

PAPER DETAILS

TITLE: Dogu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastaliklarinin saptanmasi ve karakterizasyonu

AUTHORS: Mahmut YEGÜL,Saadettin BALOGLU

PAGES: 71-84

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1026069>

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Determination and characterization of several virus diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region

Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu

Mahmut YEGÜL^a, Saadettin BALOĞLU^b

^a Directorate of Biological Control Research Institute, Kışla Street, 01321, Yüreğir/Adana, Turkey

^b Cukurova University Faculty of Agriculture Department of Plant Protection, Sarıçam/ADANA

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.601901](https://doi.org/10.16955/bitkorb.601901)

Received : 05.08.2019

Accepted : 18.01.2020

Keywords:

Almond, virus, ELISA, PCR.

* Corresponding author: Mahmut YEGÜL

✉ yegulmahmut@gmail.com

ABSTRACT

Recently, production of almond has tended to increase in the Mediterranean countries as well as in Turkey. As in all plants, almond also suffer from viral diseases leading to qualitative and quantitative losses. Distribution of Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), Plum pox virus (PPV), Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple mosaic virus (ApMV) and Cherry leaf roll virus (CLRV) diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region were investigated and its molecular and biological characterization were performed with this study. During the surveys conducted between 2012-2016, 605 almond leaf samples were collected and tested by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) from 5 provinces of the Eastern Mediterranean Region. 169 almond samples (27.93%) of 605 were found to be infected by at least one virus. Of these, 26 of 129 samples (20.16%) in Adana, 90 of 299 samples (30.10%) in Mersin, 11 of 71 samples (15.49%) in Kahramanmaraş, 34 of 89 samples (38.20%) in Hatay and 8 of 17 samples (47.06%) in Osmaniye were found to be infected at least one virus. While PNRSV, PDV, ACLSV and mixed infection were detected at rate 64%, 18%, 11% and 7% respectively, ApMV, PPV, and CLRV were not found in tested samples. Genomic regions containing the coat protein (CP) gene was reproduced by RT-PCR, resulting in bands of 616 bp for PNRSV, 862 bp for PDV and 358 bp for ACLSV. As they are similar in nucleotide level with 97-99% of the world PNRSV isolates registered to NCBI, 87-96% with PDV isolates, and 81-96% with ACLSV isolates of almond, it is considered that these pathogens spread due to the trade of plant materials.

GİRİŞ

Ülkemizin Doğu Karadeniz kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylaları dışındaki her bölgesinde badem yetiştirilmektedir.

Badem yetiştiriciliği Ege Bölgesinde yoğunlaşmış olup, bunu Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Marmara Bölgeleri izlemektedir (TÜİK 2019). 2018 yılı üretim rakamlarına göre Türkiye 100.000 tonluk badem üretimi ile dünyada beşinci sırada yer almaktadır (FAO 2019).

Ülkemizde son yıllarda mevcut üretim alanlarına ek olarak her yıl devlet teşvik ve destekleri ile özellikle orman vasfını kaybetmiş alanlarda yeni badem bahçeleri tesis edilmektedir. Diğer ürünlerde olduğu gibi badem yetiştiriciliğinde de üretimi sınırlayan birçok biyotik ve abiyotik faktör söz konusudur. Biyotik faktörler içinde yer alan virüslerin, üretim materyali, aşı, polen, böcek gibi vektörler ile taşınma ve yayılmalarının kolay olması, bu hastalıklara karşı kimyasal mücadelenin olmaması, ürünün kalite ve kantitesine değişen oranlarda etki etmesi nedeniyle, diğer hastalık ve zararlılara göre yetiştiricilikte önemleri bir kat daha artmaktadır. Badem üretim alanlarında önemli virüs hastalıklarının tespit edilmesi, yaygınlıklarının belirlenmesi, gerekli bitki koruma önlemlerinin alınması açısından son derece önemlidir.

Badem ile ilgili bitki sağlığı konusunda yapılan çalışma sayısı diğer sert çekirdekli meyvelere göre daha azdır (Diekmann and Putter 1996, Ogawa et al. 1995). Sert çekirdeklielerde ve bademde bugüne kadar değişen önemde birçok virüs hastalığının zarar yaptığı ve değişik etmenlerin farklı isimlerle anılan hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir (Nemeth 1986). Virüsler badem ağaçlarında, büyük çoğunluğu yaprakta ve meyvede renk bozulmalarına, gövdede deformasyonlara, üründe kayıplara ve aşı uyumsuzluklarına, hatta ileri aşamalarda ağaç ölümlerine neden olmaktadır (Ogawa et al. 1995). Digiaro et al. (1992) bademde ekonomik zarar yapan virüslerin PDV, PNRSV, PPV, ACLSV ve ApMV olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışma, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Hatay ve Osmaniye) sert çekirdekli meyvelerden bademde virüs hastalıklarının belirlenmesi ve karakterizasyonu ile ilgili olarak 2012-2016 yılları arasında yürütülmüş, çalışma sonucunda yapılan anketler ile bademde CLRV, PNRSV, PDV, PPV, ACLSV ve ApMV hastalık etmenlerinin varlığı araştırılmış, badem yetiştirilen alanlardaki yaygınlığı tespit edilmiştir. Çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesi badem ağaçlarındaki önemli viral hastalık etmenlerinin bahçe ve doğal koşullarda meydana getirdiği belirtiler saptanmış ve saptanan izolatların moleküler farklılıkları belirlenmiş NCBİ'ye kayıtlı dünya izolatları ile akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur. Söz konusu bu virüsler, aynı zamanda ülkemiz karantina ve sertifikasyon listesinde de yer alan etmenlerden olması nedeniyle ayrıca önem arz etmektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ile virüs hastalıklarından dolayı oluşan kalite ve

kantite kayıplarının azaltılması için yapılan mücadeleye katkı sağlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Sürvey alanından örnek toplanması

Örnekler Doğu Akdeniz Bölgesindeki Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Hatay ve Osmaniye illerindeki kapama bahçe ve doğal olarak yetişen badem alanlarından ve ticari üretim yapan fidanlıklardan 2012-2016 yılları arasında toplanmıştır. Sürveyler düşük rakımlı sıcak bölgelerde ilkbaharda ve erken yaz mevsiminde (Mayıs-Haziran), rakımın yüksek olduğu nispeten serin yayla bölgelerinde ise vejetasyon dönemi boyunca yapılmıştır. Çalışmada badem dışında viral hastalık semptomu gösteren diğer meyve ağaçları, orman bitkileri ve yabancı otlardan da örnekler alınmıştır. Alınan örnek sayısı sürvey çalışmalarına başlanan yılda, o ildeki ağaç varlığına bağlı olarak hesap edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Doğu Akdeniz Bölgesi badem üretim değerleri (TÜİK, 2011)

İLLER	Toplu Meyve Alanı (da)	Toplam Ağaç sayısı	Alınması planlanan örnek sayısı (%0,01)
Adana	2.498	84.260	85
Mersin	5.589	316.257	316
Kahraman-maraş	2.254	69.872	70
Osmaniye	675	21.070	21
Hatay	685	61.047	61
Toplam	11.692	525.506	553

Sürveylerde öncelikle belirti gösteren şüpheli örnekler seçilmiş herhangi bir belirtiye rastlanmadığı durumlarda örnekleme tesadüfî usule göre yapılmıştır (Bora ve Karaca 1970). Toplanan örnekler buz kutusuna konularak laboratuvara getirilmiş ve +4°C'de "Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (DAS-ELISA) testi yapılarak kadar muhafaza edilmiştir (Levy et al. 2000). DAS-ELISA testi kitlerin alındığı firma önerileri (Bioreba, İsviçre) dikkate alınmış ve Clark and Adams (1977)'a göre yapılmıştır.

