli bakımından önemli bir yere sahip olmasına rağmen, bu meyvelerin üretiminde ve ihracatında arzu edilen seviyelere gelememiş olup bu durumun başlıca nedeni birim alandan yeterli verim ve kalitede ürün alınamamasıdır. Verim ve kalitenin düşük olmasının nedenlerinden biri de hastalıklardan özellikle virüs hastalıklarından arı üretim materyalleri kullanılmamasından kaynaklanmaktadır. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları oldukça önemli sorunlar yaratmaktadır (Öztekin, 2006). Virüs hastalıklarının, bakteriyel ve fungal hastalıklar gibi kimyasal mücadelesinin

olmaması bu hastalıkların ekonomik önemini de arttırmaktadır. Virüs etmenlerinin çoğunun latent enfeksiyon yapması, farklı iklim ve ekolojik koşullarda belirtiler vermesi, bahçe tesisi edilirken yapılan yanlış uygulamalar viral hastalıkların hızlı bir şekilde ülkemizde yayılmasına ve ticari bahçelerde daha kurulum aşamasında önemli zararlara neden olmaktadır (Sipahioğlu ve ark., 2007). Ülkemizde bir çok bölgede yetiştirilen sert çekirdekli meyvelerdeki virüs ve virüs benzeri hastalıklarının çok yaygın olmasının en önemli nedeni yeni tesis edilen bahçelerin viral etmenlerle enfekteli üretim materyalleri ile kurulmuş olmasından dolayıdır (Gümüş ve ark., 2007).

Genel olarak virüs hastalıkları kültür bitkilerinin yapraklarında kloroz ve nekroz oluşumuna, bitki büyümesinde duraklamaya, meyve ağaçlarının gelişimini sınırlandırarak meyve verim ve kalitesinde azalmaya sebep olarak ekonomik ömürlerinin azalmasına meyve verim ve kalitesinde düşmelere neden olmaktadır. Virüs enfeksiyonu nedeni ile hastalanan ağaçlar, virüs tür ve ırkına bağlı olarak ölmekle beraber enfekteli ağaçların diğer bazı hastalıklara karşı dayanıklılığını da azalmaktadır (Nemeth, 1986). Ayrıca sert çekirdekli meyve ağaçlarında görülen virüs etmenlerinin %35 ile %100 varan verim kayıplarına ve fidanlıklarda anaç kalem uyuşmazlıklarına yol açtığı rapor edilmiştir (Dunez, 1988; Nemeth, 1994). Sert çekirdekli meyveler farklı gruplara dahil olan birçok RNA virüsüne konukçuluk etmektedir.

Dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yıldan yıla artması beraberinde önemli sorunların gündeme gelmesine sebep olmuştur. Bu sorunların bir tanesi de virüslerden kaynaklanan ekonomik kayıpları oluşturan verim ve kalite düşüklüğüdür. Elma mozaik virüsü (apple mosaic virus, ApMV), prunus nekrotik halkalı leke virüsü (prunus necrotic ring spot virus, PNRSV), erik cücelik virüsü (prune dwarf virus, PDV), erik şarka virüsü (plum pox virus, PPV), kiraz yaprak kıvrılma virüsü (cherry leaf roll virus, CLRV) ve elma klorotik yaprak leke virüsü (apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV) başta badem olmak üzere diğer sert çekirdekli meyve ağaçlarında saptanan önemli ve en yaygın virüslerdir (Nemeth, 1986; Dunez, 1988). Bu virüslerin başta Avrupa olmak üzere dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Dunez, 1988; Myrta ve ark., 2003).

Bromoviridae familyasına bağlı *Ilarvirus* cinsine dahil olan PNRSV'nin genomu tek sarmallı (ss: single-stranded) RNA'dan ibaret olup, partikülleri zarfsız, 25-35 nm çapında ve 70 nm uzunluğundadır (Ong, 1987). Rosa, Prunus, Malus cinsleri ve şerbetçi

otu (*Humulus lupulus*) PNRSV'nin doğal konukçularıdır (Nemeth, 1986). Ekonomik açıdan en önemli konukçuları arasında gül (*Rosa spp.*), Prunus cinslerine ait kiraz (*Prunus avium*), vişne (*P. cerasus*), erik (*P. domestica*), badem (*P. dulcis*), şeftali (*P. persica*) bulunmaktadır (Nyland ve ark., 1976). Virüsün tohum ve polen kökenli olması, sert çekirdekli meyve ağaçlarında çok hızlı yayılmasında oldukça etkilidir (Cole ve ark., 1982; Uyemoto ve Scott, 1992). Prunus türlerinde tohumla taşınma oranının, türe bağlı olarak %70'e kadar ulaşabildiği bilinmektedir (Megahed ve Moore, 1967). Bu virüsün taşınmasında bilinen bir vektör böceğin olmadığı bildirilmiştir (Swenson ve Milbroth, 1964). Virüs, konukçularının birçoğunda klorotik veya nekrotik çizgiler, halkalar ve noktalar, yaprak deformasyonu ve gelişme geriliği şeklinde semptomlara neden olmaktadır. Nekrotik halkaların genellikle orta kısımları düşereke yaprağın saçma ile delinmiş gibi bir görünüm almasına neden olmaktadır. PNRSV ile enfekteli genç ağaçlarda ölümler görülebilmektedir.

Trichovirus cinsinin *Flexiviridae* familyasına bağlı bir virüs olan ACLSV (Martelli ve ark., 1994) 720 x 12 nm uzunluğunda ipliksi partiküllere sahip olup (Brunt ve ark., 1996) elma, armut, şeftali, erik, vişne ve bademi kapsayan birçok meyve türünde hastalık yapmaktadır (Nemeth, 1986; Desvignes ve Bove, 1989). ACLSV'nin birçok ırkı, meyve ağaçlarında latent olmasına karşın diğer bazı ırkları yaprak kızarmasıyla birlikte tepe sürgünlerinde çalılama ve bazı anaçlar üzerine aşılı elma varyetelerinin ölümüne neden olabilmektedir (Desvignes ve Bove, 1989). Virüs aynı zamanda eriklerde kabuk yarılmalarına, erik beneklenme virüsü benzeri semptomlara, şeftalide koyu yeşil renkli beneklere, şiddetli yaprak ve meyve deformasyonlarına, bazı kayısı kombinasyonlarında aşu uyumsuzluklarına da neden olabilmektedir (Nemeth, 1986; Desvignes ve Bove, 1989; Sutic ve ark., 1999).

Bromoviridae familyasına bağlı *Illarvirus* cinsinden olan PDV'nin izometrik partikülleri yaklaşık olarak 22 nm çapındadır. Virüs infekteli bitkilerde klorotik halkalar, beneklenmeler, internodların kısalması ve sarı lekelerle neden olmaktadır (Brunt ve ark., 1996). PDV'nin konukçu dizisi çok geniş olup kültüre alınan tüm Prunus türlerinde (şeftali, kiraz, erik, badem ve vişnede) yaygın olarak bulunmaktadır. PDV'nin bilinen bir vektörü bulunmamakta ancak tohum ve polenle taşınmaktadır (Gilmer ve ark., 1976; Uyemoto ve ark., 1989; Dunez 1988; Kunze, 1988). Etmen bahar aylarında kiraz yapraklarda klorotik halkalar, beneklenmeler ve yaprağa nüfus etmiş geniş sarı lekeler

şeklinde belirtiler oluşturmaktadır. Vişnede, kirazda görülen belirtilere ek olarak yaygın kloroz belirtileri erik ağaçlarında ise boğum aralarında kısalma ve özellikle İtalyan eriklerinde bodurlaşma görülmektedir.

Elma mozayik virüsü (ApMV) *Bromoviridae* familyası, *Ilarvirus* cinsine dahil olup tek sarmallı RNA genomundan oluşmaktadır. Rosaceae familyasına giren bitkiler ApMV'nin konukçuları olup ApMV ile enfekteli ağaçların yapraklarında ya klorotik mozayik ya da halka leke belirtileri gözlenmektedir (Nemeth, 1986). Virüsün bazı ticari *Prunus* türlerinde %25'e varan önemli ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Martelli ve Savino, 1997).

Potyvirus cinsi virüslerden biri olan erik şarka virüsü (plum pox virus= PPV sert çekirdekli meyve ağaçlarında “Sharka (Şarka)” adıyla bilinen hastalığa neden olmaktadır. PPV ilk kez Batı Avrupa ülkelerinde ortaya çıkmış olup daha sonra diğer Avrupa ülkelerinde de saptanmıştır. PPV *Prunus* cinsine dahil pek çok türde ciddi enfeksiyonlar yaptığı ve özellikle erik (*P. domestica*, *P. salicina*), şeftali (*P. persica*) ve kayısı (*P. armeniaca*) ağaçlarında büyük kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Dunez, 1988). Son yıllarda Moldova ve İtalya'da PPV'nin kirazlarda da doğal enfeksiyonlar yaptığı rapor edilmiştir. Şiddetli hastalık belirtileri kayısı, erik ve şeftali ağaçlarında ortaya çıkmaktadır. PPV ile enfekteli ağaçların yapraklarında klorotik leke, şerit ya da halka şeklinde, damarlarda renk açılması ve deformasyonlar, meyvelerinde ise klorotik lekeler veya halkalar şeklinde belirtiler meydana getirmektedir. Etkilenen meyvenin çekirdeklerinde de solgun leke ya da halkalar görülmekte, meyvelerin çoğu normal olgunlaşma tarihinden yaklaşık olarak 20 gün önce dökülmekte ve bu meyvelerin şeker içeriğinin de oldukça düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

2.1. Dünyada Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıkları Konusunda Yapılan Çalışmalar

Prunus amygdalus ve süs bitkisi olarak değerlendirilen çiçekli badem *Prunus tribola*'da patojenik olarak 18 fungal, 3 bakteriyel, 2 nematod, 6 adet de virüsten kaynaklanan hastalık belirlemiştir (Horst, 2008). Badem ağaçlarında saptanan en önemli virüs olan *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'ünün sürgünlerdeki gözlerde kuruma, yapraklarda damar bantlaşması, parlak mozaik, halkalı leke, kloroz ve meşe yaprağı deseni gibi belirtiler meydana getirdiği ve etmenin verimi düşürdüğü rapor edilmiştir

(Smith, 1972, Brunt ve ark., 1996). Badem ağaçlarında PNRSV'nün badem sarı mozayik (almond calico disease), badem yapraklarında çizgi desen hastalığı (almond line pattern disease) ve badem nekrotik halka leke hastalığı (almond necrotic ringspot disease) olmak üzere üç tip hastalığa neden olduğu saptanmıştır (Sutic ve ark., 1999). Ayrıca bademin PDV'nün doğal konukçusu olduğunu, diğer virüsler ile beraber badem ağaçlarında karışık enfeksiyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bademin PPV'nün doğal konukçusu olmadığı ancak bu virüsün indikatör bitkisi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Bertozzi ve ark. (2002), badem ağaçlarında çiçek tomurcukları, çiçek petal yaprakları ve yaprak gibi farklı bitki dokusu örneklerinde PNRSV'nün varlığını ELISA yöntemi ve biyolojik indeksleme yöntemi ile araştırmışlar ve sonuçta erken toplanan badem petal yapraklarında PNRSV'nün varlığını ELISA testi ile saptayabilirken 9 indikatör bitkiye yapılan inokulasyonda başarı elde edememişlerdir. Enfekteli badem yaprak örneklerinin ise PNRSV'nün ELISA ile saptanmasında en uygun materyali oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Dünyada badem ağaçlarında virüslerin varlığının saptanması konusunda yapılan çalışmalar diğer sert çekirdekli meyve türleri ile birlikte yapılmıştır. İsrail'de şeftali ve badem ağaçlarında RT-PCR yöntemi kullanılarak PNRSV saptanmıştır (Rosner ve ark., 1997). İsrail'deki badem, erik ve kayısı çeşitlerinde PNRSV'nün araştırılmasında farklı konukçularda farklı PNRSV izolatları olabileceğini göstermişlerdir (Spiegel ve ark., 2004).