Moleküler çalışmalarda kullanılacak örnekler ise -20°C'de saklanmıştır. İncelenen ve örnek alınan badem ağaçlarının yeri, ağaçlarda nasıl belirtiler gözlemlendiği, fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Ayrıca, örnek alınan ağaçlar, sprey boya ile numara verilerek işaretlenmiştir.

Biyolojik tanılama çalışmaları

İndikatör bitkilerin yetiştirilmesinde 1:1:1 oranında torf, toprak ve kumdan oluşan karışım kullanılmıştır. Etüvde sterilize edilen karışım fide ve fidan yetiştirmek amacı ile küvet ya da kasalara doldurularak tohumlar ekilmiştir. İndikatör bitki tohumları çimlenme sürecini tamamlayıncaya kadar ışık ve sıcaklık kontrolüne sahip iklim odasında tutulmuştur. Tohumların çimlenmesini takiben fideler 2-3 yapraklı döneme ulaştıklarında aynı karışım ile doldurulmuş 10 cm çapında ve 15 cm yüksekliğindeki plastik saksı veya aynı ölçülerdeki siyah polietilen torbalara şaşırtılmıştır. Bu işlem çalışma süresince rutin olarak her zaman hazır test bitkisi olması amacıyla yapılmıştır.

Mekanik inokulasyon

DAS-ELISA ve RT-PCR ile test edilen örneklerden enfekteli olan ve olmayan örneklerin %10'luk kısmını temsil edecek şekilde mekanik inokulasyon için Çizelge 2'de verilen otsu ve odunsu indikatör bitkiler kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmaları 2012-2016 yılları arasında Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü iklim odalarında

gerçekleştirilmiştir. Reyes et al. (2002)'nin bildirdiği yöntemeye göre Çizelge 2'de belirtildiği gibi indikatör bitkiler indekseleme büyüklüğüne ulaştığında, inokule edilecek bitkilerin %10'unu temsil edecek şekilde alınan çiçek, kabuk, yaprak ve meyve dokuları kullanılarak inokulasyonlar yapılmıştır. Daha sonra test bitkileri, iklim odalarında (25-26°C, %60-70 nisbi nem, 4000 lüks ışık şiddeti ve 16 saat fotoperiyot) bekletilmiş, simptom oluşumları 2-24 gün süreyle günlük periyotlarla gözlenmiş ve kayıt edilmiştir. İndikatör bitkiler simptom görülen süre zarfında ve 24 günün sonunda DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir (Saraçoğlu ve Erkan 2016). Mekanik inokulasyon çalışmaları her tekerrürde 1 bitki olmak üzere 3 tekerrürlü ve kontrolde de 1 bitki olmak üzere toplam 4 adet indikatör bitki kullanılarak yürütülmüştür (Birişik 2009).

Odunsu indikatör bitkilere aşılama Nemeth (1986)'in belirttikleri yöntemeye göre göz veya doku parçası aşılama yoluyla yapılmıştır. Değişik bölgelerden toplanan ve enfekteli olduğu belirlenen 5 örnek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İndeksleme çalışmalarında her örnek için 4-6 adet odunsu indikatör bitki kullanılmıştır (Desvignes 1999). Bütün indikatör bitkiler aşılama sonrası gözlenmiş ve semptomlar kayıt altına alınmıştır. Bitkiler aşılama sonrası 3 ay sonrasına kadar her hafta testlenmiş ve virüslerin taşınım taşımadığı serolojik ve moleküler olarak kontrol edilmiştir.

Serolojik çalışmalar

Araziden toplanan örnekler virüslere spesifik antiserumlar

Çizelge 2. Mekanik inokulasyon ve indekselemede kullanılan otsu ve odunsu bitkiler

Otsu Test Bitkileri	Testleme Dönemi	Odunsu Test Bitkileri	Testleme Dönemi
<i>Chenopodium quinoa</i>	4-8 yapraklı fide	<i>Prunus persica</i>	1 yıllık çöğür
<i>C. amaranticolor</i>	4-8 yapraklı fide	<i>P. persica</i> GF 305	1 yıllık çöğür
<i>Cucurbita pepo</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. persica</i> GF677	1 yıllık çöğür
<i>Cucumis sativus</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. amygdalus</i>	1 yıllık çöğür
<i>C. maxima</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. domestica</i>	1 yıllık çöğür
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5-6 yapraklı fide	<i>P. persica</i> Garnem	1 yıllık çöğür
<i>N. glutinosa</i>	5-6 yapraklı fide	<i>P. mahlep</i>	1 yıllık çöğür
<i>N. occidentalis</i>	5-6 yapraklı fide	<i>Juglans regia</i>	1 yıllık çöğür
<i>N. rustica</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>N. tabacum cv. Xanthi</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>N. tabacum cv. Samsun</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2-4 yapraklı fide		

(Bioreba, İsviçre) kullanılarak Clark and Adams (1977) tarafından önerilen yöntemle göre DAS-ELISA ile testlenmiştir. Bütün örnekler çift tekerrürlü olarak analiz edilmiş ve sonuçlar ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Negatif kontrolün iki katı ve üzeri absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Helguera et al. 2002).

İndikatör bitkilere taşınan virüslerin *saptanma zamanının belirlenmesi*

Daha önceden pozitif olduğu serolojik ve moleküler olarak tespit edilen izolatlardan (PDV için Hty-Yayladağı-Badem1 ve PNRSV için Mer-Er-B1) aşı gözü alınarak kontrollü koşullarda tutulan GF-305 indikatör bitkisine 2 adet göz aşısı yapılarak virüslerin taşınması amaçlanmış ve periyodik olarak her ay virüsün bitki dokularında saptanabilme zamanının tespiti için DAS-ELISA testi yapılmıştır. Böylece indeks bitkilere taşınan virüslerin ne kadar süre sonra bitki dokularında serolojik olarak pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Moleküler çalışmalar

Bulaşık bitki dokularından total nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları

Araziden toplanan ve DAS-ELISA'da pozitif sonuç veren örneklerden nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Plant RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Scientific, USA) ile RNA izolasyonu firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. RT-PCR, Thermo Scientific firmasının Verso 1-step RT-PCR Hot-Start kit protokolüne göre; 1 örnek için toplam 25 µl hacimde PCR karışımı (0,5 µl Verso enzim, 12,5 µl 2x master mix, 1,25 µl RT Enhancer, 1 µl Primer R, 1 µl Primer F, 6,75 µl ddH₂O ve 2 µl RNA) hazırlanmıştır. RT-PCR için kullanılan primer dizilimi, beklenen bant büyüklüğü ve PCR döngü programı Çizelge 3'e göre ayarlanmıştır.

Agaroz jel elektroforez çalışmaları

RT-PCR çalışmalarından elde edilen ürünler %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüş ve ethidium bromid ile boyanarak UV altında fotoğrafları çekilerek bantlar görüntülenmiştir.

Dizi analizleri ve filogenetik analiz çalışmaları

RT-PCR çalışmalarından sonra doğru ürün boyutuna sahip PCR ürünleri doğrudan sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizinde kullanılmak üzere her virüs için 50 µl hacimde RT-PCR yapılmıştır. Dizileme işlemleri Genoks (Ankara) ve Macrogen (Güney Kore) ticari firmalarından hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları filogenetik analizler için MEGA-6 programında Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılarak hem NCBI'daki

dünya izolatları ile hem de izolatların nükleotit düzeyde kendi aralarındaki akrabalık derecelerine bakılmış ve izolatlar arasındaki farklılık araştırılmıştır (Saitou and Nei 1987).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sürvey alanlarındaki makroskobik gözlemler

Sürveyler sırasında yapılan gözlemlere göre badem ağaçlarında ilkbaharda yapraklar henüz taze ve yaprak dokusu inceyken PNRSV semptomları daha belirgin olmakta, yapraklar yaşlandıkça yaprak dokusu kalınlaşmakta ve semptomlar maskelenmektedir. Dal Zotto et al. (1999) da PNRSV semptomlarının ilkbaharda görülmesine karşın bu semptomların yaz aylarında kaybolduğunu belirtmiştir.

ACLSV'nin diğer sert çekirdekli meyve ağaçlarında olduğu gibi bademde de belirgin semptomlar oluşturmadığı, latent enfeksiyona neden olduğu, diğer ağaçlara oranla büyümede gecikme, geç yaprak ve çiçeklenmeye neden olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Myrta et al. (2011) ACLSV'nin kayısı ağaçlarında çok fazla ve şiddetli hastalık yaptığını, sert çekirdekli birçok çeşitte enfeksiyonların çoğunlukla semptom oluşturmadığını ve latent enfeksiyonların çok sık görüldüğünü bildirmiştir.

Bademde erken ilkbaharda vejetasyonun başlamasıyla beraber yapraklarda renk açılması, yaprak kenarlarında dişlilik gibi PDV semptomları görülmüş, vejetasyonun ilerlemesi ile bu semptomların kaybolduğu gözlenmiştir. Yegül ve Baloğlu (2019) PDV'nin serolojik olarak tespitinin en uygun zamanının ilkbahar ayları olduğunu belirtmiştir. PDV ile enfekteli bitkilerde, büyüme ve gelişmede yavaşlama, boğum aralarının kısalması ve bodurluk semptomları gözlenmiştir. Bazı ağaçlarda ise zamanla kuruma ve ölüme kadar giden belirtilere rastlanmış, odunsu indikatörlerle yapılan indeksleme çalışmalarında GF-305 ve *P. persica* bitkilerinden birer tanesi aşılama bir yıl sonra kurumuşlardır.

Sürvey ve teşhis çalışmalarının değerlendirilmesi

Çalışma boyunca virüs belirtilerine benzer belirtiler gösteren 605 adet badem ile 10 adet farklı bitkilerden (kiraz, nektarin, elma, armut, *Anagyris foetida* ve yabancı ot) olmak üzere, toplamda 615 adet örnek alınarak analiz edilmiştir.

Sürveylerde Mersin'den 299 örnek, Adana'dan 129, Hatay'dan 89, Kahramanmaraş'tan 71 ve son olarak gerek üretim ve gerekse ağaç varlığı bakımından bölgede listenin son sırasında yer alan Osmaniye'den 17 örnek toplanmıştır. Çalışmada badem için alınan ve enfekteli bulunan örnek sayıları Çizelge 4 ile Şekil 1 ve Şekil 2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerlere ait baz dizimleri, RT-PCR sonrası beklenen bant büyüklükleri ve RT-PCR protokolleri

Primer	Büyüklik (bp)	Referans	RT-PCR Döngüsü
PPV-P1-R 5'-GTCTCTTGCACAAGAACTATAACC-3' PPV-P2-F 5'-GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA-3'	220	Hadidi ve Levy (1994)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 62°C/30s, 72°C/1dk) 30 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
PDV-R:5'-AAAGAAGAGAAGTCCGACAAG 3' PDV-F:5'-AAGCAGCATTTCCAACACTACGA 3'	862	Vaskova et al. (2000)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 57°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
ACLSV-A52-R:5'-CAG ACC CTT ATT GAA GTC GAA-3' ACLSV-A53-F:5'-GGC AAC CCT GGA ACA GA -3'	358	Candresse et al. (1995)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 55°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
PNRSV-R:5'-TCA CTC TAG ATC TCA AGC AG -3' PNRSV-F:5'-GAG CTC TGG TCC CAC TCA GG -3'	616	Spiegel et al. (1996)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 54°C/30s, 72°C/1dk) 40 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
ApMV-R:5'-CCGGTGGTAACTCACTCGTT 3' ApMV-F:5'-CGTAGAGGAGGACAGCTTGG3'	450	Hassan et al. (2006)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 55°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
CLRV-R 5'-TTGGCGACCGTGTAACGGCA -3' CLRV-F 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG -3'	431	Grieco et al. (2000)	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 50°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)

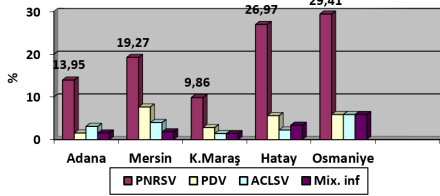
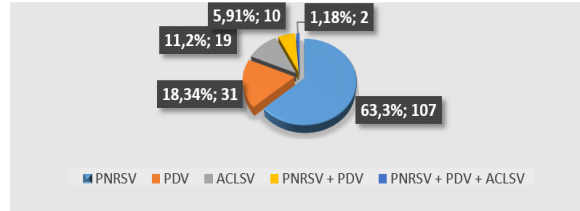
Yapılan çalışmalar sonucu toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (%27,93) en az bir virüs ile enfekteli bulunmuştur. Badem ağaçlarında tespit edilen virüs hastalıkları içinde PNRSV, 107 örnek ve %63,3 enfeksiyon oranı ile ilk sırada yer almıştır. PDV ile enfekteli 31 örnek bulunmuş ve %18,34'lik enfeksiyon oranı ile ikinci sırada yer almıştır. ACLSV ile enfekteli 19 örnek tespit edilmiş ve %11,2'lik oranla en az tespit edilen viral etmen olmuştur. Ayrıca bu üç virüsten en az ikisi ile bulaşık veya üç virüsün de tespit edildiği karışık enfeksiyonlu 12 örnek belirlenmiş, tüm virüsler içerisinde %7 oranında bulunmuştur. Bu örneklerden 2

tanesi PNRSV+PDV+ACLSV ile enfekteli (%1,18) diğer 10 tanesi ise PNRSV+PDV ile enfekteli (%5,91) olarak tespit edilmiştir. Testlenen örneklerin hiç birinde ApMV, PPV ve CLRV tespit edilememiştir.

Bu sonuçlara benzer olarak Karabacak ve İlbağı (2013) Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında %31,15 PNRSV, %4,23 PDV, %1,92 PPV, %1,54 PNRSV+PDV ile PNRSV+PPV karışık enfeksiyonu ve %38,85 oranında virüs enfeksiyonunu olduğunu bildirmişlerdir. Milusheva ve Borisova (2005) bu çalışmadaki gibi, Bulgaristan'da bademlerde PNRSV'yi %15

Çizelge 4. Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR ile tespit edilen virüslerin illere göre toplu sonuçları

İLLER	Toplam örnek sayısı	Virüs ile enfekteli örnek miktarı													
		PNRSV		PDV		ACLSV		PNRSV + PDV		PNRSV + PDV + ACLSV		Karışık enf. toplamı		İl Bazında Bulaşıklık	
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
Adana	129	18	13.95	2	1.55	4	3.10	2	1.55	-	-	2	1.55	26	20.16
Mersin	299	53	17.73	21	7.02	11	3.68	3	1.00	2	0.67	5	1.67	90	30.10
K.Maraş	71	7	9.86	2	2.82	1	1.41	1	1.41	-	-	1	1.41	11	15.49
Hatay	89	24	26.97	5	5.62	2	2.25	3	3.37	-	-	3	3.37	34	38.20
Osmaniye	17	5	29.41	1	5.88	1	5.88	1	5.88	-	-	1	5.88	8	47.06
TOPLAM	605	107	17.67	31	5.12	19	3.14	10	1.65	2	0.33	12	1.98	169	27.93

**Şekil 1.** Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR ile tespit edilen virüslerin iller bazında yüzde oranları**Şekil 2.** Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR sonuçlarına göre saptanan virüslerin yüzde oranları

ve PDV'yi %8,6 oranında en fazla enfeksiyon yapan hastalıklar olarak saptamışlardır. Yine benzer şekilde Maliogka et al. (2010) Yunanistan'da badem ağaçlarında yaptığı survey çalışmalarında PNRSV'yi %41 ve PDV'yi %21,5 ile en fazla enfeksiyon yapan viral etmenler olarak bulmuş ve ApMV'yi ise tespit edememiştir. Bu çalışmada da tespit edildiği gibi PNRSV, PDV ve ACLSV karışık enfeksiyonu sert çekirdekli meyvelerde sıklıkla görülen bir durumdur (Çevik et al. 2011, Myrta and Savino 2008).