Badem ağaçlarındaki virüslerin saptanmasında serolojik yöntemlerden ELISA yöntemi ile nükleik asit hibridizasyonuna dayalı Polymerase chain reaction (PCR) yöntemini karşılaştıran Mekuria ve ark. (2003) üç yıllık çalışma sonucunda Clark ve Adams (1977) ELISA metoduna göre Mullis ve ark. (1986) ile Saiki ve ark. (1988) geliştirdikleri PCR metodunun daha güvenilir ve daha duyarlı olduğunu saptamışlardır (Mekuria ve ark., 2003).

Badem ağaçlarında yaygın olarak bulunan Ilarvirüslerden PNRSV, PDV ve ApMV'nün üçünün birden saptanmasında Non-izotopik moleküler hibridizasyon ve Multiplex RT-PCR tekniğini geliştirmişler ve bu üç virüse spesifik primer karışımı ile bademin de aralarında bulunduğu sert çekirdekli bitki örneklerinin seri bir şekilde testlenmesine olanak sağlamışlardır (Saade ve ark., 2000).

Silva ve ark. (2003), badem ağaçlarında PDV'ünü PCR tekniği kullanarak saptamak amacıyla yaptıkları testler sonucunda PDV'nün genç badem yapraklarında, çiçek tomurcuklarında, polenlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ve bitki hücre sitoplazması içerisinde çekirdek çevresinde yoğunlaştığını saptamışlardır.

Jarrar ve ark. (2001), Filistin'de simptom gösteren 196 badem ağacından aldıkları yaprak örneklerinin % 13.3 oranında PDV ile bulaşık olduğunu kirazda % 25, şeftalide % 26.7 oranlarında PNRSV bulunduğunu belirlemişlerdir.

Portekiz'de badem ağaçlarında saptanan virüslerle mücadeleye yönelik önemli bir çalışma yapılmıştır. Miguel ve ark. (1998), Portekiz'e özgü Boa Casta badem çeşidi başta olmak üzere enfekteli damızlık badem ağaçlarının PDV'ünden arındırılması için termoterapi, kemoterapi ve meristem kültürü yöntemlerini kullanarak badem virüs hastalıklarını kontrol altına almaya çalışmışlar, araştırmacılar ayrıca PDV'ye karşı npt II dayanıklılık geni de saptanmışlardır.

Varveri ve ark. (1997), kayısıda PPV ve ACLSV'lerinin, bademde ise PNRSV'nün ELISA testi ile güvenilir teşhislerini yapmışlar ve örnekleme koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmışlardır. Doğal olarak bulaşık olan 3 ağaçtan büyüme periyodu süresince örnekleme yapılmış ve testler bir sonraki yıl tekrarlanmasına karşın PPV virüsü tüm örneklerde bulunamamıştır. Mayıs, Haziran, Temmuz, Ekim ve Kasım aylarında toplanan örneklerin ELISA ile testlenmesi sonucunda en yüksek absorbans değerlerinin saptandığını bildirmişlerdir.

Sert çekirdekli meyvelerden erik, kaysı, şeftali ve nektarinde sharka hastalığına neden olan PPV'üne badem ağaçlarının da duyarlı olduğu saptanmıştır (Kölber ve ark., 2001). Badem ağaçlarında PPV enfeksiyonlarının Rusya, Bulgaristan, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti'nde yaygın olduğu bildirilmiştir.

2.2. Ülkemizde Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıkları Konusunda Yapılan Çalışmalar

Badem ağaçlarındaki virüslerin saptanmasına yönelik çalışmalar ABD ve bazı Avrupa ülkelerinden sonra Türkiyede Aydın, Balıkesir ve İzmir illerindeki fidanlıklarda başlatılmıştır. Farklı Prunus türlerinde klorotik ve nekrotik yaprak lekeleri, calico, mozayik, yaprak daralması ve deformasyonlarla, cücelik, sakız akıntısı gibi belirtiler

gösteren örneklerin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda Prunus türlerinin PNRSV, PPV ve diğer birçok viral etmenle bulaşık olduğu saptanmıştır (Azeri, 1994).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde erik ve kayısı ağaçlarından toplanan örnekleri ELISA yöntemiyle testlemişler ve PNRSV, PDV ve ACLSV'nin tek veya karışık enfeksiyonları belirlenmiş ancak ApMV ve SLRSV enfeksiyonları bulunamamıştır. Bu çalışmada ELISA'da PPV enfeksiyonu bulunan kayısı ağacından alınan örneklerle yapılan mekanik inokulasyon olumsuz yanıt vermiştir. (Yıldızgördü ve Çalı, 1994).

Baloğlu ve ark., (1995), Adana ve Tarsus bölgesinde yetiştiriciliği yapılan erik ve şeftali ağaçlarında PPV'nin varlığını araştırmak için yaptıkları çalışma sonucunda toplanan erik ve şeftali örneklerinin hiçbirinin bu virüs ile bulaşık olmadığını rapor etmişlerdir.

Gazel (1997), Gazel ve Çağlayan (1998), Hatay ilindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında zararlı virüs hastalıklarını tespit etmek için yaptıkları çalışmada PPV enfeksiyonunun tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Elibüyük ve Erdiller (1998), Malatya'da sert çekirdekli meyve ağaçlarının bu virüs bakımından temiz olduğunu rapor etmişlerdir.

Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan 476 sert çekirdekli meyve ağacının %28.4'ünün bir veya birden fazla virüs ile bulaşık olduğunu, ApMV'nin en yaygın (%22.28) virüs olduğunu, PNRSV, PDV ve ACLSV enfeksiyonlarının da ApMV enfeksiyonları kadar yoğun olduğunu ortaya koymuştur. Doğu Akdeniz Bölgesinde PPV enfeksiyonlarına rastlanmamıştır (Çağlayan ve ark., 1998).

Sipahioğlu ve ark. (1999) aralarında 21 adet bademin de bulunduğu 1019 adet sert çekirdekli meyve ağaçlarından toplanan yaprak örneklerinde aralarında PNRSV, PDV, PPV'nin de bulunduğu 11 ayrı virüsün ve 2 viroidin varlığını araştırmışlardır. Sonuçta PNRSV % 21, PDV % 33 oranında belirlenirken diğer virüslerin % 0.3 gibi çok düşük oranlarda bulunduğu, viroidlerin ise hiç bulunmadığı saptanmıştır.

Malatyada kayısılarda görülen virüs hastalıklarının saptanması ve çözüm yolları üzerine yapılan ELISA ve biyolojik testlemeler sonucunda, toplanan değişik çeşit ve yaşta toplam 622 örneğin hiçbirinde PNRSV, PDV, PPV, ACLSV, ApMV ve ToRSV virüsleri saptanmamıştır (Baloğlu ve ark., 2001).

Yorgancı ve ark. (2001), Malatya Meyvecilik Araştırma Enstitüsünde bulunan genetik stok materyal olan farklı kayısı çeşitlerini PPV, PNRSV ve ACLSV'lerine karşı

testlemişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda, Precose de Boulbon ve Kuru Kabuk çeşitlerinin ACLSV ile düşük oranda; Şam, Tekeler, Çöloğlu ve Hasan Bey çeşitlerinin ise PNRSV ile yüksek oranda bulaşık olduğu, PPV ile bulaşık ağaç olmadığını rapor etmişlerdir.

Tolay Arıkan (2002), Kahramanmaraş ili merkez ve çevre ilçelerinde yetiştirilen sert çekirdekli meyve ağaçlarında virüslerin yoğunluğunu araştırdığı çalışmada %6.45 oranında PDV, %0.40 oranlarında ise PPV ve PNRSV enfeksiyonu saptanmıştır.

Türkiye'nin farklı illerinden badem ve diğer sert çekirdekli meyve türlerine ait ağaçlardan topladıkları yaprak örneklerinde PPV izolatlarını DAS-ELISA ve Immuno capture reverse transcriptase-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) yöntemleri ile araştırmışlar ancak bademde PPV'nün bulunmadığını bildirmişlerdir (Sertkaya ve ark., 2003).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde damızlık sert çekirdekli meyve ağaçları içeren bahçelerden elde ettikleri 3 adet badem örneği dahil 48 yaprak örneğinde 6 adet virüsün varlığını ELISA ve RT-PCR testleri ile araştırmışlardır. Sonuçta plum pox virus (PPV) dışındaki diğer beş virüsü tek tek veya karışık enfeksiyonlar halinde bazı örneklerde bulunduğunu saptamışlardır (Sertkaya ve ark., 2004).

Türkiye'nin farklı illerinden simptomatik badem, kayısı, nektarin, şeftali, erik, kiraz ve vişne ağaçlarından topladıkları yaprak örneklerinde PPV'nin varlığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, Ankara'dan toplanan 2 kayısı ağacında PPV-M ırkını bulmuşlardır (Çağlayan ve ark., 2004).

Buzkan ve ark. (2005a), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi SEKAMER'deki kayısı parselinde gerçekleştirdikleri survey sonucunda PPV'nin varlığını serolojik yöntemle saptamışlardır. Adaptasyon parselinden topladıkları 183 kayısı örneğini PNRSV, PPV, PDV, ApMV ve ACLSV virüslerine karşı DAS-ELISA yöntemiyle testlemeleri sonucunda, testlenen örneklerde PNRSV %13.41, PPV %2.73, PDV ile ApMV ise %1.63 oranında bulunmuştur.

Buzkan ve ark., (2005b)'nin K.S.Ü. SEKAMER'deki şeftali parselinden topladıkları toplam 262 ağacın %22.9'unun (60 örnekte) bir veya iki virüsle enfekteli olduğunu bulmuşlardır. En fazla bulaşıklık %11.45 ile PPV bulunurken bunu takiben PNRSV %7.25 ve ACLSV %3.82 oranlarında tespit edilmiş olup testlenen örneklerde ApMV ve PDV saptanamamıştır.

Koç ve Baloğlu (2006), klorotik leke, meşe yaprağı benzeri renk açılmaları, yaprak şekil bozulması ve çizgi şeklinde renk açılmaları simptomlarını gösteren erik ağaçlarından topladıkları örnekleri DAS-ELISA, RT-PCR ve RFLP yöntemleri ile testlemişler ve PPV'nin Marcus ırkını ilk kez Çukurova Bölgesi'nde saptamış ilk kayıt olarak rapor etmişlerdir.

İlbağı ve ark. (2008) Tekirdağ ilinde simptom gözlenen 54 adet *Prunus spinosa* L. bitkisinde PPV, ACLSV ve ApMV'lerinin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. Testlenen 54 yaprak örneğinin 13'ünün PPV virüsü ile enfekteli olduğu ve %24.1 oranında enfeksiyona sahip olduğunu saptamışlardır.

Kahramanmaraş ilinde kapama badem bahçelerinde sistemik belirtiler sergileyen badem ağaçlarında *Candidatus Phytoplasma phoenicium* fitoplazmasını bulunamadığı bildirilmiştir (Yüzer, 2008).

Türkiye'deki sert çekirdekli meyve ağaçlarında PDV virüs protein alt ünite molekülündeki amino asit dizileri 10 farklı izolatta araştırılmış ve PDV'nin filogenetik sınıflandırılması sonucu Türkiye'de dört farklı grubun varyantı olduğunu bunların Kiraz I, Kiraz II, Karışık ve Badem grupları olarak adlandırılabilceğini bildirmişlerdir (Ulubaş Serçe ve ark., 2009).

Doğu Akdeniz Bölgesinde Adana, Kahramanmaraş, Hatay, Mersin ve Osmaniye illerindeki survey çalışmaları sonucunda toplam 605 badem ağacı PNRSV, PDV, PPV, ACLSV, ApMV'leri açısından DAS-ELISA ile testlenmiştir. Yapılan surveyler sonucu toplanan badem örneklerinde tespit edilen virüs hastalıkları içerisinde PNRSV %17.35 enfeksiyon oranıyla en yoğun saptanmış olup bunu %5,12'lik oranla ikinci sırada PDV, %2,81'lik oranla en az tespit edilen ACLSV izlemiştir. Bu örneklerden 2 tanesi PNRSV+PDV+ACLSV ile enfekteli, diğer 10 tanesi ise PNRSV+PDV ile enfekteli tespit edilmiştir (Yegül, 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Adıyaman ilinde badem bahçelerinde virüs simptomu gösteren ağaçlar yanında simptom göstermeyen ağaçlardan alınan yaprak örnekleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları ve Örneklem

Araştırma materyalini oluşturan örneklerin toplanması amacıyla Adıyaman ilinde badem bahçelerine Mayıs-Haziran aylarında surveyler yapılmış ve yapılan surveylerde virüs belirtisi gösteren badem ağaçlarının 4 farklı yönünden toplam 110 adet yaprak örneği alınmıştır. Herhangi bir virüs belirtisi göstermeyen durumda ise tesadüf olarak örneklem yapılmıştır. Araziden toplanan yaprak örnekleri polietilen torbalara konularak etiketlenmiş ve buz kutularında laboratuvara getirilmiş ve muhafaza edilmiştir. Araziden laboratuvara getirilen örneklerin bir kısmı DAS-ELISA, RNA izolasyonu ve moleküler çalışmalarda kullanılmış bir kısmı ise -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Gezilen ve örnek alınan badem bahçelerinin koordinatları GPS cihazı ile belirlenmiş, mevkii, yaşı, çeşidi, anacı, ağaçta nasıl belirtiler oluşturduğu gibi bilgiler kaydedilerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2. DAS-ELISA Testlemeleri

Survey çalışmalarında toplanan yapraklar örneklerinde virüs varlığı DAS-ELISA ile araştırılmıştır. Alınan genç yapraklarda virüs taraması Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA) yöntemine göre yapılmıştır (Clark ve Adams, 1977). DAS-ELISA testlerinde kullanılan ACLSV, ApMV, PDV, PNRSV ve PPV antiserumları ve 96 çukur içeren, çukurları düz tabanlı ve IgG absorbe etme özelliğindeki “Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96” ELISA plateleri BIOREBA AG (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. DAS-ELISA testi uygulamasında izlenen basamaklar sırasıyla:

- a) Kaplama tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyona göre sulandırılmış antibodyler ELISA plakalarının her bir çukuruna 200'er µl konmuş ve plate üzeri kapatılarak 37°C'deki inkübatörde 2-3 saat inkübe edilmiştir.
- b) İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile plakadaki tüm çukurlar 3-4 kez plastik piset veya çok kanallı mikro pipet yardımı ile yıkanmıştır. Yıkama tamponu 3 dakika süreyle çukurlarda bekletildikten sonra plaka ters çevrilerek çukurlarındaki yıkama tamponu boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurmak suretiyle kurutulmuştur.
- c) Örnek tamponu ile 1/10 oranda ezilerek hazırlanmış örnekler, ELISA plakalarına her örnek için iki tekerrürlü olacak şekilde her bir çukura 200 µl eklenmiş ve plakanın üzeri kapatılıp +4 °C de bir gece inkübe edilmiştir. Plakalara testlenecek örnekler haricinde pozitif (hasta), negatif (sağlıklı) ve tampon çözelti kontrolleri de konularak plakanın üzeri kapatılmış ve +37°C'de 4 saat veya +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
- d) İnkübasyondan sonra plakaların yıkama işlemi çukurlar arası karışma olmayacak şekilde (b) aşamasındaki gibi tekrarlanmıştır.
- e) Konjugat tamponu ile kullanılacak konsantrasyona göre optimum oranda sulandırılmış enzimle işaretli Gama-globulin (konjugat)'den her bir çukura 200'er µl konulmuş ve plakalar +37°C'de 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- f) İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile plakaların yıkama işlemi (b) aşamasındaki gibi tekrarlanmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.
- g) Substrat tamponunda taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200 µl konulmuş ve 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilerek enzimatik reaksiyonun (pozitif örneklerdeki renk değişimi) gerçekleşmesi için bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, ihtiyaç duyulduğu durumlarda reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 20-50 µl 3 M NaOH ilave edilmiştir.
- h) Pozitif kontrollerde renk sarıya döndüğü andan itibaren SEAC SIRIO S ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Okumalar sonucunda absorbans değerleri, negatif örneklerin iki katı ya da daha fazla olan örnekler pozitif yani virüs infekteli olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981; Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

DAS-ELISA yöntemiyle testlemelerde kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanmasında Ek 1’de verilen kimyasallar kullanılmıştır.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. Badem örneklerinden Total Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu

Badem ağaçlarından toplanan yaprak örneklerinden TNA izolasyonu için Rott ve Jelkmann (2001)’nın protokolü uygulanmış olup kullanılan kimyasallar Ek 2’de verilmiştir. Mayıs-Haziran aylarında badem ağaçlarından toplanan sürgünlü yapraklardan izolasyon yapılmıştır. İzole edilen TNA’lar PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır. İzole edilen RNA’ların kalitesi Nanodrop cihazı (Nanodrop 1000c, Thermo Sci., USA) ile ölçülmüştür. Silica yöntemiyle total nükleik asit ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- 50 mg bitki dokusu alınarak sıvı azotla toz haline getirilerek üzerine 1000 µl silica ekstraksiyon buffer içerisine 1 µl B-Mercaptoethanol eklenmiş, iyice karıştırılarak ependorf tüpe alınmıştır.
- Tüplere santrifuj yapılmadan 600 µl sıvı fazdan çekilerek içinde 600 µl 5.8 molarlık potasyum asetat bulunan yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Tüpler ters-düz edilerek 13.000 rpm’ de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı fazdan 750 µl alınarak yeni bir tüpe konulmuş ve üzerine 750 µl %100 isopropanol ilave edilmiştir. Tüpler -20°C’de en az yarım saat bekletilmiş, daha sonra 13.000 rpm’de 30 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Tüplerdeki sıvı faz atılarak pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. Tüpler vortexlenmiş ve pellet çözündürülmüştür. Daha sonra tüpler üzerine 20 µl silica ilave edilerek 10.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj yapılmıştır.
- Tüplerdeki sıvı faz atılmış, pellet üzerine 500 µl wash buffer eklenerek pellet çözündürülmüştür.
- Tüpler 13.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek, sıvı faz atılmış ve pellet oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır (Alkol kokusu kalmayıncaya kadar).
- Tüplerdeki pelletin üzerine 150 µl TE buffer eklenerek pellet çözündürülmüş ve tüpler oda sıcaklığında 5 dakika süreyle bekletilmiştir.

- Tüpler 13.000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Sıvı fazdan 100 µl alınarak üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklenmiştir.
- Tüpler -20°C'de 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 10 dakika süreyle +4°C'de 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki sıvı faz atılmıştır.
- Tüplerdeki pellet üzerine 200 µl % 70'lik ethanol eklenip -20°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Tüpler vortexlenir ve +4°C'de 3 dakika süreyle 12.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı faz atılmıştır (bu aşama 2 defa tekrarlanır).
- Tüplerdeki pellete dokunmadan sıvı faz atılıp pellet 20 dk süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur (alkol kokusu kalmayıncaya kadar).
- Tüplerdeki pellet 80 µl TE buffer ile çözündürülmüştür.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçülerek moleküler analizlerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

RNA ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanmasında Ek 2'de verilen kimyasallar kullanılmıştır.

3.2.3.2. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri

Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinden ekstrakte edilen RNA'lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buz üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5XRT tampon çözeltilisinden (Fermentas) 4 µl, d₂H₂O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

RT ile elde edilen cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmalarında 5 farklı virüse spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR işlemlerinde 2.5 µl 10× PCR buffer, 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl primer seti (10 µM), 0.25 µl Taq polimeraz (5 units/µl, Promega, Corp.) içeren 25-µl'lik reaksiyon karışımı kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 94 C de 5 dakikayı takiben 35 döngü

94°C’de 30 saniye, 54°C’de 45 saniye ve 72°C’de 1 dakika ve 72°C’de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Annealing sıcaklığı çalışılan virüse göre değiştirilmiştir. Badem ağaçlarındaki ApMV, ACLSV, PNRSV, PDV ve PPV’ünün PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri, primer çiftlerinin nükleotit dizilimleri ve baz büyüklükleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. PCR ürünleri TAE buffer içeren %1’lik agaroz jel elektroforezinden sonra EtBr ile boyanarak UV altında gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.1. Badem örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri

Virüs	Baz büyük lüğü	Primer adı	Nükleotid dizilimi (5’-3’)	Hedef gen bölgesi	Referans
ApMV	262	Ap1	ATCCGAGTGAACAGTC TATCCTCTAA	CP	Menzel ve ark., 2002
		Ap2	GTAACCTCACTCGTTATC ACGTACAA		
ACLSV	677	Sense	TTCATGGAAAGACAGG GGCAA	CP	Menzel ve ark., 2002
		Antisense	AAGTCTACAGGCTATTT ATTATAAGTCTAA		
PDV	756	PD3-331F	AGTTTCCGCTGAAGATT GG	MP	Predajna ve ark., 2007
		PD3-1086R	ACAGACTCGGCTTCCTT GA		
PNRSV	785	a	TCACTCTAGATCTCAAGC AG	CP	Rosner ve ark.1998
		b	CGTTTTTCTTTCTTTCTTCC		
PPV	193	P1	ACCGAGACCACTACACTC CC	CP	Olmos ve ark., 1997
		PM	CTTCAACAACGCCTGTGC GT		

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Analizi

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında RT-PCR çalışmalarında elde edilen PCR materyal olarak kullanılmış olup PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüş, ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmış ve jel UV görüntüleme sisteminde incelenmiştir. %1'lik Agaroz jel'de elektroforez: 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisine konularak, agaroz eriyinceye ve karışım kaynayınca kadar mikrodalga fırın içerisinde tutulmuştur. Karışım 60 °C'ye kadar soğumaya bırakılarak tarak yerleştirilmiş jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20dk süre ile bekletilmiştir. Jel polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde çekilmiş ve jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri yükleme tamponu ile jel çukurlarına yüklenmiştir. Yüklemeyi takiben elektroforez güç kaynağı ile elektroforez aletine 100V'luk elektrik akımı 45 dakika süreyle uygulanmıştır. Koşma işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika süreyle 100 ml H₂O ve 30 µl (10mg/ml) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırıncaya kadar 5 dakika distile su içerisinde tutulmuştur. Jel, UV görüntüleme sisteminde incelenmiştir. Agaroz jelin hazırlanmasında Ek 3'te verilen kimyasallar kullanılmıştır.