Otsu İndikatör Bitkilerde Biyolojik Karakterizasyon Çalışmaları

Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucu hastalık etmenlerinin indikatör bitkiler üzerindeki belirtileri Çizelge 5'de verilmiştir.

PNRSV izolatları (Mer-Er-B1 ve Ad-Bal-B1) ile yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında 24 günün sonunda, *C. quinoa*'da klorotik lokal lekeler, *C. amaranticolor*'da

klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar, *C. sativus*'ta klorotik lokal lezyonlar, kloroz, mozaik ve damar açılması, *C. pepo*'da sistemik kloroz ve bodurluk semptomları gözlenmiş ve yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde PNRSV'nin bu test bitkilerine aktarılabilirdiği saptanmıştır. *N. benthamiana*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *C. maxima* ve *N. tabacum* cv. Samsun test bitkilerinde ise herhangi bir belirti oluşumu gözlenmemiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde de PNRSV bu test bitkilerine aktarılamadığı saptanmıştır.

Bulduğumuz sonuçlara benzer olarak Sertkaya (2010) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik lokal lekeler ve *C. sativus*'ta sistemik mozaik, kloroz ve damar açılması oluşturduğunu rapor etmiştir. Cichal ve Rejczak (2011) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik lekeler oluşturduğunu bildirirken Salem et al. (2003) PNRSV'nin *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik halkalı lekeler, *C. sativus*'ta klorotik lokal lezyonlar, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N.*

Çizelge 5. Mekanik inokulasyon çalışmalarında virüs izolatlarının otsu indikatör bitkilerde neden olduğu belirtiler

Belirtiler*			
İndikatörler	PNRSV (Mer-Er-B1 ve Ad-Bal-B1)	PDV (Hty-Yay-1)	ACLSV (Mer-Erd 1 BADEM)
<i>C. quinoa</i>	KLL	KLL	KLL,NLL
<i>C. amaranticolor</i>	KLL,NLL	KLL,NLL	KLL,NLL
<i>N. benthamiana</i>	S	S	S
<i>N. occidentalis</i>	S	K	S
<i>N. rustica</i>	S	LS	S
<i>N. glutinosa</i>	S	YŞB	S
<i>N. tabacum cv. Xanthi</i>	S	K	S
<i>C. sativus</i>	DA, K, B	M, K, LN	S(+)
<i>C. pepo</i>	K, B	K, B	S
<i>C. maxima</i>	S	DAA	S
<i>N. tabacum cv. Samsun</i>	S	S	S
<i>P. vulgaris</i>	S	S	YŞB, NLL

*S:Semptom yok; KLL: Klorotik lokal lezyon; NLL: Nekrotik lokal lezyon; M: Yapraklarda mozaik; YŞB: Yapraklarda şekil bozukluğu ve deformasyon; DA: Yapraklarda damar açılması ve sararması; K: Sistemik kloroz; DAA: Damarlar arası renk açılması; LS: Lokal sararma; Mer-Erd 1: Mersin-Erdemli; Hty-Yay-1: Hatay-Yayladağı.

glutinosa ve *N. tabacum cv. Xanthi* test bitkilerinde herhangi bir belirti oluşturmadığını bildirmişlerdir. Aly et al. (2008) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik ve nekrotik lokal lekeler, beneklenme, *C. amaranticolor*'da nekrotik lokal lekeler, *C. pepo*'da beneklenme ve kabarcıklar, *C. sativus*'ta damar açılması, klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar ile yaprak yüzeyinde kabarcık şeklinde beneklenmeler oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Hty-Yayladağı-Badem1 PDV izolatı ile yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik ve sonrasında nekrotik lokal lezyonlar, *N. occidentalis*'te sistemik kloroz, *N. rustica*'da klorotik lokal renklenmeler, *N. glutinosa*'da yapraklarda şekil bozukluğu, *N. tabacum cv. Xanthi*'de sistemik kloroz, *C. sativus*'ta sistemik kloroz, bodurluk ve yapraklarda lokal nekrozlar, *C. pepo*'da sistemik kloroz ve bodurluk semptomları gözlenmiştir. Üç hafta sonunda belirti gözlenen test bitkilerinden yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde PDV'nin bu test bitkilerine aktarılabildiği saptanmıştır.

Soltani et al. (2013) PDV'nin *N. rustica*'da lokal sararmalara ve nekrozlara, Boulila (2010) PDV'nin badem izolatlarının *C. sativus*'ta sistemik mozaik ve bodurluğa neden olduğunu

belirtirerek benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

ACLSV izolatları (Mer-Er-B2) ile yapılan inokulasyonlarda *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar ve *C. quinoa*'da yapraklarda lokal renk açılmaları, *P. vulgaris*'te yapraklarda epinasti ve nekrotik lezyonlar 24 günün sonunda gözlenmiştir. *C. sativus*'ta yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerine göre virüs taşınması gerçekleşmesine rağmen belirti gözlenmemiştir. Diğer otsu test bitkilerinde ise herhangi bir belirti gözlenmemiş ve yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde de negatif sonuçlar alındığı için virüsün aktarılamadığı anlaşılmıştır.

Bulduğumuz bu sonuçlara paralel olarak Jelkman (2004) ACLSV'nin 20°C'de 20 günde *C. quinoa*'da lokal ve sistemik semptomlar oluşturduğunu bildirmiştir. ACLSV'nin *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da inokule edilen yapraklarda klorotik ve nekrotik küçük lezyonların daha sonra üst yapraklarda klorotik noktalar oluşturduğunu, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *C. sativus* *P. vulgaris*'te ise semptom geliştirmedeği rapor edilmiştir (Elibüyük ve Erdiller 1998, Rana et al. 2008). Brakta et al. (2013) ise ACLSV elma izolatlarının *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik lezyonlar meydana getirdiğini, *P. vulgaris*'te ise

diğer araştırmacıların aksine bu çalışmada olduğu gibi küçük nekrotik lezyonlar oluştuğunu bildirmiştir. Literatürlerde bildirilen bu semptomların büyük çoğunluğu yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında elde edilen semptomlarla benzerlik göstermektedir. Otsu indikatör bitkilerde elde edilen veya edilemeyen değişik semptomlar, konukçudaki virüsün ırkından, kullanılan tampon çözeltisinin içeriğinden ve sıcaklık başta olmak üzere değişik çevre faktörlerinden etkilenmektedir. Bundan dolayı farklı izolatlarla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında indikatör bitkilerde farklı sonuçlar almak her zaman mümkündür (Salem et al. 2003).

Viral etmenlerin değişik odunsu indikatör bitkilere aşılınması

Biyolojik indeksleme sonucu virüs izolatlarının odunsu indikatör bitkilerde oluşturduğu belirtiler Çizelge 6'da kodlanarak verilmiştir. Bütün indikatör bitkiler aşılama sonrasından sonra gözlenmiş ve semptomlar kayıt altına alınmıştır. Bitkiler aşılama sonrasından 3 ay sonrasına kadar her hafta testlenmiş ve virüslerin taşınıp taşınmadığı serolojik ve moleküler olarak kontrol edilmiştir.