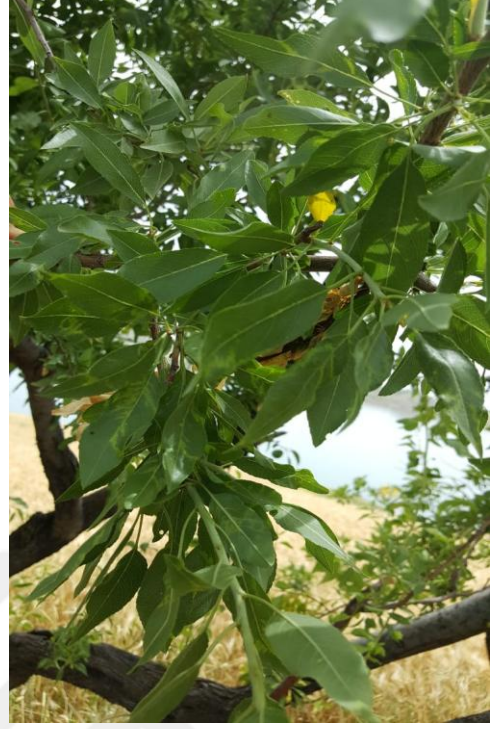
3.2.3.4. DNA Dizileme, Blast ve Filogenetik Analizler

PCR analizleri ile çoğaltılan her bir virüs izolatına ait DNA fragmentlerinin baz dizileri tayin edilmek üzere ürünler ticari bir firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Kaba baz dizisi kromotogramları birleştirilecek ve GAP4 programı kullanılarak düzenlenecektir (Bonfield ve ark., 1995). Çoklu baz dizisi yapılacak filogenetik analizler Neighbor-Joining metodu ile (Saitou ve Nei, 1987) MEGAX programı (Kumar ve ark., 2018) kullanılarak gerçekleştirilecektir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Adıyaman ilinde son yıllarda badem plantasyonlarının hızla artması ve üreticilerin yapılan teşvikler sonucunda yeni tesis kurma girişimleri ve bölgede badem üretiminin bu denli yaygın hale gelmesi, viral hastalık etmenleri açısından durumun araştırılması gereğini ortaya koymuştur. Bu nedenle 2019 yılı Mayıs-Haziran aylarında Adıyaman ilinde son yıllarda tesis edilen kapama badem bahçelerinin yanısıra çok yaşlı badem ağaçları da survey kapsamında incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında Adıyaman ilinden toplam 110 badem örneği toplanmıştır. Badem ağaçlarında virüs belirtisi sergileyen ve özellikle de bireysel olarak yetiştirilen yaşlı badem ağaçlarında çiçeklenmede noksanlık, yapraklarda ise sararma, klorotik lekeler, şiddetli mozayik belirtiler, damar bantlaşması, halkalı lekeler ve meşe yaprağı deseni sergileyen ağaçların varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7). Örnekleme yapılırken gerek virüs benzeri symptom gösteren gerekse symptomsuz badem ağaçlarından tesadüfi olarak örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen damar bantlaşması ve halkalı leke belirtileri



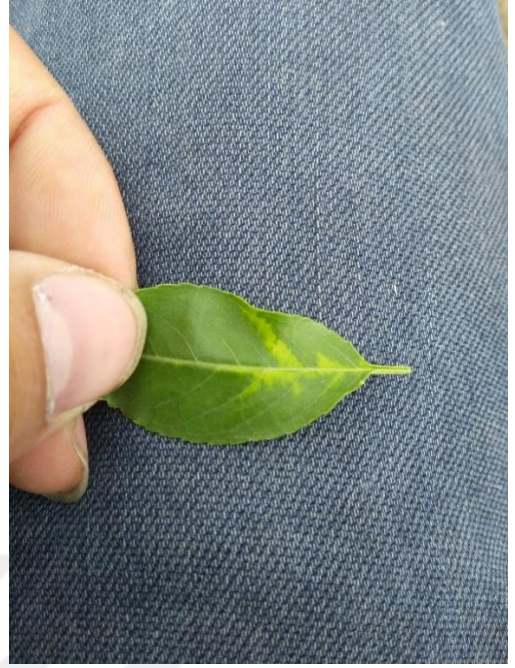
Şekil 4.2. Adıyaman ilinde halkalı leke ve şiddetli mozaik belirtilerinin görüldüğü badem ağaçları



Şekil 4.3. Adıyaman ilinde badem ağaçlarında gözlenen sararma belirtileri



Şekil 4.4. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen kurumalar



Şekil 4.5. Adıyaman ilinde badem ağaçlarının yapraklarında gözlenen damar bantlaşması belirtileri



Şekil 4.6. Adıyaman ilinde damar bantlaşması belirtilerinin gözlemlendiği badem yaprakları



Şekil 4.7. Adıyaman ilinde mozaik lekelerin gözlemlendiği badem yaprakları

4.2. DAS-ELISA Testlerinin Sonuçları

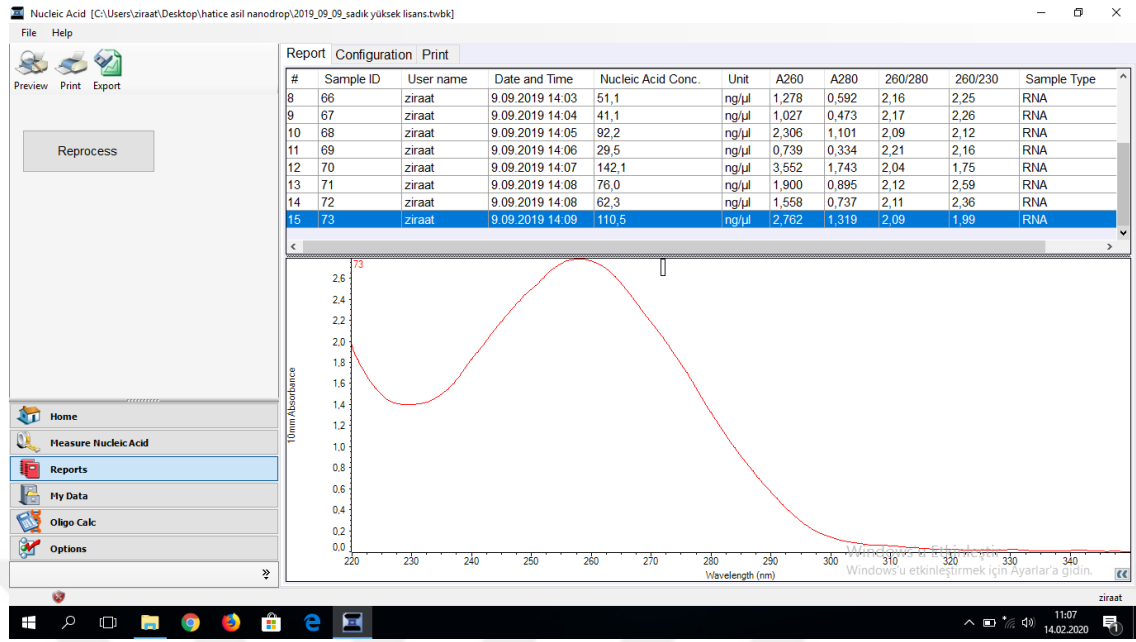
Adıyaman ilinde badem ağaçlarındaki virüslerin saptanması amacıyla yapılan surveyler kapsamında toplam 110 örnek toplanmış olup tüm örnekler antiserumların temin edildiği firmanın prosedürüne göre DAS-ELISA testlerine tabi tutulmuştur. Yapılan DAS-ELISA testlemeleri sonucunda toplanan 110 adet badem örneğinden sadece 34 örnekte prune dwarf virus (PDV) virüsü saptanmış olup, testlenen örneklerde apple mosaic virus (ApMV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), plum pox virus (PPV) tespit edilememiştir. Adıyaman ilinde testlenen badem örneklerinin PDV ile enfeksiyon oranı %30.90 olarak saptanmıştır. Toplanan örneklerde mozaik lekeler ve damar bantlaşması biçiminde symptom gösteren örneklerin tümü ELISA testinde pozitif sonuç vermiştir. Symptom gözlenmeyen örnekler DAS-ELISA testleri sonucunda negatif bulunmuşlardır. ELISA testinde beklendiği gibi pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerin absorbans değeri oldukça yüksek bulunurken negatif kontrollerde düşük absorbans değerleri elde edilmiştir.

Batı Akdeniz Bölgesi'nde bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne ait badem bahçesinden toplanan 222 örnekte ACLSV, ApMV, PDV, PNRSV ve PPV'lerinin varlığı DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Testlenen 222 badem ağacında PDV, ApMV ve PPV'leri saptanamamış olup, PNRSV %20.3, ACLSV ise %3.2 oranında bulunmuştur (Öztekin, 2006). Bulgaristan'ın güneyinde sert çekirdekli meyve ağaçlarından toplanan 2592 adet örnekte PDV ve PNRSV'nin varlığı DAS-ELISA ile belirlenmiştir. PDV enfeksiyonu en yüksek kirazda (%15.8) bulunurken bunu sırasıyla kayısı (%15.46), erik (%14.47), şeftali (%11.25), badem (%8.6), *P. mahaleb* (%1.45) ve vişne (%1.4) izlemiştir (Milusheva ve Borisova, 2005).

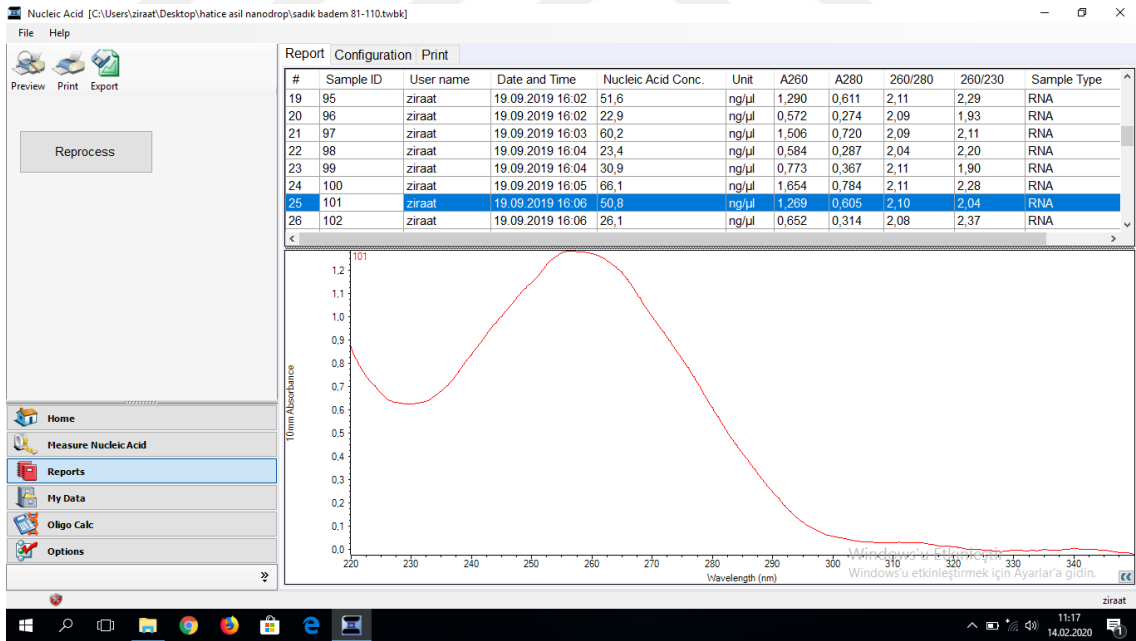
4.3. Moleküler Çalışmalar

4.3.1. Badem Örneklerinden Toplam Nükleik Asit İzolasyonu Sonuçları

Badem örneklerinden silica yöntemiyle ekstrakte edilen RNA'ların kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde RNA'ların yeterli miktarda ve kalitede olduğu saptanmıştır. Testlemelerde kullanılan bu örneklerin bazılarının nanodrop değerleri Şekil 4.8, 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8. Rott ve Jelkmann (2001)'ın yöntemi kullanılarak Adıyaman ilinden toplanan 73 numaralı badem bitkisinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD).

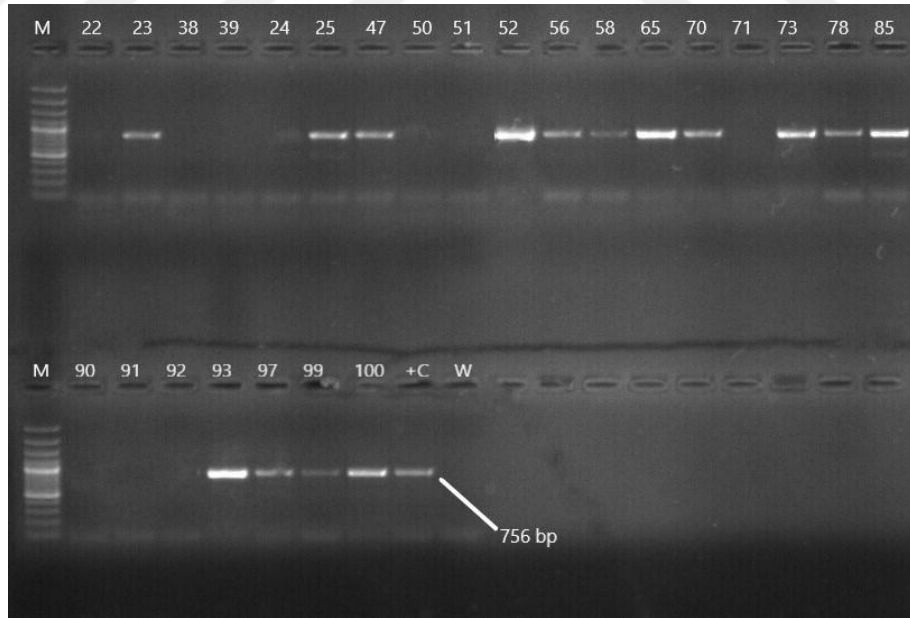


Şekil 4.9. Rott ve Jelkmann (2001)'ın yöntemi kullanılarak Adıyaman ilinden toplanan 101 numaralı badem bitkisinden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD).

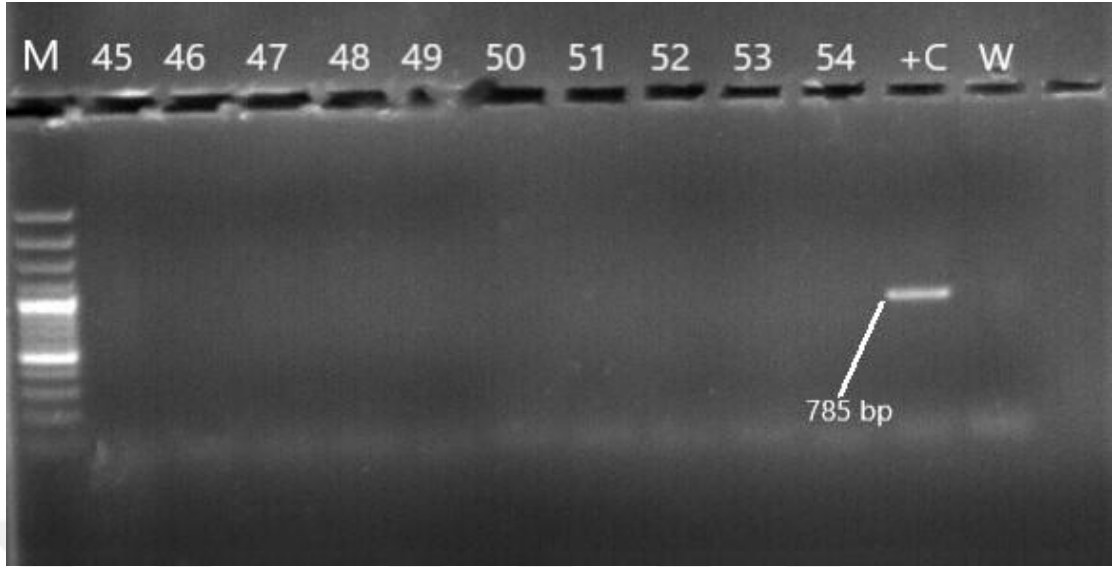
Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da görüldüğü gibi Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinden yapılan RNA izolasyonlarına yüksek RNA konsantrasyonu elde edilmiş ve polisakkarit kirliliğinin olmadığı belirlenmiştir.

4.3.2. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri Sonuçları

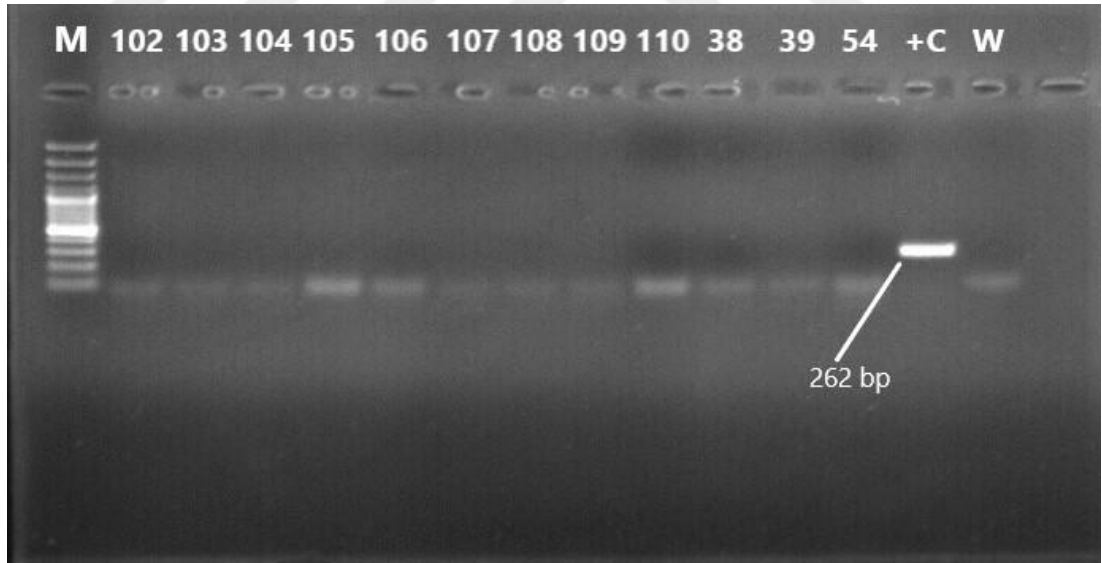
Bu çalışma kapsamında toplanan badem örneklerinden izole edilen RNA’lar apple mosaic virus (ApMV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), prune dwarf virus (PDV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) ve plum pox virus (PPV) tanısı için geliştirilen primer çiftleri ve uygun PCR koşulları kullanılarak RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. RT-PCR analizleri ile testlenen 110 badem örneğinde söz konusu beş viral etmenden sadece PDV’üne ait beklenen uzunluktaki (756 bp) DNA fragmenti çoğaltılırken (Şekil 4.10) testlenen örneklerde ApMV, ACLSV, PNRSV ve PPV saptanamamıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14). Testlenen toplam 110 badem örneğinden 34 tanesi PDV ile enfekteli bulunmuştur.



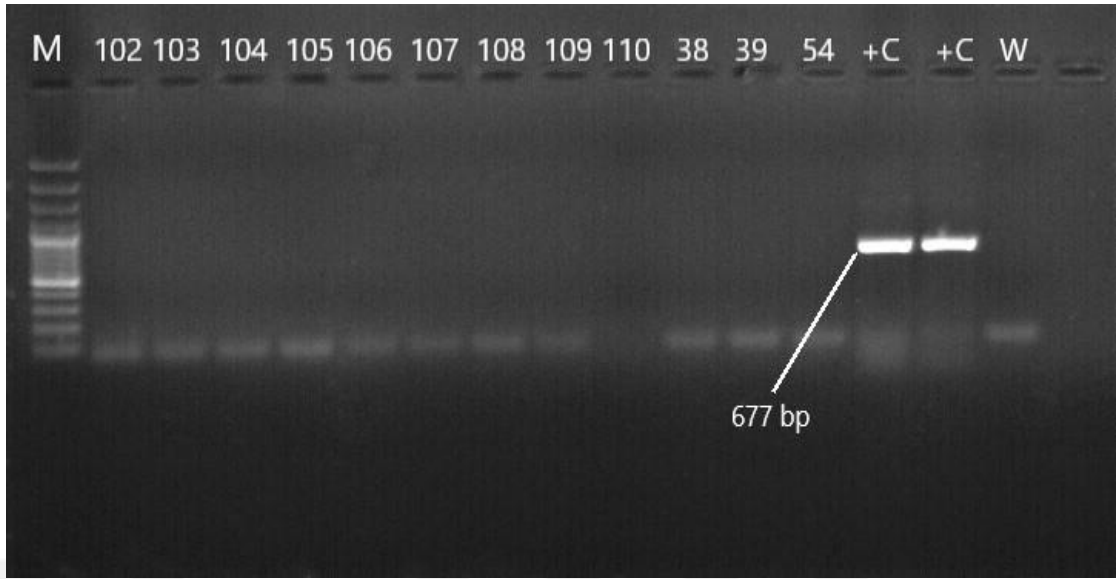
Şekil 4.10. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde prune dwarf virus (PDV)’ünün tespiti için PD3-331F/PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 22, 23, 38, 39, 24, 25, 47, 50, 51, 52, 56, 58, 65, 70, 71, 73, 78, 85, 90, 91, 92, 93, 97, 99, 100: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.



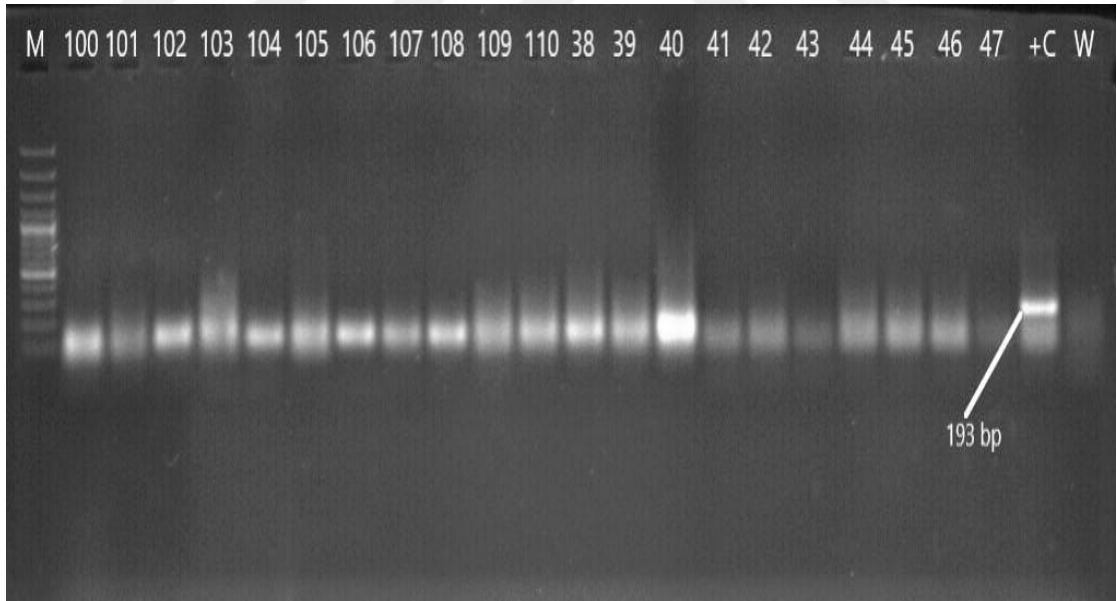
Şekil 4.11. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)'ünün tespiti için a/b primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.



Şekil 4.12. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde apple mosaic virus (ApMV)'ünün tespiti için Ap1/Ap2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.



Şekil 4.13. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)'ünün tespiti için sense/antisense primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 54: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.



Şekil 4.14. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde plum pox virus (PPV)'ünün tespiti için P1/PM primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol.

Bu çalışma sonucunda Adıyaman ilinden toplanan 110 badem örneğinin RT-PCR yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda 34 tanesinin PDV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre Adıyaman ilinde ilk kez badem ağaçlarında PDV'ü RT-PCR analizleriyle saptanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyve ağaçlarında PDV ve PNRSV'lerinin beraber bulunduğu saptanmış olmakla beraber her iki virüsün tekli enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır.

Ülkemizde Trakya Bölgesi'nde Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinden 2010 yılında toplam 418 (158 çiçek ve 260 yaprak) badem örneği toplanmış ve örnekler PDV, PNRSV ve PPV açısından ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmiştir. Serolojik ve moleküler testlemeler sonucunda Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarının %31.15 oranında PNRSV, %4.23 PDV ve %2.31 oranında PPV ile enfekteli oldukları saptanmıştır (Karabacak, 2012). Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan 1019 sert çekirdekli meyve ağacında (859 kayısı, 120 kiraz, 21 badem ve 19 şeftali) PDV enfeksiyonu %2.64 bulunmuştur. Testlenen 21 badem ağacından 7 tanesi PDV (%33 enfeksiyon) ile enfekteli bulunmuş olup testlenen badem ağaçlarında diğer virüsler bulunamamıştır (Sipahioğlu ve ark., 1999). Jarrar ve ark. (2001), Filistin'de semptomatik 196 badem ağacından aldıkları yaprak örneklerinin % 13.3 oranında PDV ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir.