PNRSV izolatları ile yapılan biyolojik indekslemede, *P. persica* GF 305 bitkisinde, yapraklarda damarlar arası renk açılması, bodurluk, *P. domestica*'da yapraklarda kloroz, *P. persica* GF 677'de yapraklarda kloroz, saçma deliği belirtisi, mozaiklenme ve lokal renk açılmaları, *P. persica*'da yapraklarda kıvrılma, saçma deliği, mozaik ve renk açılması, *P. persica* Garnem'de yapraklarda saçma deliği ile klorotik beneklenmeler, *P. amygdalus* çöğür anaçlarında rozet yaprak oluşumu, yapraklarda damarlar arası renk açılması, kloroz, saçma deliği, mozaiklenme, boğum aralarında kısılma ve renk açılması ve son olarak *P. mahlep*'te yapraklarda şekil bozukluğu ve lokal renk açılmaları gözlenmiştir.

PDV izolatı (Hty-Yay-1 BADEM) ile aşılama *P. persica* GF 305 bitkisinde yaprakta renk açılması (kloroz), vejetasyonda gecikme ve bodurluk ile bazı bitkilerde kuruma sonucu ölümler olmuştur. *P. persica* GF 677'de kloroz, yapraklarda mozaik ve lokal renklenmeler, *P. amygdalus*'ta rozet yaprak oluşumu, çok erken dönemlerde yaprak kenarlarında testere dişlilik, yaprak ayasında küçülme ile boğum aralarının kısalarak bodurluk meydana geldiği gözlenmiştir.

PNRSV ve PDV aynı cinse ve aynı familyaya bağlı virüsler olması nedeniyle Mink (1992), bu virüslerin benzer belirtiler oluşturduğunu bildirmektedir. Bunun yanında Uyemoto ve Scott (1992), PNRSV'nin sert çekirdekli bitkilerde önce klorotik noktalar ve halkalar oluşturduğunu, daha sonra bu klorotik lekelerin nekroze olarak ilerlediğini ve nekroze olan dokuların düşüp saçma deliği şeklinde belirtileri oluşturduğunu, PNRSV ve PDV ile enfekteli ağaçlarda

yaprakların dar ve küçük olduğunu bildirmişlerdir. Öztürk ve Çevik (2014) PNRSV ile enfekteli bulduğu kiraz izolatları ile yaptığı indeksleme çalışmalarında *P. mahlep*'te yapraklarda şekil bozuklukları ve renklenmeler olduğunu bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde rapor etmiştir.

ACLSV (Mer- Erd 2 Badem) izolatı ile aşılama *P. persica* GF 305 bitkisinde damarlar arası renk açılması, *P. persica* GF-677'de yapraklarda mozaik şeklinde renk açılması, *P. mahlep*'te mozaik şeklinde renk açılmaları gözlenmiştir. Öztürk ve Çevik (2014) ACLSV ile enfekteli kiraz izolatları ile yaptığı indeksleme çalışmalarında *P. mahlep*'te yapraklarda renklenmeler olduğunu bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde rapor etmiştir.

İndikatör bitkilere taşınan virüslerin serolojik olarak saptanma zamanının belirlenmesi

Serolojik ve moleküler olarak enfekteli bulunan izolatlardan (PDV için Hty-Yayladağı-Badem1 ve PNRSV için Mer-Er-B1) GF-305 indikatör bitkisine 2 adet göz aşısı yapılarak indeks bitkilere taşınan virüslerin serolojik testlemelerinin sonuçları Çizelge 7 ve Çizelge 8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ikinci ayın sonunda hem PNRSV hem de PDV için aşılama GF-305 indikatör bitkilerinde 2 ayın sonunda ELISA testlerinde pozitif sonuçlar alınmıştır (Çizelge 7, 8).

Bu sonuçlarla uyumlu olarak Elibüyük (2004), PPV enfekteli seftali çeşitlerinden alınan dokularla yapılan kabuk aşılama sonucu *P. persicae* GF 305 indikatör bitkilerinde 30-40 gün sonra damar açılması ve şekil bozukluğu şeklinde belirtilerin ortaya çıktığını ve bu bitkilerde yapılan DAS-ELISA testlerinde de PPV'nin belirlenebildiğini bildirmiştir. Myrta (2004) sera koşullarında biyolojik indekslemede semptom gelişiminin 22-24 °C'de 3-6 ay, açık tarla koşullarında ise bu sürenin 2-3 yıl olduğunu belirtmiştir. Bu verilere göre çalışmada elde edilen sonuçlar literatür sonuçları ile uyum göstermekte, aşılama bitkilerinde virüs DAS-ELISA testi ile 2 ayın sonunda saptanabilirken Myrta (2004)'nın ifade ettiği gibi belirti gelişimi daha ileri zamanda gerçekleşmektedir. Aşılama koşullarının, yapılan aşı türünün, aşılama zamanının, indikatör bitkilerin yaşının, aşılama sonrasındaki bakım koşullarının ve indikatör bitkilerin türünün bu süre üzerinde etkili olacağı düşünülmektedir.

Moleküler çalışmalar

PNRSV'yi teşhis etmek için yapılan moleküler çalışmalarda 616 bp'de bant elde edilmiş (Şekil 3) ve PNRSV için 2 izolat sekans analizine gönderilmiştir. Birinci izolat yeni tesis edilmiş 2-3 yaşındaki sahilinden uzak yüksek rakımlı bir badem (PNRSV-MRSN-BDM-1) bahçesinden toplanmıştır. PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatı ise sahil bölgesine yakın bir bahçe kenarında yetişen yaşlı, aşısız bir ağaçtan alınmıştır.

Çizelge 6. Biyolojik indeksleme sonucu virüs izolatlarının odunsu indikatör bitkilerde oluşturduğu belirtiler

Belirtiler*			
İndikatörler	PNRSV (Mer-Erd 1 BADEM)	PDV (Hty-Yay-1)	ACLSV (Mer-Erd 1 BADEM)
<i>P.persica</i> GF 305	DRA,B	K,B, Kr	DRA
<i>Prunus domestica</i>	YŞB,K,M	-	-
<i>P.persica</i> GF 677	K,SH,M	K,M	M
<i>P.persica</i>	SH,M,YK	-	-
<i>P.persica</i> Garnem	SH,M	-	-
<i>P.amygdalus</i>	RY,DRA,K,SH,M,YK,B	RY,YŞB,B	-
<i>P. mahlep</i>	YŞB,M	-	M

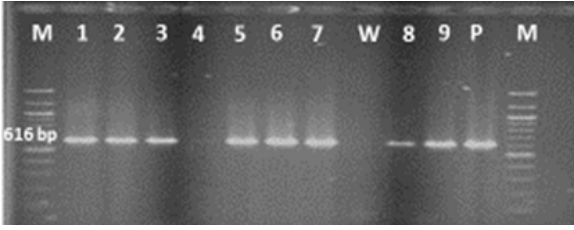
*S: Belirti yok, RY: Rozet yaprak çıkışı, YŞB: Yapraklarda şekil bozukluğu ve küçülme, DRA:Yapraklarda damarlar arası renk açılması, K: Yaprakta renk açılması (kloroz), SH:Yaprakta saçma deliği oluşumu (shot-hole), B: Boğum arasında kısalma veya bodurluk, M: Yapraklarda mozaik ve lokal renklenmeler, YK: Yaprak kıvrılması, Kr: Kuruma (Mer-Erd 1: Mersin-Erdemli, Hty-Yay-1: Hatay-Yayladağı)

Çizelge 7. PNRSV'nin GF-305 indikatöründeki ELISA sonuçları

Testleme tarihi	PNRSV (Aşılınmış GF305)	Negatif kontrol	Pozitif Kontrol	Sonuç
1. ayın sonunda	0.106	0,096	0.257	-
2. ayın sonunda	1.803	0.092	0.600	+

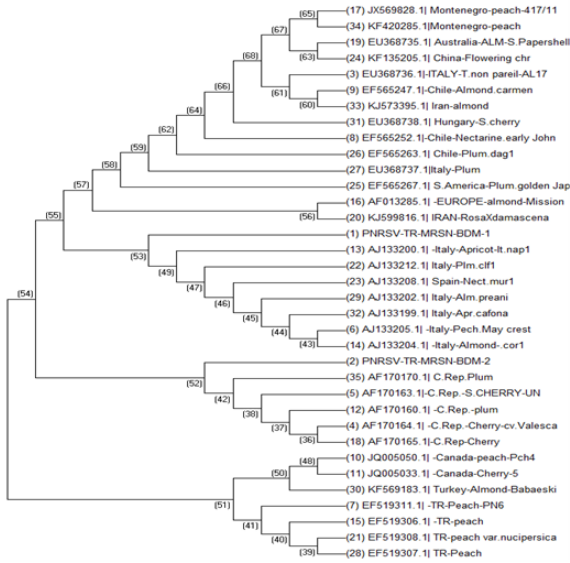
Çizelge 8. PDV'nin GF-305 indikatöründeki ELISA sonuçları

Testleme tarihi	PDV (Aşılınmış GF305)	Negatif kontrol	Pozitif Kontrol	Sonuç
1. ayın sonunda	0.123	0.101	0.436	-
2. ayın sonunda	0.861	0.097	0.571	+



Şekil 3. Badem örneklerinden PNRSV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-10, Badem örneklerinde M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp #SM0241) W: Su, P: Pozitif kontrol)

Doğu Akdeniz Bölgesi Mersin ilinden toplanan badem izolatlarının NCBI'a kayıtlı dünya PNRSV izolatları ile nükleotit düzeyde %97-99 oranında yüksek benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde PNRSV-MRSN-BDM-1 izolatı AJ133202.1 kayıt numaralı İtalya badem, AJ133212.1 kayıt numaralı İtalya erik, AJ133200.1 kayıt numaralı İtalya kayısı, AJ133208.1 kayıt numaralı İtalya nektarin ve AJ133205.1 kayıt numaralı İtalya şeftali izolatları ve AJ133208.1 kayıt numaralı İspanya nektarin izolatı ile %99 oranında benzerlik göstererek aynı grupta toplanmıştır. Bu izolat yeni tesis edilmiş bir bahçedeki 2-3 yaşındaki bir badem bahçesinden toplanmıştır. PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatı ise yaşlı, aşısız ve bahçe kenarında yetişen bir ağaçtan alınmıştır. Bu izolat Türkiye'nin farklı

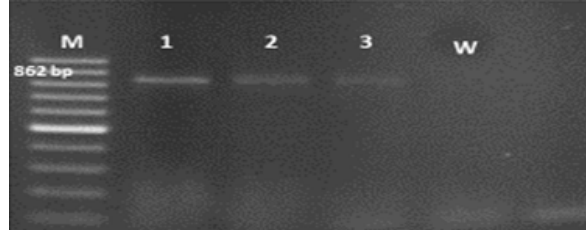


Şekil 4. PNRSV-MRSN-BDM-1 ve PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatlarının kılıf protein gen dizisine göre dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

bölgelerinden toplanmış olan EF519311.1, EF519306.1, EF519308.1 ve EF519307.1 kayıt numaralı şeftali izolatları ve Trakya Bölgesi'nden toplanan KF569183.1 kayıt numaralı badem izolatı ile %99 oranında benzerlik göstererek aynı grupta yer almıştır (Şekil 4).

Öztürk ve Çevik (2015) PNRSV izolatları arasındaki genetik farklılığın az olmasını PNRSV'nin genellikle polenle ve üretim materyali ile yayılması ve konukçularının yoğun bir seleksiyon baskısı altında olmamasından kaynaklandığını bildirmiştir. Ulubaş ve Ertunç (2004) yaptıkları RFLP çalışmaları sonucunda coğrafik dağılım ve PNRSV grupları arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da bu bulgulara benzer olarak PNRSV ırklarının %97-99 gibi yüksek oranda birbirleri ile akraba oldukları sonucu çıkmıştır.

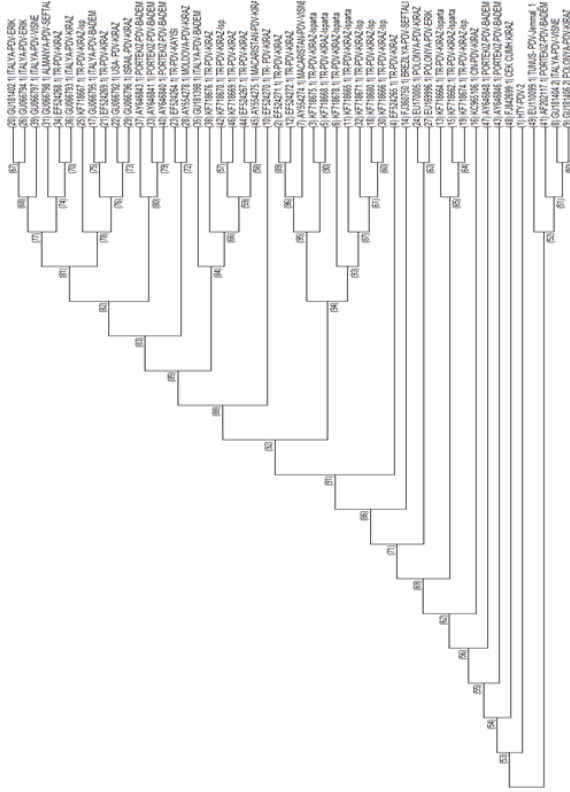
PDV'yi teşhis etmek için yapılan moleküler çalışmalarda Şekil 5'te görüldüğü gibi 862 bp'de bant elde edilmiş ve izolatlar arasından gerek DAS-ELISA'da gerekse RT-PCR'da en iyi absorbans değeri ve en iyi bant veren PDV-HTY 2 izolatı sekans analizine gönderilmiştir.



Şekil 5. Badem örneklerinden PDV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-3, Pozitif bulunan badem örnekleri M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp #SM0241) W: Su-negatif kontrol

Hatay ilinden toplanan PDV badem izolatının (PDV-HTY 2) NCBI'a kayıtlı dünya PDV izolatları ile nükleotit düzeyde %87-96 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde PDV-HTY 2 izolatının EF524271.1, EF524265.1, KF718675.1 KF718668.1 ve KF718678.1 kayıt numaralı 5 tane Türkiye kiraz izolatı, ve AY554274.1 kayıt numaralı Macaristan vişne izolatı ile %96 oranında, GU181404.1 kayıt numaralı İtalya vişne, EF575270.1, KF718665.1 ve EF524272.1 kayıt numaralı 3 Türkiye kiraz izolatı ve GU181406.1 kayıt numaralı Polonya kiraz izolatı ile %95 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 6).

Ulubaş-Serce et al. (2009) Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladığı 1 kayısı ve 9 kiraz PDV izolatının nükleotit düzeyde %87-99 ve amino asit düzeyinde ise %84-99 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Mısır PDV izolatlarının

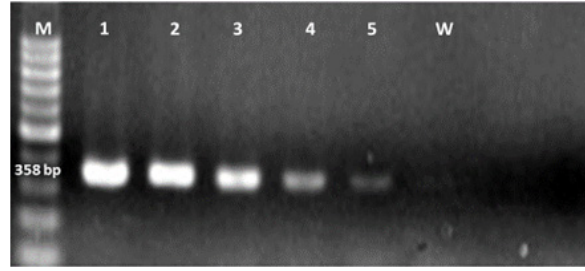


Şekil 6. PDV-HTY-2 izolatının kılıf protein gen dizisi düzeyinde dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

ve Amerikan PDV kiraz izolatlarının Amerikan şeftali izolatlarıyla %97 ve %98 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Youssef et al. 2002). Boulila (2010), Tunus PDV badem izolatlarının, Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla %86-96 oranında benzerlik gösterdiğini bildirilmiştir. Bu literatürlerdeki gibi bu çalışmada da PDV izolatımızın İtalya, Polonya, Macaristan ve Türkiye gibi farklı ülke ve konukçulardan elde edilen PDV ile yakın akraba olduğu görülmektedir.

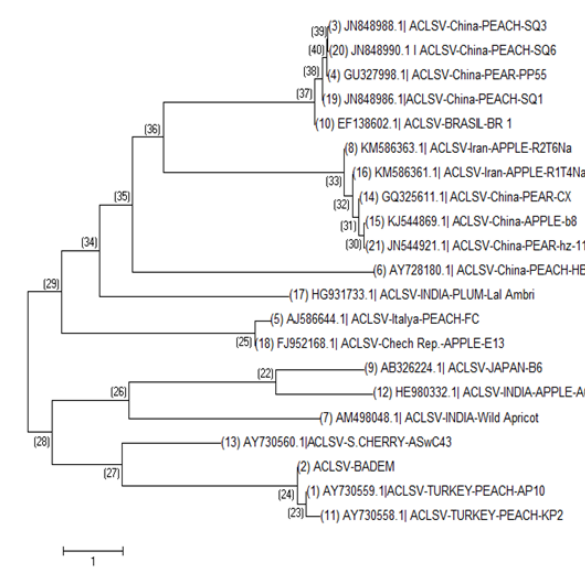
ACLSV'nin teşhisi için yapılan moleküler çalışmalarda Şekil 7'de görüldüğü gibi 358 bp'de bant elde edilmiş ve en iyi bant veren ACLSV badem izolatı sekans analizine gönderilmiştir.

Mersin ilinden toplanan badem izolatının NCBI'a kayıtlı dünya ACLSV izolatları ile nükleotit düzeyde %81-96 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde ACLSV- BADEM olarak adlandırdığımız izolatın NCBI gen bankasına kayıtlı olan AJ586644.1 İtalya şeftali izolatı ve AY730559.1 kayıt numaralı Türkiye şeftali izolatı ile %96 oranında ve AY730560.1 kayıt



Şekil 7. Badem örneklerinden ACLSV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-5 Pozitif bulunan badem örnekleri M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp, #SM0241) W: Su-Negatif kontrol)

numaralı Türkiye vişne izolatı ile %95 benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca bu izolat Türkiye şeftali ve vişne izolatlarıyla aynı grupta toplanmıştır (Şekil 8). Öztürk ve Çevik (2015) bu sonuçlara benzer olarak ACLSV Isparta izolatları %80-98 ile %88-100 arasında değişen oranlarda kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit diziliminde benzerlik olduğunu bulmuştur. Hindistan'da Himachal Pradesh bölgesindeki ACLSV badem izolatları ile şeftali ve yabani kayısı izolatlarının %98 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Rana et al. 2008).



Şekil 8. ACLSV ADN izolatının kılıf protein gen dizisi düzeyinde dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

Bu çalışmada toplanan badem örneklerinde PPV, ApMV ve CLRV ile bulaşık örnek tespit edilemediği için sekans analizi ve filogenetik analizler yapılamamıştır.

Bütün bu sonuçlar ışığında;

Doğu Akdeniz Bölgesinde son yıllarda sert kabuklu meyve yetiştiriciliğinin artış eğiliminde olması, bu virüslerin girişinin engellenmesi adına daha kesin ve sıkı önlemlerin alınması, iç ve dış karantina önlemlerinin ve fidanlık kontrollerinin daha hassas ve hızlı tanı teknikleri ile sık aralıklarla yapılması ve yapılan örnekleme miktarının artırılması gerekir. Özellikle son yıllarda orman arazilerinin kiralanarak orman bölgelerine yakın veya sınır yerlerde badem yetiştiriciliğinin artmasından dolayı orman tarafından birçok hastalık ve zararlı gelmektedir. Bunlarla mücadelenin daha sık ve kontrollü yapılması çok önemlidir. Badem ağaçlarında hastalık oluşturan bu viral etmenlerin üretici ve teknik personel tarafından tanınmasına yönelik eğitim çalışmalarının yapılması ve farkındalık yaratılması sağlanmalıdır. Enfekteli ağaçların bulunduğu bahçelerde yeni fidanlar dikilmeden önce mevcut hasta ağaçların sökülüp bitki artıkları iyice bahçeden uzaklaştırıldıktan sonra sertifikalı, virüsten arı fidanların dikilmesi önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma "Doğu Akdeniz Bölgesinde Badem ve Ceviz Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması, Karakterizasyonu ve Bazı Çeşit Davranışlarının Belirlenmesi" isimli doktora çalışmasının bir bölümü olup, Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresinde sözlü olarak sunulmuştur. Çalışmayı destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ÇÜ-BAP- ZF2012D12)'ne teşekkür ederiz.

ÖZET

Son yıllarda Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de badem üretimi yıldan yıla artış eğilimine girmiştir. Tüm bitkilerde olduğu gibi bademlerde de virüs hastalıklarından dolayı kayıplar meydana gelmektedir. Bu çalışma ile Doğu Akdeniz Bölgesindeki badem alanlarında ekonomik olarak zarar yapan Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Plum pox virus (PPV), Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple mosaic virus (ApMV) ve Cherry leaf roll virus (CLRV)'ün bölgemizdeki dağılımı araştırılarak, moleküler ve biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. 2012-2016 yılları arasında yapılan survey çalışmalarında, Doğu Akdeniz Bölgesindeki 5 ilden toplam 605 adet badem örneği toplanıp DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (% 27,93) en az bir virüsle enfekteli bulunmuştur. Bunlardan, Adana ilinde toplanan 129 badem örneğinin 26'sı (%20,16), Mersin'de 299 örneğin 90'ı (%30,10), Kahramanmaraş'ta 71 örneğin 11'i (%15,49), Hatay'da 89 örneğin 34'ü (%38,20) ve Osmaniye'de 17 örneğin 8'i (%47,06) en az bir virüs ile enfekteli bulunmuştur. Test edilen örneklerde PNRSV %64, PDV %18, ACLSV %11 ve karışık enfeksiyon %7 oranında tespit edilmiş, ApMV, PPV ve CLRV ise tespit edilememiştir. Enfekteli badem izolatlarından, kılıf protein genini içeren gen bölgesi RT-PCR ile çoğaltılarak PNRSV için 616 bp, PDV için 862 bp ve ACLSV için 358 bp'lik bantlar elde edilmiştir. Badem izolatlarının NCBI'a kayıtlı dünya PNRSV izolatları ile %97-99, PDV izolatları ile %87-96, ACLSV izolatları ile %81-96 oranında nükleotit düzeyde benzerlik gösterdiğinden bu etmenlerin bitki materyallerinin ticaretinden dolayı yayıldığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Badem, virüs, ELISA, PCR.

KAYNAKLAR

- Aly M.A., Ibrahim A.M., Hayam S.A., Amira M.E.A., Salama M.E., 2008. Characterization of two isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. Arab Journal of Biotechnology, 11 (1), 107-124.
- Birişik N., 2009. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında gövde zararlanmalarına neden olan viral etmenlerin biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 158 s., Adana.
- Bora T., Karaca İ., 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No.167, İzmir.
- Boulila M., 2010. Molecular characterization of an almond isolate of *Prune dwarf virus* in Tunisia: putative recombination breakpoints in the partial sequences of the coat protein-encoding gene in isolates from different geographic origin. Phytopathologia Mediterranea, 48:411-421.
- Brakta A., Thakur P.D., Handa A., 2013. First report of apple top working disease caused by viruses (*Apple stem grooving virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, and *Apple stem pitting virus*) in Apple in India. Plant Disease, 97 (7), 1001.
- Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T., Dunez J., 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae, 386, 136-147.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno sorbent assay for the

- detection of plant viruses. Journal Of General Virology, 34, 475-483.
- Çevik B., Yardimci N., Çulal Kılıç H., 2011. Detection of viruses infecting stone fruits in Western Mediterranean Region of Turkey. The Plant Pathology Journal, 27, 44-52.
- Cichal, P.E., Rejczak, S.K., 2011. Biological and molecular chracterization of *Prunus necrotic ringspot* virüs isolates from three rose cultivars. Acta Physiologiae Plantarum, 33, 2349-2354.
- Dal Zotto, A., Nome, S.F., Di Rienzo, J.A., Docampo, D.M., 1999. Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. Plant Disease, 83, 1055-1057.
- Desvignes J.C., 1999. Virus diseases of fruit trees. Ed. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes (CTIFL), Paris, France, 115-118 p.
- Diekmann M., Putter C.A.J., 1996. Stone fruits. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Publication Office IPGRI, Rome.
- Digiario M., Savino V., Di Terlizzi B., 1992. Ilarviruses in apricot and plum polen. Acta Horticulture, 309, 93-98.
- Elibüyük İ. Ö., 2004. Ankara'da şeftali ağaçlarında görülen Sharka hastalığı üzerinde araştırmalar. Tarım Bilimleri Dergisi 2005, 11 (3), 236-243.
- Elibüyük İ. Ö., Erdiller G., 1998. Malatya ilinde sert çekirdeklielerde görülen virüs hastalıklarının tanısı üzerinde yapılan çalışmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, Ankara, 89-94.
- FAO, 2019. <http://faostat.fao.org/faostat/> =agriculture
- Grieco F., Alkowni R., Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2000. Molecular detection of olive viruses. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 30, 469-473.
- Hadidi A., Levy L., 1994. Accurate identification of *Plum pox potyvirus* and its differentiation from Asian *prunus latent potyvirus* in *Prunus* germplasm. EPPO Bulletin, 24, 633-643.
- Hassan M., Myrta A., Polak J., 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 133, 124-129.
- Helguera P.R., Docampo D.M., Nome S.F., 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. Journal of Phytopathology, 150, 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Jelkman W., 2004. Detection of viruses and virüs-like disease of fruit trees. Acta Horticulture, 657, 575-595.
- Karabacak M., İlbağ H., 2013. Description and detection of almond virus diseases in the Trakya region of Turkey. Türkiye Fitopatoloji Derneği Dergisi, 40 (1-2-3), 33-40.
- Levy L., Damsteegt V., Scorza R., Kölber M., 2000. *Plum pox potyvirus* disease of stone fruits, <http://www.apsnet.org/online/feature/PlumPox/>, The American Phytopathological Society.
- Maliogka V.I., Charou A., Efthimiou K., Katsiani A.T., 2010. Chatzivassiliou, E.K., Katis, N.I. 21st International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010.
- 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 (2) 42-45.
- Mink, G.I., 1992. *Prunus necrotic ringspot virus*. In: Plant Diseases of International Importance, Vol II., Edited by J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay. New York: Prentice Hall., 335-356 pp.
- Myrta A., 2004. Diagnosis of Viral and Viroid Diseases of Plants Ders Notları. CIHEAM-IAMB, Bari, Italy. (Yayınlanmamış)
- Myrta A., Savino V., 2008. Virus and virus-like diseases of cherry in The Mediterranean Region. Acta Horticulturae 795, 891-896.
- Myrta A., Matic S., Malinowski T., Pasquini G., Candresse T., 2011. *Apple chlorotic leaf spot* in stone fruits. In A. Hadidi, M.Barba, T. Candresse and W.Jelkman (Eds.) Virus and virus-like diseases of stone fruits. st. Paul, MN: APS Press, 85-90 p.
- Nemeth M., 1986. Virus, Mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees, Akademia Kiado, Budapest, 841.
- Ogawa M.J., Zehr, I. E., Bird, W.G., Ritchie, F.D., Uriu, K., Uyemoto, K.J., 1995. Compendium of stone fruit diseases, The American Phytopathological Society Press, 69 p.
- Öztürk Y., Çevik B., 2014. Isparta Kiraz bahçelerinde Görülen Önemli Virüslerin Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi ve Kılıf Protein Gen Dizilimlerinin Belirlenmesi. V. Türkiye Bitki Koruma Kongresi Bildiri Özetleri, 3-5 Şubat 2014, Antalya. S: 201.
- Öztürk Y., Çevik B., 2015. Genetic diversity in the coat protein genes of *Prune dwarf virus* isolates from sweet cherry growing in Turkey. The Plant Pathology Journal, 31(1), 41-49.

- Rana T., Chandel V., Hallan V., Zaidi A.A., 2008. Characterisation of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. Australasian Plant Disease Notes, 3, 65-67.
- Reyes F., Fiore N., Reyes M.A., Sepulveda P., Paredes V., Prieto H., 2002. Biological behavior and partial molecular characterization of six chilean isolates of Plum Pox Virus, Plant Disease, 87 (1) 15-20.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.
- Salem N., Mansour A., Al-Musa A., Al-Nsour A., 2003. Seasonal variation of *Prunus necrotic ringspot virus* concentration in almond, peach and plum cultivars. Phytopathologia Mediterranea, 42, 155-160.
- Saraçoğlu K., Erkan S., 2016. Fasulye tohumlarındaki viral etmenlerin saptanmasında tanı yöntemlerinin duyarlılıklarının incelenmesi, Ege Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi, 53 (3), 309-315.
- Sertkaya G., 2010. An investigation on rose mosaic disease of rose in Hatay-Turkey. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427.
- Soltani N., Hayati J., Babaei G., Qomi M.E., 2013. Serological and molecular detection of *Prune dwarf virus* infecting stone fruits of Charmahal-va-Bakhtiari province, a central region of Iran. International Journal of Plant Biology, 4 (1), 14-17.
- Spiegel S., Scott S. W., Bowman-Vance V., Tam Y., Galiakparov N. N., Rosner A., 1996. Improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* by polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology, 102, 681-685.
- TÜİK, 2011. Tarımsal yapı, üretim ve değerleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10.04.2011).
- TÜİK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 19.01.2019).
- Ulubaş Ç., Ertunc F., 2004. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates occurring in Turkey. Journal of Phytopathology 152, 498-502.
- Ulubaş Serce C., Ertunc F., Öztürk A., 2009. Identification and genomic variability of *Prune dwarf virus* variants infecting stone fruit trees in Turkey. Journal of Phytopathology, 157, 298-305.
- Uyemoto, J.K., Scott, S.W., 1992. Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. Plant Diseases, 76, 5-11.
- Vaskova D., Petrzik K. Spak J., 2000. Molecular variability of the capsid protein of the *Prune dwarf virus*. The European Journal of Plant Pathology, 106, 573-580.
- Yegül M., Baloğlu S., 2019. Ceviz ve Bademde *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* ve *Cherry leaf roll virus* Yoğunluklarının Mevsimsel Değişimi. Çukurova Tarım Gıda Bilimleri Dergisi, 34 (1), 61-68.
- Youssef S.A., Shalaby A.A., Mazyad H.M., Hadidi A., 2002. Detection and identification of *Prune dwarf virus* and *Plum pox virus* by standard and multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) The Journal of Plant Pathology, 84, 113-119.

Cite this article: Yegül, M, Baloğlu, S. (2020). Determination and characterization of several virus diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.601901

Atıf için: Yegül, M, Baloğlu, S. (2020). Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.601901