Lübnan'da ELISA ile testlenen 599 badem ağacında PNRSV %3.3, ACLSV %2.7, PDV %2.5 ve ApMV ise %1.8 oranında saptanmıştır (Kanaan-Atallah, 2000).

Doğu Akdeniz Bölgesinde Adana, Kahramanmaraş, Hatay, Mersin ve Osmaniye illerinden toplanan 605 badem ağacının DAS-ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda PNRSV %17.35 enfeksiyon oranıyla en yoğun saptanmış olup bunu %5.12'lik oranla ikinci sırada PDV, %2.1'lik oranla en az tespit edilen ACLSV izlemiştir. Bu örneklerden 2 tanesi PNRSV+PDV+ACLSV ile enfekteli, diğer 10 tanesi ise PNRSV+PDV ile enfekteli tespit edilmiştir (Yegül, 2017).

4.3.3. DNA Dizileme, Blast ve Filogenetik Analiz Sonuçları

RT-PCR analizleri sonucunda PDV pozitif olduğu saptanan örnekler sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizleri sonuçlarına göre PDV açısından anlamlı DNA dizilerine sahip 15 izolat nükleotid seviyesinde analiz edilmiştir. PDV badem

izolatlarından 23 nolu izolatın sekansının BLAST analizi sonucu Şekil 4.15'te gösterilmektedir. Yapılan analizlerde 718 baz uzunluğunda nükleotid dizileri kullanılmış olup, izolatlarımız kendi arasında en yüksek %99.584 oranında benzerlik gösterirken, en düşük %97.197 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nükleotidlerden elde edilen 239aa uzunluğundaki aminoasit dizisinin kendi aralarında aminoasit düzeyindeki benzerliği ise %99.163 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16, 4.17). PDV izolatlarımızın gen bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid seviyesinde %90.682 oranıyla HM015769 Acc numaralı genbank izolatı ile en yüksek benzerlik gösterdiği, %88.039 oranıyla MK560342 izolatı ile en düşük benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.18). PDV izolatlarına ait NJ (Neighbor Joining) dendogramı incelendiğinde PDV badem izolatlarımızın birbirine çok benzediği ve filogenetik ağaçta aynı grup içinde yer aldığı, gen bankası izolatlarının ayrı bir grupta kümelendiği belirlenmiştir (Şekil 4.19).

✓ Prune dwarf virus isolate 302C movement protein gene, partial cds	978	978	96%	0.0	90.88%	KU949365.1
✓ Prune dwarf virus isolate 113C movement protein gene, partial cds	978	978	96%	0.0	90.88%	KU949359.1
✓ Prune dwarf virus isolate KP23 movement protein (MP) gene, partial cds	996	996	98%	0.0	90.79%	MK392181.1
✓ Prune dwarf virus isolate Kisinevskaja 31 movement protein and capsid protein genes, complete cds	1010	1010	100%	0.0	90.78%	MK369931.1
✓ Prune dwarf virus strain ch 137 movement protein and coat protein genes, complete cds	1010	1010	100%	0.0	90.78%	L28145.1
✓ Prune dwarf virus isolate PDV-SWRRegina movement protein (MP) mRNA, complete cds	1008	1008	99%	0.0	90.77%	HM021231.1
✓ Prune dwarf virus isolate 237C movement protein gene, partial cds	974	974	96%	0.0	90.74%	KU949364.1
✓ Prune dwarf virus isolate BR115 nonfunctional movement protein (MP) gene, partial sequence	990	990	98%	0.0	90.67%	MK392185.1
✓ Prune dwarf virus isolate B138 movement protein (MP) gene, partial cds	992	992	98%	0.0	90.66%	MK392180.1
✓ Prune dwarf virus isolate NS9R3 segment RNA3, complete sequence	1005	1005	100%	0.0	90.65%	KY883330.1
✓ Prune dwarf virus isolate Rube 74 segment RNA3, partial sequence	1005	1005	100%	0.0	90.65%	KU215407.1
✓ Prune dwarf virus isolate 08C movement protein gene, partial cds, and capsid protein gene, complete cds	1003	1003	99%	0.0	90.63%	KU949331.1
✓ Prune dwarf virus isolate 228C movement protein gene, partial cds	969	969	96%	0.0	90.60%	KU949363.1
✓ Prune dwarf virus isolate RS28 movement protein (MP) gene, partial cds	987	987	98%	0.0	90.52%	MK392184.1
✓ Prune dwarf virus isolate P128 movement protein (MP) gene, partial cds	987	987	98%	0.0	90.52%	MK392179.1
✓ Prune dwarf virus isolate D6 movement protein (MP) gene, partial cds	987	987	98%	0.0	90.52%	MK392177.1
✓ Prune dwarf virus isolate 323C movement protein gene, partial cds, and capsid protein gene, complete cds	1001	1001	100%	0.0	90.51%	KU949350.1
✓ Prune dwarf virus isolate 1047C movement protein gene, partial cds, and capsid protein gene, complete cds	1001	1001	100%	0.0	90.51%	KU949337.1

Şekil 4.15. 23 nolu PDV badem izolatının NCBI'da yapılan BLAST analizi sonucu

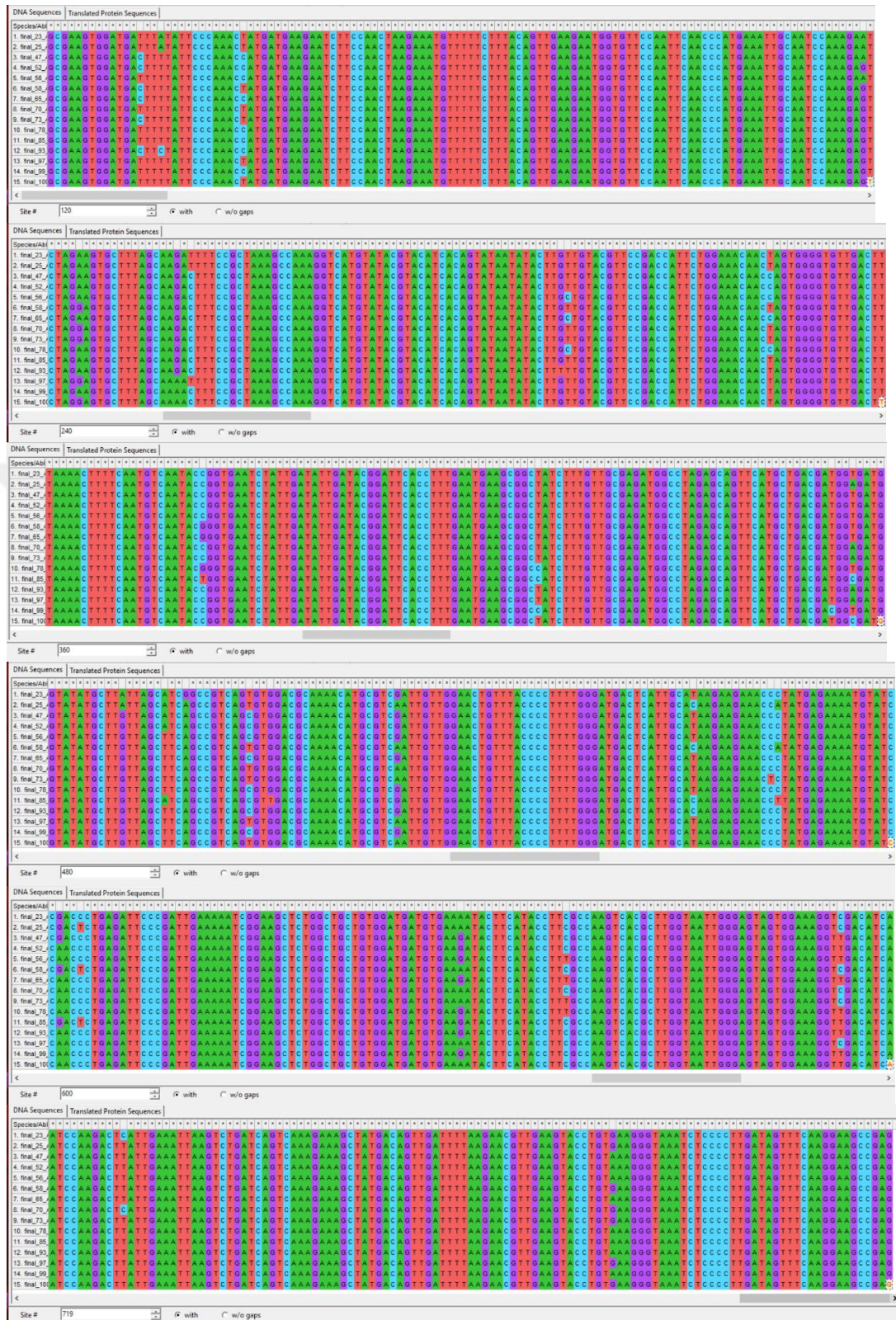
Gen bankasına ülkemizden 30 tane kiraz ve 1 tane kayısı PDV izolatının kaydedilmiş olduğu belirlenmiş ve kayıtlı izolatların hepsinin PDV'nin CP gen bölgesine ait olmasından dolayı Türkiye PDV izolatlarıyla PDV badem izolatları karşılaştırılamamıştır. Gen bankasına kayıtlı 4 adet PDV badem izolatının (2 tanesi İtalya'dan CP gen bölgesi, 1 tane Portekiz'den CP bölgesi ve 1 tane Yunanistan'dan kısmi

RdRp gen bölgesi) kaydedildiği belirlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında PDV'nin MP gen bölgesine spesifik primerler kullanıldığından, Adıyaman ilinden elde edilen PDV izolatları Gen Bankasına kayıtlı badem izolatlarıyla karşılaştırılamamış ve filogenetik analiz yapılamamıştır.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde badem ağaçlarında görülen virüs hastalıklarının moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi çalışmalarında, Hatay ilinden toplanan PDV badem izolatının NCBI'a kayıtlı dünya PDV izolatları ile nükleotit düzeyde % 87-96 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Yegül, 2017).

Species: Adh	1. final_23	2. final_25	3. final_47	4. final_52	5. final_56	6. final_58	7. final_65	8. final_70	9. final_73	10. final_78	11. final_85	12. final_93	13. final_97	14. final_99	15. final_104
DNA Sequences	1. final_23	2. final_25	3. final_47	4. final_52	5. final_56	6. final_58	7. final_65	8. final_70	9. final_73	10. final_78	11. final_85	12. final_93	13. final_97	14. final_99	15. final_104
Translated Protein Sequences	1. final_23	2. final_25	3. final_47	4. final_52	5. final_56	6. final_58	7. final_65	8. final_70	9. final_73	10. final_78	11. final_85	12. final_93	13. final_97	14. final_99	15. final_104

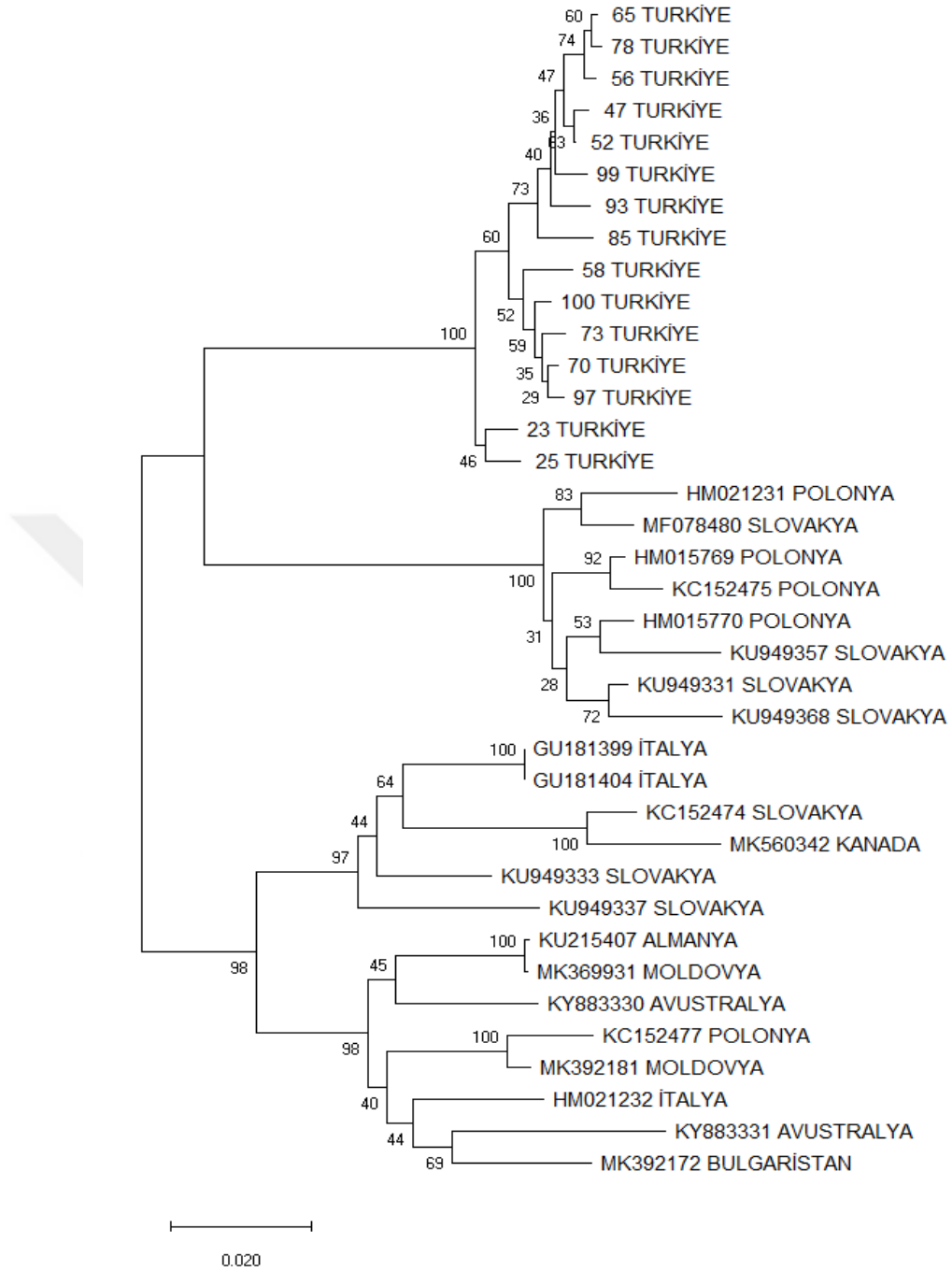
Şekil 4.16. Bademlerden elde edilen PDV izolatlarının aminoasit dizilerinin karşılaştırmaları



Şekil 4.17. Bademlerden elde edilen PDV izolatlarının nükleotid dizilerinin çoklu karşılaştırmaları

[illegible]

33



Şekil 4.19. Adıyaman ilinde badem ağaçlarından elde edilen PDV izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı PDV izolatlarının nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve % 50' nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını (0.02) göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Adıyaman ilimizde uzun yıllardır tarla tarımı en önemli tarımsal uğraş alanı olmasına rağmen, üreticilerin daha değerli bitkisel ürünlere yönelmeleri meyveciliği bir alternatif olarak ortaya çıkarmaktadır. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın Adıyaman'da üreticileri, badem üretimine yöneltmesi sonucu badem yetiştiriciliği yaygınlaşmıştır. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi badem ağaçlarının da patojenlerden ve stres faktörlerinden kaynaklanan hastalıkları vardır. Horst (2008), dünyada badem ağaçlarının 18 fungal, 3 bakteriyel, 2 nematod, 6 adet de virüs hastalığı olmak üzere toplam 29 patojenik hastalıktan zarar gördüğünü bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında Adıyaman ilinde badem bahçelerinde virüs surveyi yapılmış, şüpheli örneklerin elma mozaik virüsü (ApMV), elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV), erik cüceleşme virüsü (PDV), erik nekrotik halkalı leke virüsü (PNRSV) ve eriklerde şarka hastalığı (PPV)'na karşı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmesi sonucu elde edilen izolatların DNA sekans analizi yöntemiyle karakterizasyonu yapılmıştır. Testlenen örneklerde sadece PDV bulunurken (%30.90 enfeksiyon oranı) diğer virüsler bulunamamıştır.

PDV izolatlarının sekans analizi sonucunda, bu izolatların genetik olarak birbirine benzerlik oranının yüksek olduğu (en yüksek %99.584 en düşük %97.197) belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler “ön çalışma” niteliğinde olup, bu çalışmada kullanılan PDV'e özgü primer çiftinin izolatlarımızı tanıyabildiği belirlenmiştir. Testlenen badem örneklerinde ACLSV, ApMV, PNRSV ve PPV'lerinin saptanmaması bu bölgede olmayacağı anlamına gelmediği için gelecekte yapılacak olan çalışmalarda, daha geniş alanların taranarak örnek sayısının artırılması ve virüslere spesifik farklı primer çiftleri kullanılarak yeni PCR yapılması önerilmektedir.

Gerek DAS-ELISA ve gerekse RT-PCR testleri sonucunda Adıyaman ilindeki badem ağaçlarında Prune dwarf virus (PDV)'ünün bulunduğu ilk kez bu çalışma ile kanıtlanmıştır. Adıyaman ilinde yetiştirilen badem ağaçlarının % 30.90 oranında PDV ile bulaşık olması bölgede kurulan ve kurulacak olan badem bahçe ve plantasyonları için tesisleri kurma aşamasında önlemler alınmasını da gerekli kılmaktadır.

Virüslerin etkili bir kimyasal mücadelesi bulunmadığından korunma önlemleri ön plana çıkmaktadır. Yeni kurulacak badem bahçelerinin mutlaka virüsten ari ve sertifikalı fidanlarla oluşturulmasına dikkat edilmeli, bölgede aşı gözü ve fidan üreten tesisler her yıl düzenli olarak bu hastalık yönünden kontrolden geçirilmeli ve bulaşık olan hatlar üretim dışı bırakılmalıdır. Şüphesiz bölgede kurulacak badem plantasyonları ve kapama badem bahçelerinin tesisinde bu virüslerden ari fidan temini ve dikimi yanında, simptomlu badem ağaçlarının eradikasyonu yapılmalıdır.

Türkiye’de meyve ağaçlarında sertifikasyon programları konusunda resmi olarak ilk çalışmalar 1997 yılında başlatılmış olmasına rağmen, programın gerektiği koşullarda yürütülmemesinden dolayı sağlıklı bitkisel materyal elde edilmesi, taşınması ve kullanılması konusunda aksamalar bulunmaktadır. Meyve yetiştiriciliğinin geliştirilmesi için iç karantinaya önem verilmesi gerekmekte ve vakit kaybedilmeden ulusal boyutta sertifikasyon programının başlatılması ve kontrollü bir şekilde uygulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2019. Tarımsal yapı, üretim ve değerleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10.06.2020)
- Azeri, T., 1994. Detection of Virus Diseases in Aegean Region of Turkey. **Proceedings of 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union**, Kuşadası, Aydın, p: 511-513.
- Baloğlu, S., Özaslan, M., Posluoğlu, N. and Yılmaz, M. A., 1995. Adana Ve Tarsus Bölgesinde Yetiştiriciliği Yapılan Erik Ve Şeftali Ağaçlarında Erik Şarka Virüsünün ELISA Testiyle Aranması. **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, 342-344.
- Baloğlu, S., Yılmaz, M. A., Sipahioğlu, H.M., 2001. Malatya ili ve civarındaki Kayıslarda Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması Ve Çözüm Yolları Üzerinde Araştırmalar. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, 222-228.
- Barba, M. and Riccioni, L., 1993. Improvement of diagnostic methods to detect plum pox virus in apricot plants. **Agriculture**, 139- 141.
- Bertozzi, T., Alberts, E., Sedgley, M., 2002. Detection of prunus necrotic ringspot virus in almond: effect of sampling time on the efficiency of serological and biological indexing methodologies. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 42: 207210.
- Bonfield, J.K., Smith, K., and Staden, R. 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Res.** 23: 4992-4999.
- Brunt, H.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., 1996. Viruses of Plants. Descriptions and lists from the VIDE Database. **Cab International**, University Pres Cambridge, U.K., 1484 p.
- Buzkan, N., Öztekin, V., Demir, M., Yalcin-Mendi, Y. And Ilgin, M. 2005a. Detection and control of virus diseases of apricot trees in the collection plot of SEKAMER. KSU. **J. Sci.Eng.** 85: 36-65.
- Buzkan, N., Öztekin, V., Demir, M., Yalcin-Mendi, Y. And Ilgin, M., 2005b. Sanitary status of fruit trees with implementation of clean stocks. **Asian Journal of Plant Sciences** 4 (6): 660-663.
- Clark, M. F. and Adams, A. N., 1977. Characteristics of the micro-plate method of Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**. 34, 475-483.
- Clark, M.F., 1981. Immunosorbent assay plant pathology. **Ann. Rev. Phytopathology**, 19: 83-106.
- Cole, A., Mink, G.I., Regev, S., 1982. Location of Prunus necrotic ringspot virus on pollen grains from infected almond and cherry trees. **Phytopathology**, 72, 1542-1545.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Hadidi, A., 1998. Virus and virus-like diseases of stone fruits in the eastern Mediterranean of Turkey. Proceedings of the 17th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Fruit Tree Diseases. 23-27 June 1997, Bethesda, MD, USA. **Acta Horticulturae** 472 (2): 527-529.
- Çağlayan, K., Sertkaya, G., Ulubaş, Ç., Kolber, M., Krizbai, L., 2004. Characterization of Plum pox virus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. Proceedings of the XIXth International Symposium on Virus and

- Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases. **Acta Horticulturae**, 657: 183-188.
- Desvignes, J.C. Boye, R., 1989. Different diseases caused by chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. **Acta Horticulturae**, 235, 31-38.
- Digiario, M., Savino, V., Di Terlizzi, B., 1992. Ilarviruses in apricot and plum pollen. **Acta Horticulturae**, 309:93-98.
- Dunez, J., 1988. Fruit Crop Sanitation in Mediterranean and Near East Region. Status and Requirements. **FAO**. United Nations Development Programme, 251-259 pp.
- Dunez, J., 2000. Virus and virus-like diseases of stone fruits. **Mediterranean Agronomic Institute of Bari**, Italy, 67 p.
- Elibüyük, I.Ö., and Erdiller, G., 1998. Investigation on the causes of fruit dropping of apricot and plum trees in Ankara province. **Journal of Turkish Phytopathology** 17(3): 98.
- Gazel, M.H., 1997. Hatay Bölgesi Prunus Türlerindeki Virüs Hastalıklarının ELISA Ve Biyolojik Yöntemlerle Tanılanması. **M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı**, Yüksek Lisans Tezi, Antakya.
- Gazel, M.H. ve Çağlayan, K., 1998. Hatay Bölgesi Prunus Türlerindeki Virüs Hastalıklarının ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Ve Biyolojik Yöntemlerle Tanılanması. **VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi** S. 322-327.
- Gilmer, R.M., Nyland, G. and Moore, J.D., 1976. Prune dwarf virus. In: Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America. USDA, Handbook, 437.
- Gümüş, M., Hepaksoy, S., Paylan, İ.C., Eroğul, D., Erkan, S., 2007. Sert çekirdekli meyve türlerinde sertifikalı fidan üretimine yönelik çalışmalar. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi**, Isparta, SDÜ yayınları, 342 s.
- Helguera, P.R., Docampo, D.M., Nome, S.F. and Ducasse, D.A., 2002. Enhanced detection of prune dwarf virus in peach leaves by Immunocapture-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). **J. Phytopathology** 150, 94-96
- Horst, R.K. 2008. Westcott's Plant Disease handbook. 7 th Editon Springer, Berlin, 1317p.
- İlbağı, H., Bostan, H., Çıtır, A., 2008. A natural wild host of some important fruit viruses in Tekirdağ-Turkey. Proceedings of the Twentieth international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops-fruit tree diseases. **Acta Horticulturae**, 781: 33-36.
- Jarrar, S., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., 2001. Viruses of stone fruits in Palestine. Proceedings of the 18Th international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops-top fruit diseases. **Acta Horticulturae**, 550: 245-248.
- Kahn, R.P., 1976. Quarantine and the detection of stone fruit viruses in plant importations. Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. U.S. Dept. **Agric. Handbook**. No. 437, 23-32.
- Kanaan-Atallah, Z.H., Abou-Jawdah, Y., Saad, A., 2000. Virus diseases infecting almond germplasm in Lebanon. **Phytopathol. Mediterr.** 39, 417-422.
- Karabacak, M., 2012. Trakya Bölgesi'nde badem (*Prunus dulcis*) ağaçlarında görülen virüs hastalıklarının saptanması. **Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek lisans tezi, 44 sayfa.

- Koç, G. and Baloğlu, S., 2006. First report of Sharka in the Çukurova region of Turkey **Journal of Plant Pathology**, 88: 65-67.
- Kölber, M., Nemeth, M., Topchiiska, M., Glasa, M., Metlitskaja, T., 2001. Corrent situation of plum pox disease on stone fruit species in Middle and Eastern Europe Proceedings of the 18 th International Symposium on Virus and Virus –like Diseases of Temprate fruit crops. Volume 1. ISHS **Acta Horticulturae** 550, 73-78 pp.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol.** 35(6):1547-1549.
- Kunze, L., 1988. Prune dwarf virus. **In European Handbook on Plant Diseases**, Eds.Smith, Dunez. Lelliot, Philips Blackwell Scientific Publications Ltd, London, 15-17.
- Maniatis, T., Fritisch,E. F., Sambrook, J., 1992. Moleculer Clonning, A laboratory Manuel. CSH Laboratory, 554.
- Martelli, G.P., Candresse, T., Namba, S., 1994. Trichovirus, a new genus of plant viruses. **Archives of Virology**, 134, 451-455.
- Martelli G., Savino V., 1997. Infectious diseases of almond with special reference to the Mediterranean area 1. Bull. **OEPP**. 27:525–534.
- Megahed, E.S., Moore, J.D., 1967. Differential mechanical transmission of prunus viruses from seed of various *Prunus* spp. and from different parts of the same seed. **Phytopathology**, 57, 821.
- Menzel, W., Jelkmann, W., 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.
- Mekuria, G., Ramesh, S.A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., Sedgley, M. 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). **Journal of Virological Methods**, 114: 65-69.
- Miguel, C., Sanchez, A., Martins, M., Oliveira, M.M., Nolasco, G., Raquel, M.H., Ferreira, E.L. 1998. *In vitro* culture and improvement of Portuguese almond varieties. Second international symposium on pistachios and almond. **Acta Horticulturae**, 470: 562-569.
- Milusheva, S.A., Borisova, A.Z., 2005. The incidence of prunus necrotic ringspot and prune dwarf viruses in *Prunus* species in South Bulgaria, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 19:sup1, 42-45.
- Mullis, K.F., Faloön, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., 1986. Spesific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia. **Quant. Biol.**, 51: 263-273.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G.P., 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. **Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits with Particular Reference to the Mediterranean Region**, 15–23.
- Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit trees, **Akademia Kiado**, Budapest, 841.
- Nemeth, M., 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. **EPPO Bull.** 24, 525-536.

- Nyland, G., Gilmer, R.M., Moore, J.D., 1976. Prunus ringspot group, In: Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. U.S. Dep. **Agric. Handb**, pp 104-132.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T., Asensio, M. 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. **Journal of Virological Methods**, 68: 127–137.
- Ong, C.A., 1987. Separation and characterization of nucleoprotein components of prunus necrotic ringspot virus isolates. Washington State University, PhD Thesis, Pullman. p142
- Öztekin, V., 2006. K.S.Ü. sekamer koleksiyon parselindeki badem ağaçlarında virüs hastalıklarının serolojik teşhisleri ve kontrolü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 43s,
- Predajňa, L., Sihelská, N., Benediková, D., Šoltys, K., Candresse, T., Glasa, M., 2017. Molecular characterization of prune dwarf virus cherry isolates from Slovakia shows their substantial variability and reveals recombination events in PDV RNA3. **Eur J Plant Pathol** 147, 877–885.
- Rosner, A., Maslenin, L., Spiegel, S., 1997. The use of short and long PCR products for improved detection of Prunus necrotic ringspot virus in woody plants. **Journal of Virological Methods**, 67: 135-141.
- Rosner, A., Shibolet, Y., Spiegel, S., Krisbai, L., Kölber, M., 1998. Evaluating the use of immunocapture and sap-dilution PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus. In: 17 th. International Symposium On Fruit Tree Virus Diseases. Ed. A. Hadidi, **Acta Horticulturae**, 472: 227-233.
- Rott, M.E., Jelkmann, W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, 107:411-420.
- Saade, M., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallás, V., 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. **Phytopathology**, 90: 1330–1336.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** 4:406–425.
- Sertkaya, G., Ulubaş, S.Ç., Çağlayan, K., 2003. Detection and characterization of plum pox potyvirus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP analysis in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 27: 213-220.
- Sertkaya, G., Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., 2004. Detection of some viruses of stone fruits in mother plant blocks in Eastern Mediterranean Region of Turkey. **Acta Horticulturae**, 657: 127-132.
- Silva, C., Tereso, S., Nolasco, G., Oliveira, M.M. 2003. Cellular location of prune dwarf virus in almond sections by insitu reverse transcription-polymerase chain reaction. **Phytopathology**, 93: 278-285.

- Sipahioğlu, H.M., Myrta, A., Abou-Ghanem, N., Di Terlizzi, B., Savino, V., 1999. Sanitary status of stone fruit trees in East Anatolia (Turkey) with particular reference to apricot. **OEPP/EPPO Bulletin**, 439-442.
- Sipahioğlu, H.M., Usta, M., Ocak, M., 2007. virüsten ari sert çekirdekli meyve fidanı üretimi. TUBİTAK Proje No: TOVAG 1050641.
- Smith, K.M., 1972. A textbook of plant virus diseases. Academic Press. New York and London. 684 p.
- Spiegel, S., Holland, D., Tam, Y., Bar-Yaakov, I., Maslenin, L., Rosner, A., 2004. Prunus necrotic ringpot virus isolates in stone fruit germplasm accessions and cultivars in Israel. **Annals of Applied Biology**, 144: 229-236.
- Sutic, D.D., Ford, R.E., Tomic, M.T., 1999. Handbook of plant virus diseases. C.R.C press. 553p. New York. USA.
- Swenson, K.G. and Milbrath, J.A., 1964. Insect and mite transmission test with the prunus ringspot virus. **Phytopathology** 54: 399-404.
- Tolay-Arkan, F.E., 2002. Kahramanmaraş yöresindeki sert çekirdekli meyve türlerinde görülen bazı virüs hastalıklarının ELISA yöntemiyle tanısı. **K.S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi, 30s.
- Ulubaş Serçe., Ç., Ertunç, F., Öztürk, A., 2009. Identification and Genomic Variability of Prune dwarf virus Variants Infecting Stone Fruit Trees in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 157(5), 298-305.
- Uyemoto, J. K., Luhn, C. F., Asai, W. K., Beede, R., Beutel, R. and Fenton, R., 1989. Incidences Of Ilarviruses In Young Peach Trees In California. **Plant Disease**, 73: 217-220.
- Uyemoto, J.K. and Scott, S.W., 1992. Important Diseases of Prunus Caused by Viruses and Other Graft- Transmissible Pathogens in California and South Carolina. **Plant Disease** 76: 5-11.
- Varveri, C., Holeva, R., Bem, F.P., 1997. Effect of sampling time and plant part on the detection of two viruses in Apricot and Almond by ELISA. **Annales de l'Institut Phytopathologique**, Benaki. 18(1):25-33.
- Yegül, M., 2017. Doğu Akdeniz Bölgesinde Badem ve Ceviz Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması, Karakterizasyonu ve Bazı Çeşit Davranışlarının Belirlenmesi. **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** Doktora Tezi, 197 s.
- Yıldızgördü, K.Ç., Çalı, S., 1994. Occurrence and detection of virus and virus-like diseases of plum and apricot trees in the eastern Mediterranean area. **Proceedings of 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union**, Aydın. 551-553,
- Yorgancı, Ü., Erkan, S., Gümüş, M., Gülcan, R., 2001. Malatya'daki kayısı çeşitlerinin bazı virüs hastalıkları açısından değerlendirilmesi. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi** (3-8 Eylül, 2001), Tekirdağ, 205-208.
- Yüzer, D., 2008. Kahramanmaraş'ta badem cadısüpürgesi (*Candidatus* Phytoplasma phoenicum) fitoplazma hastalığının moleküler teşhisi. **Kahramanmaraş Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** Yüksek lisans Tezi, 24 s

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1991 yılında Adıyaman ili Kahta ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokul öğrenimini Hacı Bey ilköğretim okulunda, lise eğitimini Kahta lisesinde tamamladı. 2009-2011 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Nizip MYO’nda Gıda Teknolojisi Bölümünü tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümüne dikey geçiş hakkı kazandı ve 2015 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Özel bir firmada Tarım Danışmanlığı yapmaktadır.



EKLER

EK 1. DAS-ELISA testinde kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri (1000 ml)

Kaplama Tamponu (Coating Buffer) pH: 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaN ₃	0.20 g
NaHCO ₃	2.93 g

Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer) pH: 7.4

NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄ X 12H ₂ O	0.20 g
NaN ₃	0.20 g
KCl	0.20 g
KH ₂ PO ₄	2.90 g

Yıkama Tamponu (PBST Buffer)

pH:7.4	
PBS Buffer	999.50 ml
Tween 20	0.50ml

Örnek Ezme Tamponu (Extraction Buffer) pH: 7.4

PBST	1000.0 ml
Polyvinylpyrrolidone (MV= 40000 K=40)	20.00 g

Konjugat Tamponu (Conjugate Buffer) pH: 7.4

PBST	1000.0 ml
Polyvinylpyrrolidone (MV= 40000 K=40)	20.00 g
Ovalbumin	2.00 g
NaN ₃	0.20 g

Substrat Tamponu (Substrat buffer) pH: 9,8

Diethanolamin	97.00 ml
NaN ₃	0.20 g
Karışım d ₂ H ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

EK 2. RNA ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri

Silika RNA Ekstraksiyon Buffer (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

Tris- Base	24,2 g
LiCl	12,66 g
SDS	15 g
EDTA	2,92 g veya 3,72 g EDTA*2H ₂ O
Sodium Deoxycholate	10 g
NP- 40	10 ml
% 1 β -MCE (kullanılmadan hemen önce eklenmelidir)	

5,8 M Potasyum Asetat (pH:6.5) (100 ml)

60 ml 5 M Potasyum Asetat (pH:7.5)
28,5 ml H ₂ O
11,5 ml Glecial asetic asit
1 M Katı Potasyum Asetat

Silica Washing Buffer (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

10 mM Tris- HCl (pH:7.5)
1 ml 0,5 M EDTA
1 ml 5M NaCl
500 ml % 100 EtOH
479 ml sterile H ₂ O

TE Buffer (pH:8) (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

1 M Tris- HCl (pH:8)	10 ml
0,5 M EDTA	2 ml
Sterile H ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

EK 3. AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (Maniatis ve ark., 1992)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8 10 ml

0.6 Glacial acetic acide 5.71 ml

Trizma base 24.2 g

Çözelti 100 ml d₂H₂O' ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue 15 ml

Glycerol 18 g

TAEX50 6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0.5XTAE 200 ml

Ethidium bromide 200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

1 gr agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun 15-20 dakika süreyle donması beklenmiştir. 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir