

**TRAKYA BÖLGESİ'NDE BADEM (*Prunus dulcis*)  
AĞAÇLARINDA GÖRÜLEN VİRÜS HASTALIKLARININ  
SAPTANMASI**

**Melis KARABACAK**

**Yüksek Lisans tezi**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Havva İLBAĞI**

**2012**

**T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TRAKYA BÖLGESİ'NDE BADEM (*Prunus dulcis*)  
AĞAÇLARINDA GÖRÜLEN VİRÜS HASTALIKLARININ  
SAPTANMASI**

**Melis KARABACAK**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Havva İLBAĞI**

**TEKİRDAĞ-2012**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Havva İLBAĞI danışmanlığında, Melis KARABACAK tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. Havva İLBAĞI

*İmza :*

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zafer MAKARACI

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Fatih KONUKÇU  
**Enstitü Müdürü**

Bu tez alışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiş olup, TÜBİTAK-TOVAG 109 O 491 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi TRAKYA BÖLGESİ'NDE BADEM (*Prunus dulcis*) AĞAÇLARINDA GÖRÜLEN VİRÜS HASTALIKLARININ SAPTANMASI

Melis KARABACAK  
Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Havva İLBAĞI

Türkiye’de tatlı badem (*Prunus dulcis* Mill.) çağlası ve içi sevilerek tüketilen sert kabuklu bir meyve türüdür. Siyanürük asit içeren acı badem (*Prunus amara* L.) ise badem yağı hammaddesi için üretilen kabuklu bir meyve türüdür. Türkiye 39 000 ton/yıl badem üretimi ile Dünya’da sekizinci sırada yer almış 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 Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerini kapsayan Trakya Bölgesi’nde kapama bahçeler ve plantasyonlar halinde üretilmektedir ve üretimi de teşvik edilmektedir. Ancak bademde verimi ve kaliteyi olumsuz yönde etkileyen bazı virüs hastalıkları bulunmaktadır. Bu virüs hastalıklarını saptamak amacıyla, 2010 yılında Trakya Bölgesi’nin Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerine bağlı 10 ilçede, 158 çiçek ve 260 adet yaprak örneğinin toplandığı sürveyler yapılmıştır. Sürvey alanından toplanan toplam 418 bitki örneğinde, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) testleri ve Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) testleri ile *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüslerinin tanıları gerçekleştirilmiştir. Serolojik ve moleküler testler sonucunda Trakya Bölgesi’ndeki badem ağaçlarının % 31,15 oranında *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), % 4,23 *Prune dwarf virus* (PDV) ve % 2,31 ise *Plum pox virus* (PPV) ile enfekteli oldukları saptanmıştır. Toplam olarak Trakya Bölgesinde bu çalışma ile 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.

**Anahtar Kelime:** *Prunus dulcis*, PPV, PNRSV, PDV, ELISA, RT-PCR

2012, 44 sayfa

**ABSTRACT**  
Master Science Thesis

IDENTIFICATION OF VIRUS DISEASES ON ALMOND (*Prunus dulcis*) TREES IN  
TRAKYA REGION OF TURKEY

Melis KARABACAK  
Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Havva İLBAĞI

Almond *Prunus dulcis* is well known one of the stone fruit species consumed as unripe fruit and delicious seed in Turkey. *Prunus amara* bitter almond which contain cyanuric acid was also produced as the raw material of almond oil. With her 39.000 tones of annual production Turkey is the eighth almond producer in the World. This yield however can not meet the demand of consumers. So Turkey has imported almond seed every year. As a matter of fact ecological condition in Turkey is very suitable for almond production and has a great potential to establish orchards and plantations which will make Turkey as the top producer of almond. Edirne, Kırklareli and Tekirdağ provinces of Trakya Region is also suitable for the establishment of orchards and plantations to grow almond with active support of Turkish Government. On the other hand there are some prevailing virus diseases on almond which reduce yield and quality. Main objective of this project is to identify those viruses. Studies and investigations on almond viruses were initiated in 2009 and continued by collecting 158 flower and 260 leaf samples from almond trees in 10 districts of Trakya Region in 2010. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tests were applied and viruses were identified. As a result of these studies 31.15 % *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), 5.38 % *Prune dwarf virus* (PDV) and 2.31 % *Plum pox virus* (PPV) were identified on almond trees in Trakya Region. Finally 38.84 % of 260 leaf samples were found infected with viruses in Trakya Region. Another result of this study is the identification of PPV on flowers and leaf samples collected from almond trees which is the first report of the presence of this virus in Turkey.

**Key words:** *Prunus dulcis*, PPV, PNRSV, PDV, ELISA, RT-PCR

**2012, 44 pages**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>5</b>
2.1. Türkiye'de Bademde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Yapılan Çalışmalar .....	5
2.2. Dünya'da Bademde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Yapılan Çalışmalar .....	8
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>11</b>
3.1. MATERYAL .....	11
3.1.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarındaki Sürvey Çalışmaları .....	11
3.1.2. Serolojik Test Çalışmaları .....	13
3.1.3. Moleküler Test Çalışmaları .....	13
3.2. YÖNTEM.....	14
3.2.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarından Yaprak Örneklerinin Toplanması.....	14
3.2.2. Serolojik Test Çalışmaları .....	15
3.2.2.1. Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) Testi ...	15
3.2.2.2. Triple Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (TAS-ELISA) Testi.....	16
3.2.3. Moleküler Test Çalışmaları .....	17
3.2.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu .....	17

3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test.....	17
3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi .....	18
3.2.3.3. Reverse Transcriptase Chain Reaction (RT-PCR) Test.....	18
3.2.3.4. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması .....	20
3.2.3.5. DNA'yı Boyama ve Görüntüleme .....	20
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>21</b>
4.1. Sürvey Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	21
4.2. Serolojik Testlere İlişkin Bulgular .....	26
4.3. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular .....	27
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>31</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>34</b>
EKLER.....	38
EK 1. DAS-ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler .....	38
EK 2. Total Nükleik Asit Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	40
EK 3. Elektroforezde kullanılan Tampon Çözeltiler.....	42
<b>7. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>43</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>44</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 3.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarındaki Sürveylerin Gerçekleştirildiği İl , İlçe, Köy ve Beldeler.....	12
Şekil 4.1. Edirne İli Keşan İlçesinde Erken İlkbaharda Virüs Enfeksiyonuna Uğramış Yaşlı Badem Ağaçları.....	21
Şekil 4.2. Tekirdağ İlinde Kapama Badem Bahçesinde Yapraklarda Klorotik Lekelerle Başlayan Enfeksiyona Uğramış Badem Ağacının Görüntüsü .....	22
Şekil 4.3. Virüs Enfeksiyonu Sonucu Klorotik ve Nekrotik Lekeler Sergileyen Badem Ağacının Görünümü .....	22
Şekil 4.4. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Arazisindeki Kapama Badem Tesisinde Virüs Enfeksiyonuna Uğramış ve Kuruma Belirtisi Sergileyen Badem Ağaçları .....	23
Şekil 4.5. Tekirdağ İli Çorlu İlçesindeki Badem Ağaçlarında Yaprakta Kıvrılmalar, Şekil Bozuklukları ve Mozayik Simptomlarının Görüntüsü .....	23
Şekil 4.6. Virüs Enfeksiyonu Sonucu Meydana Gelen Mozayik Belirtisi Sergileyen Badem Yaprığının Görünümü .....	24
Şekil 4.7. Virüs Enfeksiyonu Sonucu Yapraklarda Oluşan Klorotik Lekeler ve Mozayik Belirtileri.....	24
Şekil 4.8. Enfeksiyon Sonucu Sürgün Ucundan Başlayan ve Yapraklarda Oluşan Klorotik Lekelerin Oluştuğu Badem Ağacının Görünümü.....	25
Şekil 4.9. Kırklareli İli Babaeski İlçesindeki Badem Tesisindeki Ağaçlarda Şekil Bozukluğu, Yapraklarda Kıvrılma, Nekrotik ve Klorotik Lekeler Sergileyen Yaprakların Görünümü.....	25
Şekil 4.10. PNRSV, PPV ve PDV Virüslerine Ait DNA Fragmentlerine Ait Bantlar .....	28
Şekil 4.11. RT-PCR Sonucu PPV İle Enfekteli Badem Çiçek Örneklerine Ait Elde Edilen 220 bp Uzunluğundaki Bantın Görünümü.....	29
Şekil 4.12. PPV virüsü ile enfekteli yaprak örneklerine ait PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen bantlar .....	29
Şekil 4.13. PDV virüsü ile enfekteli örneklerde tespit edilen 722 bp uzunluktaki PCR ürünleri .....	29
Şekil 4.14. PNRSV virüsünün RT-PCR testi sonucu elde edilen PCR ürünleri .....	30

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1. Dünya’da Badem Üretimi Yapan Ülkeler ve Üretim Miktarları .....	2
Çizelge 1.2. Bademde Saptanmış Olan Bazı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalık Etmenlerinin Listesi.....	4
Çizelge 3.1. 2010 Yılı Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarından Toplanan Örnek Sayılarının İl ve İlçelere Göre Dağılımı .....	14
Çizelge 3.2. PPV, PNRSV ve PPV Virüslerini RT-PCR Testi İle Tespit Etmede Kullanılacak Primer Dizilerine Ait Baz Dizilimleri ve Beklenen Fragment Uzunlukları .....	19
Çizelge 3.3. PNRSV, PPV ve PDV Virüslerinin PCR İle Çoğaltımında Uygulanan Sıcaklık Aralıkları .....	19
Çizelge 4.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarından Toplanan Yaprak Örneklerine İlişkin ELISA ve RT-PCR Testi Sonuçları .....	27
Çizelge 4.2. ELISA Reader’da Okunan PNRSV,PDV ve PPV Virüslerine Ait Absorbans Değerleri.....	27

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

μ	:	Mikron
μg	:	Mikrogram
μl	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar
ml	:	Mililitre
mg	:	Miligram
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
MW	:	Molekül ağırlığı

### Kısaltmalar

ELISA	:	Enzyme linked immunosorbent assay(Enzim bağlı immunolojik deney)
DAS-ELISA	:	Double antibody sandwich–enzyme linked immunosorbent assay
TAS-ELISA	:	Triple antibody sandwich–enzyme linked immunosorbent assay
PCR	:	Polymerase chain reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT-PCR	:	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
IC-RT-PCR	:	Immuno capture-reverse transcriptase-polymerase chain reaction
PDV	:	Prune dwarf virus
PNRSV	:	Prunus necrotic ringspot virus
PPV	:	Plum Pox Virus
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Ethilenediaminetetraacetic acid
PBS	:	Fosfat Buffer-Tuz Tamponu
TAE	:	Tris- Acetate-EDTA
Taq DNA Polimeraz	:	Termo stabil polimeraz enzimi
HCl	:	Hidro klorik Asit
MgCl <sub>2</sub>	:	Magnezyum klorür
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RNase	:	Ribonükleaz enzim
RNA	:	Ribonükleik asit
TBE	:	Tris Borate EDTA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum di Hidrojen Sülfat
NaI	:	Sodyum iyodit
NaOAc	:	Sodyum asetat
RNase	:	Ribonükleaz enzim
dNTP	:	Deoksinüklotidtrifosfat
DNase	:	Deoxyribonükleaz
EtOH	:	Ethanol

# 1. GİRİŞ

Badem (*Prunus dulcis* Mill.) Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasında yer alan beslenme değeri, gıda içeriği ve aromatik özellikleri açısından tercih edilen kabuklu bir meyve türüdür. Dünya’da çerezlik ve gıda sanayinde iç badem olarak tüketimi yanında Türkiye’de çağla olarak tüketimi yaygındır. Kabukları soyulup taze olarak ya da kavru olarak tüketilmesinin yanı sıra pasta, şekerleme ve tatlılarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bademin Anavatanı Orta Asya ve Çin’dir. Ancak Türkiye’de tatlı badem, acı badem ve diş badem olmak üzere üç tür badem bu meyveye katkıda bulunmuştur (Bayrak ve Yılmaz 2009, Akalın 1952). Türkiye’de tatlı badem (*Prunus dulcis* Mill.) çağlası ve içi sevilerek tüketilen bir çeşit olup badem yağı ve badem unu yapımında kullanılır. Siyanürik asit içeren acı badem (*Prunus amara* L.) ise badem yağı hammaddesi için üretilen kabuklu bir meyvedir. Ayrıca kozmetik sanayinde katkı maddesi ve koku verici olarak da kullanılmaktadır. Acı badem aynı zamanda tatlı badem tür ve çeşitleri için iyi bir anaç olduğu gibi badem yağının hammaddesi olarak da değerli bir üründür.

Başta fındık, olmak üzere ceviz, Antepfıstığı, kestane yanında bademin Türkiye’deki önemi ve üretimi gittikçe artmaktadır. Türkiye’de Doğu Karadeniz’in kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylalar dışında her bölgede badem yetiştiriciliği yapılmaktadır. Badem kültürü Ege Bölgesinde yoğunlaşmış olup bunu Akdeniz, İç Anadolu ve Marmara Bölgeleri izlemektedir. Özellikle Ege ve Akdeniz Bölgelerindeki üretim miktarı yıllık toplam miktarın üçte ikisini karşılamaktadır. Ancak standartlara uygun verimli ıslah edilmiş randımanı yüksek çeşitler kullanılmadığı için badem üretimi Türkiye’nin potansiyelini yansıtmayacak düzeyde değildir (Anonim 2004). 2008 yılı FAO verilerine göre Türkiye 39 000 ton üretimle Dünya’da ancak sekizinci sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1) Bu nedenle de iç piyasadaki talebi karşılamak için her yıl 1000 tondan fazla badem içi ithalatı yapılmaktadır. Türkiye 1996’dan önceki yıllarda badem ithalatı yapmazken, son yıllarda hızla artan oranda badem ithal eden bir ülke durumuna gelmiştir. Türkiye’nin badem ihracatı ve ithalatı karşılaştırıldığı zaman ithalatımızın ihracatımızdan daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum doğal yetiştirilme koşullarına sahip olan ülkemizde badem üretim alanlarının yaygınlaştırılması ve modern yetiştirme tekniklerinin kullanılarak ağaç başına düşen verimin artırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Ancak Türkiye’de başlangıçta sadece Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleriyle sınırlı kalan badem yetiştiriciliği, son yıllarda yeni çeşitlerin devreye girmesi ve pazardaki yüksek talep nedeniyle cazip hale gelerek özellikle GAP Bölgesinde ve diğer alanlarda genişlemeye başlamıştır. Güç şartlara adaptasyon yeteneğinin olması ve pazardaki yüksek talep, badem yetiştiriciliğini cazip hale getirmektedir. Bu nedenle son yıllarda Türkiye’de badem yetiştiriciliğine olan ilginin giderek arttığı dikkati çekmektedir.

**Çizelge 1.1.** Dünya’da badem üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (bin/ton) (Anonim 2008)

Ülke Adı	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Ortalama
ABD	786	786	703	846	1.043	1.104	878
İspanya	214	87	218	313	204	204	206
Suriye	140	123	229	107	76	76	125
İtalya	91	105	118	113	113	119	113
İran	38	70	109	110	110	110	91
Fas	71	60	71	83	81	87	75
Tunus	40	44	43	56	58	51	49
Türkiye	41	37	45	43	51	53	45
Yunanistan	36	48	47	51	46	35	44
Cezayir	33	38	45	54	34	35	40
Dünya	1.699	1.595	1.835	1.993	2.043	2.113	1.880

Amerikan Texas ve İspanyol badem çeşitlerinin sertifikalı fidanları ile Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde kapama badem bahçeleri kuran hevesli üreticilere rastlanmaktadır. Özellikle Trakya Bölgesi’nde özel orman tesis ve ağaçlandırma amacıyla yapılan teşvikler sonucu, 2003 yılından bugüne kadar 3 bin 500 hektar alana cevizle birlikte badem ağacının dikildiği, bölgenin badem ağacı dikimine uygun olduğu ve bu bağlamda bölgede badem plantasyonlarının hızla arttığı gözlenmektedir (Anonim 2004). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)’nin 2004 yılı verilerine göre Türkiye’de 3.950.000 adet badem ağacından 37.000 ton ürün elde edilmiştir. Trakya Bölgesi’nin üç ilinde badem üretiminin Edirne ilinde 285 da’lık alandan 159 ton, Kırklareli ilinde 127 da’lık alandan 45 ton, Tekirdağ ilinde ise 910 da’lık alandan 299 ton olduğu belirtilmektedir (Anonim 2007).

Küden ve ark. (1994) Akdeniz Bölgesi ekolojik koşullarına en iyi adapte olan Texas badem çeşidini ve en verimli olarak da 485 badem tipini saptamışlardır. Benzer bir çalışmada Kaşka ve ark. (1994) Güneydoğu Anadolu Bölgesi için adaptasyon denemelerine aldıkları dokuz ayrı badem çeşidinden Nonpareili en iyi gelişme gösteren çeşit, Texas badem çeşidini ise en verimli çeşit olarak saptamışlardır. Badem verimini ve kalitesini olumsuz yönde etkileyen pek çok hastalık bulunmaktadır. Son yıllarda Akdeniz ülkelerinde üretimi gittikçe artan ve ekonomik anlamda ülke gelirine katkıları olan sert çekirdekli meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları ile büyük sorunlar yaşanmaktadır (Dunez 1988, Dunez 2000).

Smith (1972) *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'nün üç ayrı ırkının bademlerde üç ayrı tip hastalık oluşturduğunu bildirmektedir. Fulton (1983) tarafından tanımlanan ve PNRSV ile birlikte Ilarvirus grubu içerisinde sınıflandırılan *Prune dwarf virus* (PDV) ise bademde saptanmış bulunan bir başka virüstür. Son yıllarda erik, kayısı, şeftali ve nektarin gibi önemli meyve türlerinde saptanan *Plum pox virus* (PPV)'un badem ağaçlarında da bulunduğu bildirilmektedir (Savino ve ark. 1994, Pribek ve ark. 2001). Brunt ve ark. (1996) sert çekirdekli meyve virüslerinin tanımlanmasını yaparken badem ağaçlarında görülen ve hastalık yapan virüsler olarak PNRSV, PDV ve PPV sıralamıştır.

Bu hastalık etmenlerinden PNRSV, Ilarvirus cinsine mensup olup Bromoviridae familyası içerisinde yer alır. Virüsün taşınması, mekanik inokulasyon, aşı, tohum ve polen ile olmaktadır. Konukçuları badem, kiraz, vişne, şeftali, erik ve *Rosaceae* familyasıdır. Badem yapraklarında parlak mozayik belirtilere neden olur.

PPV, Potyvirus cinsinin bir üyesi olup Potyviridae familyası içerisinde yer alır. Taşınma, vektörlerden yaprak bitleri, mekanik inokulasyon, aşı, tohum ve polen ile olmaktadır. Konukçuları erik başta olmak üzere diğer sert çekirdekli meyve türleri ve bademdir. Yaprak belirtileri sarı lekeler, halkalı lekeler ve bantlar şeklindedir. Meyve kesitinde ise çökmüş olan yerlerin koyu kahverengi, lastik gibi ve çekirdeğe yapışık olduğu görülür.

PDV, Bromoviridae familyasına bağlı Ilarvirus cinsine mensuptur. Mekanik inokulasyon, aşı ve tohum ile taşınır. Ayrıca enfekteli bir polenin sağlıklı bir ağacı döllemesiyle virüs enfeksiyonu gerçekleşir. En önemli konukçuları sert çekirdekli meyveler ve bademdir. Badem yapraklarında şekil bozuklukları görülür. Ağaçta genel bir bodurlaşma dikkati çeker.

**Çizelge 1.2.** Bademde saptanmış olan bazı virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin listesi (Agrios 2005)

<b>Virüs adı</b>	<b>Türkçe adı</b>	<b>Taksonomik grubu</b>
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	Elma klorotik yaprak leke virüsü	Trichovirus
<i>Apple mosaic virus</i> (ApMV)	Elma mozayik virüsü	İlarvirus
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	Erik şarka virüsü	Potyvirus
<i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	Erik cücelik virüsü	İlarvirus
<i>Prunus necrotic ring spot virus</i> (PNRSV)	Erik nekrotik halka leke virüsü	İlarvirus
<i>Raspberry ring spot virus</i> (RpRSV)	Ahududu halka leke virüsü	Nepovirus
<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)	Şeftali rozet mozayik virüsü	Nepovirus
<i>Tomato ring spot virus</i> (ToRSV)	Domates halka leke virüsü	Nepovirus
<i>Almond calico disease</i>	Badem sarı mozayik hastalığı	-
<i>Almond line pattern disease</i>	Badem çizgi desen hastalığı	-
<i>Almond necrotic ring spot disease</i>	Badem nekrotik halka leke hastalığı	-

Türkiye'nin pek çok ilinde bağ, bahçe ve tarla sınırlarında ayrıca dere akarsu ve yol kenarlarında bireysel olarak muhafaza edilen, yaşlı badem ağaçlarına rastlanmaktadır. Böyle badem ağaçları çoğu zaman viral etmenleri içermekte olup bu illerde kurulan ve yeni kurulmakta olan kapama badem bahçeleri için virüslerin inokulum kaynağını oluşturmaları bakımından çok ciddi bir tehdit oluşturmaktadırlar. Trakya Bölgesi'nde üretimine bu denli önem verilen badem ağaçlarında görülen viral hastalık etmenleri hakkında bu güne kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bundan dolayı bu tez çalışması ile bölgede badem yetiştiriciliği yapılan alanlarda *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüslerinin serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanması ve virüs enfeksiyon oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Türkiye’de Bademde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Büyük Bitkiler Kılavuzu adlı eserinde Akalın (1952) sert çekirdekli meyvelerden bademi *Prunus communis* Fritsch adı altında üç varyetesi ile birlikte isimlendirmiştir. Bunlar;

*Prunus communis* var. *amara* C. schneid: Acı badem

*Prunus communis* var. *dulcis* C. schneid: Tatlı badem

*Prunus communis* var. *fragilis* C. schneid: Diş badem’dir.

Daha sonra botanik açıdan isimlendirmede yapılan değişiklik sonucu *Prunus communis* yerine *Prunus amygdalus* adı konularak tatlı badem *Prunus dulcis* ve diş badem *Prunus fragilis* olarak literatürde yerini almış bulunmaktadır. Bayrak ve Yılmaz (2009) bademin sistematikteki yerini şu şekilde göstermişlerdir;

Alem: Plantae

Bölüm: Spermatophyta (Tohumlu bitkiler)

Alt Bölüm: Angiospermae (Kapalı tohumlu bitkiler)

Sınıf: Dicotyledone (Çift çenekli bitkiler)

Takım: Rosales (Çiçekli bitkiler)

Familya: Rosaceae (Gülgiller)

Alt Familya: Prunoideae ( Sert çekirdekli)ler)

Cins: Prunus

Türler: *Prunus amygdalus*

*Prunus dulcis*

*Prunus fragilis*

*Prunus tribola*

Alt Cins: Amygdalus

Türler: *Amygdalus communis* L.

*Amygdalus nana* L. (Anadolu)

*Amygdalus orientalis* M. (Anadolu)

*Amygdalus turcomanica* (Anadolu)

Bademde verimi ve ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyen abiyotik, biyotik ve moleküler hastalıklar bulunmaktadır. Türkiye’de en erken çiçek açan meyve türlerinden birisi olarak badem ilkbahar geç donlarından zarar görmektedir. Çiçek ve çağla kurumaları



şeklindeki belirtiler, en tipik don zararları olup bazı yıllar ürün verimini önemli ölçüde düşürmektedir.

Sertkaya ve ark. (2003), Türkiye'nin farklı bölgelerinden badem ve diğer sert çekirdekli meyve türlerine ait ağaçlardan alınan yaprak örneklerinde PPV izolatlarını Double antibody sandwich–enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ve Immuno capture–reverse transcriptase-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) yöntemleri ile araştırmışlar ancak bademde PPV'nün bulunmadığını bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar Sertkaya ve ark. (2004) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sert çekirdekli meyve türlerinde *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) virüslerini araştırırken, bademde de *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)'nü saptamışlardır.

Azeri ve Çiçek (1993) İzmir, Balıkesir ve Aydın ili badem üretim alanlarında en yaygın virüsün PNRSV ve PDV olduğunu bunu takiben *Raspberry ringspot virus* (RRV), *Peach rosette mosaic virus* (PRMV) ve *Tomato ringspot virus* (ToRSV)'lerinin de bulunduğunu DAS-ELISA yöntemi ile saptamışlardır.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi badem araştırma ve uygulama parsellerinde yapılan bir çalışmada % 20,3 oranında PNRSV ve % 3,2 oranında ise ACLSV tespit edilmiştir (Öztekin ve Buzkan 2006). Yine Kahramanmaraş ilinde yapılan bir başka araştırmada kapama badem tesislerindeki sistemik belirtiler sergileyen badem ağaçlarında *Candidatus phytoplasma phoenicium* fitoplazma patojeni aranmış ancak bulunmadığı bildirilmiştir (Yüzer 2008).

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

Badem ağaçlarındaki virüslerin saptanmasına yönelik çalışmalar ABD ve bazı Avrupa ülkelerinden sonra Türkiye'de Azeri ve Çiçek (1994) tarafından Aydın, Balıkesir ve İzmir illerindeki fidanlıklarda başlatılmıştır. 1992 ve 1993 yıllarında klorotik ve nekrotik yaprak lekeleri, calico, mozayik, yaprak daralması ve deformasyonlarla, cücelik, sakız akıntısı gibi belirtiler gösteren fidanlardan 96 adet yaprak örneği sağlamışlardır. PNRSV ve PDV başta olmak üzere beş ayrı virüse karşı hazırlanmış antiserumlar kullanılarak uyguladıkları DAS-ELISA testi sonuçlarında, fidanlıklarda PNRSV virüsünün yaygın olduğunu PDV virüsünün

de bulunduğunu saptamışlardır. Aynı şekilde Sipahioğlu ve ark. (1999) aralarında 21 adet bademin de bulunduğu 1019 adet sert çekirdekli meyve ağaçlarından toplanan yaprak örneklerinde aralarında PNRSV, PDV, PPV'nün 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.

Türkiye'nin farklı illerindeki PPV izolatlarını araştıran Çağlayan ve ark. (2004) simptomatik badem, kayısı, nektarin, şeftali, erik, kiraz ve vişne ağaçlarından topladıkları yaprak örneklerinden Türkiye PPV izolatını karakterize ederek Ankara'dan toplanan 2 kayısı ağacından PPV-M ırkını bulmuşlardır. Benzer şekilde Türkiye'deki sert çekirdekli meyve ağaçlarında *Prune dwarf virus* (PDV) virüs protein alt ünite molekülündeki amino asit dizilerini 10 farklı izolatta araştıran Serçe ve ark. (2009) PDV'nün filogenetik sınıflandırması sonucu Türkiye'de dört farklı grubun varyantı olduğunu bunların Kiraz I, Kiraz II, Karışık ve Badem grupları olarak adlandırılabilceğini bildirmişlerdir.

İlbağı ve ark. (2008) Tekirdağ ilinde *Prunus spinosa* L.'da simptom gösteren 54 yaprak örneğinde PPV, *Apple chlorotic ring spot virus* (ACLSV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV) virüslerinin varlığını DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemiyle araştırmışlardır. 54 yaprak örneğinin 13'ünün PPV virüsü ile enfekteli olduğu ve % 24,1 oranında enfeksiyona sahip olduğunu saptamışlardır.

Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde ise badem virüs hastalıklarının saptanmasına yönelik ilk tespit, bir ön çalışma olarak 2009 yılında gerçekleştirilmiştir. Tekirdağ Merkez ilçede 1994 yılında kurulmuş olan 105 ağaçlık kapama badem bahçesinden, 2009 yılı Nisan ayında sistemik hastalık belirtileri sergileyen 100 ağaçtan 100 yaprak örneği toplanmıştır. Elde edilen bu örneklerden 27 adedinde PCR testleri uygulanmış ve PNRSV'nün bulunduğu saptanmıştır (İlbağı 2009, Yayınlanmamış ön çalışma).

## 2.2. Dünya’da Bademde Görülen Virüs Hastalıkları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Horst (2008) bademde *Prunus amygdalus* ve ornamental süs bitkisi olarak değerlendirilen çiçekli badem *Prunus tribola*’da patojenik olarak 18 fungal, 3 bakteriyel, 2 nematod, 6 adet de virüsten kaynaklanan hastalıkların adlarını vermiştir.

Fauquet ve Mayo (1999) bademde hastalıklara neden olan ve doğal konukçuları arasında yer aldığı *Plum pox virus* (PPV)’ü Potyviridae Potyvirus, *Prune dwarf virus* (PDV)’ü Bromoviridae Ilarvirus, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)’ü Bromoviridae Ilarvirus familya ve cins taksonomisi içerisine yerleştirmişlerdir.

Badem ağaçlarında saptanan en önemli virüs *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) sürgünlerde göz kuruması, yapraklarda bandlaşma, parlak mozayik, halkalı leke, kloroz ve meşe yaprağı deseni gibi belirtilerin ortaya çıktığı verimi düşüren bir virüs hastalığıdır (Smith 1972, Brunt ve ark. 1996).

Sutic ve ark. (1999) ise *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)’nün sırası ile 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 olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar ayrıca bademin *Prune dwarf virus* (PDV)’ün doğal konukçusu olduğunu çoğu kez diğer virüsler ile badem ağaçlarında karışık enfeksiyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bademin *Plum pox virus* (PPV)’ün doğal konukçusu olmadığı halde indikatör bitki olarak bu virüsü barındırabildiğini ileri sürmüşlerdir. Keza *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)’nün latent enfeksiyon etmeni olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yazarlar ayrıca bazı araştırmacıların bademden *Cucumber mosaic virus* (CMV)’ünü izole ettiklerini bildirirken PNRSV’nün ABD’de bademlerde çiçek ve yaprak göz ve tomurcukları ile genç sürgün kurumalarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Şeftali ve kayısıda olduğu gibi badem de tipik karakteristik mozayik hastalığına (*Almond mosaic Disease*) ise bilinmeyen bir etmenin neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Badem ağaçlarındaki virüs hastalıklarının saptanması ve hastalık etmeni virüslerin tanımlanmaları önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Bertozzi ve ark. (2002) badem ağaçlarında çiçek tomurcukları, çiçek petal yaprakları ve yaprak örneklerinde *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ile enfekteli bahçelerde araştırmışlardır. Virüsün tanısı için biyolojik indikatör test bitki yöntemi ile serolojik ELISA testini uygulamışlardır. Sonuçta erken toplanan badem petal yapraklarında PNRSV’nün varlığı ELISA testi ile saptanabilirken

indikatör bitkilere inokulasyonlar başarısız olmuştur. Enfekteli badem yaprak örnekleri ise PNRSV'nün ELISA ile saptanmasında en uygun materyali oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Badem ağaçlarında virüslerin varlığının saptanması pek çok ülkede diğer sert çekirdekli meyve türleri ile birlikte ele alınmıştır. Nitekim Rosner ve ark. (1997) İsrail'de şeftali ve badem ağaçlarında RT-PCR yöntemi kullanılarak *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'nü saptamışlardır. Spiegel ve ark. (2004) keza *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)'nün İsrail'deki badem, erik ve kayısı çeşitlerinin araştırılmasında farklı konukçularda farklı PNRSV izolatları olabileceğini göstermişlerdir.

Yine badem virüslerinin saptanmasında serolojik ELISA test yöntemi ile nükleik asit hibridizasyonuna dayalı Polymerase chain reaction (PCR) testlerinin mukayese eden 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. Ayrıca PCR metodu ile viroidlerin de tanılanabileceklerini ileri sürerek ELISA serolojik testinin bu konuda uygulanamayacağını ileri sürmüşlerdir.

Badem ağaçlarında bilinen üç virüsün çiçek ve yaprak örneklerinin de araştırılması hususunda ELISA ve PCR yöntemlerinin ötesinde Saade ve ark. (2000) yaygın olarak sert çekirdekli meyvelerde bulunan Ilarvirüslerden *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Apple mosaic virus* (ApMV) türlerinin üçünün birden saptanmasında Non-izotopik moleküler hibridizasyon ve Multiplex RT-PCR tekniğini geliştirmişlerdir. Bu üç virüse karşı hazırlanmış primer karışımı ile bademin de aralarında bulunduğu sert çekirdekli bitki örneklerini seri şekilde indeksleme olanağı ortaya çıkmıştır.

Silva ve ark. (2003) badem ağaçlarında *Prune dwarf virus* (PDV)'ün yayılışını PCR tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Yapılan testler sonucu PDV'nün genç badem yapraklarında, çiçek tomurcuklarında, polenlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu bitki hücre sitoplazması içerisinde çekirdek çevresinde yoğunlaştığını saptamışlardır.

Jarrar ve ark. (2001) Filistin'de gerçekleştirilen badem virüslerinin araştırılması çalışmalarında semptomatik 196 ağaçtan aldıkları yaprak örneklerinin % 13,3 oranında *Prune dwarf virus* (PDV) ile bulaşık olduğunu saptamışlardır. Diğer konukçulardan kirazda % 25, şeftalide % 26,7 oranlarında PNRSV saptanmıştır.

Badem ağaçlarında saptanan virüslerle mücadeleye yönelik önemli bir çalışma Portekiz'de gerçekleştirilmiştir. Miguel ve ark. (2000) Portekiz'e özgü Boa Casta badem çeşidi başta olmak üzere enfekteli damızlık badem ağaçlarının *Prune dwarf virus* (PDV) başta olmak üzere virüslerden arındırılması için termoterapi, kemoterapi ve meristem kültürü

yöntemleri kullanılarak badem virüs hastalıkları kontrol altına alınmıştır. Ayrıca PDV'ye karşı npt II dayanıklılık geni de saptanmış bulunmaktadır.

Varveri ve ark. (1997) Kayısıda *Plum pox virus* (PPV) ve *Apple chlorotic ring spot virus* (ACLSV) virüslerinin bademde ise *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'nin ELISA testi ile güvenilir teşhislerini yaptıklarını ayrıca örnekleme koşullarının belirlenmesine yönelik çalıştıklarını bildirmişlerdir. 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 örneklerde en yüksek absorbans değerlerinin saptandığını bildirmişlerdir.

Son yıllarda bademin, sert çekirdekli meyvelerden erik, kaysı, şeftali ve nektarinde sharka hastalığına neden olan *Plum pox virus* (PPV)'ünde duyarlı olduğu saptanmıştır (Kölber ve ark. 2001). Bademde *Plum pox virus* (PPV) enfeksiyonlarının Rusya, Bulgaristan, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti'nde yaygın olduğu bildirilmiştir. Pribek ve ark. (2001) Macaristan'da bademdeki PPV izolatının PPV'nün D (Dideron) serogrubuna ait olduğunu ancak bademdeki PPV serotipinin D serotipi olduğunu saptamışlardır. Öte yandan bademin ABD ve Meksika'da *Peach mosaic virus* (PMV)'un neden olduğu enfeksiyonlardan da etkilendiği Smith (1972) ve Larsen ve Oldfield (1995) tarafından bildirilmektedir.

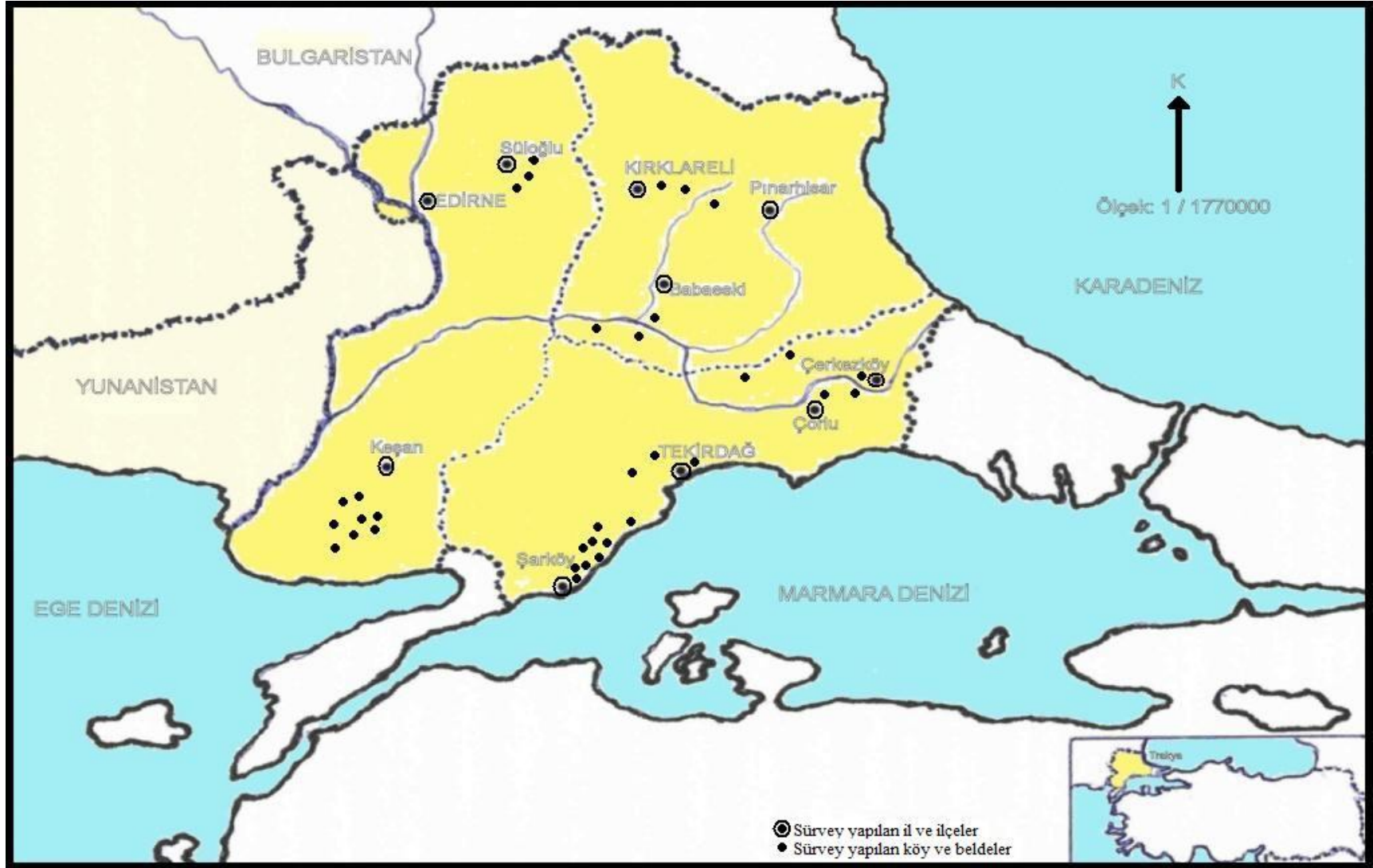
Badem dahil sert çekirdekli meyve türlerinde görülen *Plum pox virus* (PPV)'nün serolojik alt kümelerini araştıran Myrta ve ark. (2001) bu virüsün Avrupa ülkelerindeki coğrafi dağılımına göre her ülkede saptanan strainler yanında izolatlar arasında da farklılıkları olduğunu filogenetik analizler sonucu saptamışlardır. Bunlardan (PPV-M-1 ve PPV-M-2) kümelerinin Türkiye'nin de dahil olduğu Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde yaygın olduğunu göstermişlerdir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarındaki Sürvey Çalışmaları**

2009 yılında bölgede yapılan ön çalışmalar sonucunda elde edilen gözlem ve deneyimlere göre 2009 yılı Tarımsal İstatistik sonuçları dikkate alınarak, Trakya Bölgesi'nde badem plantasyonlarının bulunduğu Şekil 3.1'deki haritada gösterilen il ve ilçelerde, 2010 yılında sürveyler yapılmıştır. Sürvey çalışmaları, çalışma alanını kapsayan Trakya Bölgesi'nin Edirne ili Merkez, Keşan, Süloğlu ilçeleri ile Kırklareli ili'nin Merkez, Babaeski, Pınarhisar ilçeleri ve Tekirdağ İli'nin Merkez, Şarköy, Çorlu ve Çerkezköy ilçeleri'ndeki badem üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlarda iki ayrı dönemde gerçekleştirilmiştir. Bölgede toplam 3 il ve bu illere bağlı 10 ilçede gerçekleştirilen sürvey çalışmalarında; ilk sürvey çalışması, 2010 yılı erken ilkbaharında bademlerin çiçeklenme döneminde; 25.02.-02.03.2010 tarihleri arasında yapılmıştır. İkinci sürvey çalışmaları ise 08.06.-15.06.2010 tarihleri arasında Haziran ayında gerçekleştirilmiştir. Sürveyler esnasında yapılan örneklemelemlerde klorotik ve nekrotik yaprak lekeleri, şekil bozuklukları ve mozayik belirtileri sergileyen yaprak örnekleri toplanmıştır. Böylece toplanan 158 çiçek ve 260 adet yaprak örneğinden oluşan toplam 418 adet bitki örnekleri bu çalışma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Trakya Bölgesi badem üretim alanlarındaki sürveylerin gerçekleştirildiği il, ilçe, köy ve beldeler

### 3.1.2. Serolojik Test Çalışmaları

Sürveyler esnasında toplanan semptom gösteren ve/veya göstermeyen örneklerde *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Plum pox virus* (PPV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüslerinin varlığının saptanması amacıyla kullanılan antiserumlar SEDIAG (Longvic-FRANCE) firmasından temin edilmiştir. Clark ve Adams (1997)'in temel alındığı yöntemle göre DAS-ELISA ve TAS-ELISA testleri firmanın önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. ELISA testlerinin sonuçları THERMO-Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd., USA) marka ELISA okuyucusu ile değerlendirilmiştir.

### 3.1.3. Moleküler Test Çalışmaları

Total nükleik asit izolasyonu için Foissac ve ark. (2001)'un önerdiği ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. cDNA sentezi, Fermentas (Fermentas AB, Vilnius LITHUANIA) firmasından satın alınan cDNA sentez kiti ile firmanın önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için gerekli olan PCR bileşenleri yine Fermentas firmasından temin edilmiştir. Nükleik asitlerin çoğaltımında Techne (Staffordshire ST15 OSA, UK) marka PCR cihazı kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA ürünleri, agaroz jel elektroforezde materyal olarak kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez işleminde, Thermo (Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd., USA) firmasına ait jel elektroforez aparatları kullanılmıştır. Jel elektroforez işleminden sonra PCR ile çoğaltılan DNA ürünlerine ait bantlar Vilber Lourmat (F-77202 Marne-la-Vallée Cedex 1, FRANCE) marka jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.



## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Trakya Bölgesi Badem Üretim Alanlarından Yaprak Örneklerinin Toplanması

İlk sürvey çalışması; 2010 yılı erken ilkbaharında çiçeklenme döneminde sürvey kapsamı içerisinde yer alan il ve ilçelerde, her 10 dekara bir bahçe isabet edecek şekilde ziyaretler yapılmış ve ayrıca bölgede bireysel olarak yetiştirilen yaşlı badem ağaçlarından da örnekler alınmıştır. Böylece birinci sürvey çalışmasında 46 bahçe, ikinci sürvey çalışmasında ise 53 bahçe ziyaret edilmiştir. Sürveyler esnasında her bahçedeki simptom gösteren ve/veya göstermeyen ağaçlardan ve ayrıca yaşlı badem ağaçlarından da ayrı ayrı toplanan toplam 418 adet bitki materyali ile çalışma yürütülmüştür. Birinci sürvey çalışmasında erken ilkbahar döneminde 158 adet çiçek petal yaprak örneği toplanmış ve buz kutusuna konularak laboratuara getirilmiş ve -20 °C’de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. 2010 yılı Haziran ayında yapılan ikinci sürveylerde ise yine aynı alanlardan alınan ve simptom gösteren ve/veya göstermeyen toplam 260 adet badem yaprak örnekleri (Çizelge 3.1) toplanarak buz kutusuna konulmuş ve testleninceye kadar -20 °C’de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** 2010 yılı Trakya Bölgesi badem üretim alanlarından toplanan örnek sayılarının il ve ilçelere göre dağılımı

İl Adı	İlçe Adı	Birinci sürveylerde toplanan çiçek örnek adedi	İkinci sürveylerde toplanan yaprak örnek adedi
Edirne	Merkez	12	44
	Keşan	35	45
	Süloğlu	10	6
Kırklareli	Merkez	12	14
	Pınarhisar	13	4
	Babaeski	4	52
Tekirdağ	Merkez	36	30
	Şarköy	25	40
	Çorlu	4	16
	Çerkezköy	7	9
TOPLAM	10	158	260

Sürvey alanındaki ilçelerden toplanan badem yaprak ve çiçek örneklerindeki söz konusu 3 virüsle enfekteli örnek sayıları ve % oranları da tespit edilmiştir.

### **3.2.2. Serolojik Test Çalışmaları**

Serolojik test çalışmaları, birinci ve ikinci sürveyler esnasında toplanan toplam 418 bitki materyaline uygulanmıştır. ELISA testleri (DAS-ELISA ve TAS-ELISA testleri) kitlerin temin edildiği SEDIAG firmasının önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.1. Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) Testi**

- Kaplama tampon çözeltisi içerisinde 1/200 oranında seyreltilen antibadiler ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 µl konulmuş ve plate'ler nemli bir kutu içerisinde 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.

- Inkübasyondan sonra plate içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 3-4 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Çalışma materyali olarak toplanan badem çiçek ve yaprak örnekleri steril bir havan içerisinde 1/10 oranında ekstraksiyon tampon çözeltisi eklemek suretiyle ezilmiş ve bitki özuları çıkarılmıştır. Cam tüp içerisine konulan ekstraktlar karıştırılmak suretiyle ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 µl'lik miktarlarda konulmuştur. Her bir virüse ait pozitif ve negatif kontrollerde 100 µl 'lik miktarlarda ELISA plate'nin sol çukuruna iki tekerrürlü olarak yerleştirilmiş ve ELISA plate'ler nemli bir kutu içerisine konularak +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir.

- Inkübasyondan sonra bitki ekstraktları boşaltılmış ve 3-4 kez yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Enzim konjugat, 1/100 oranında konjugat tamponu ile seyreltilmiş ve 100 µl 'lik miktarlarda plate'lerin her bir çukuruna konulmuştur. Nemli kutu içerisine yerleştirilen plate'ler 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmişlerdir.

- Inkübasyon süresi sonunda yine yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile plate'ler 3-4 kez yıkanmıştır.

- Substrat tamponu ile 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate 100 µl'lik miktarlarda plate'lerin çukurlarına konulmuş ve karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Sonuçlar 60-120 dk süre sonunda ilk olarak görsel daha sonra da THERMO-Multiskan FC marka ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri okunarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.2. Triple Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (TAS-ELISA) Testi

- Kaplama tampon çözeltisi içerisinde 1/100 oranında seyreltilen antibadiler ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 µl konulmuş ve plate'ler nemli bir kutu içerisinde 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.

- Inkübasyondan sonra plate içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Çalışma materyali olarak toplanan badem çiçek ve yaprak örnekleri steril bir havan içerisinde 1/10 oranında Genel ekstraksiyon tampon çözeltisi eklemek suretiyle ezilmiş ve bitki özuları çıkarılmıştır. Cam tüp içerisine konulan ekstraktlar karıştırılmak suretiyle ELISA plate'nin her bir çukuruna 100 µl'lik miktarlarda konulmuştur. Her bir virüse ait pozitif ve negatif kontrollerde 100 µl 'lik miktarlarda ELISA plate'nin sol çukuruna iki tekerrürlü olarak yerleştirilmiş ve ELISA plate'ler nemli bir kutu içerisine konularak +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir.

- Inkübasyondan sonra bitki ekstraktları boşaltılmış ve 5 kez yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- A ve B olarak ayrı iki tüpte bulunan Alkalın fosfat konjugate antibadiler 1/100 oranında konjugat tamponu ile seyreltilmiş ve her iki Alkalın fosfat konjugate antibadiler 100 µl 'lik miktarlarda plate'lerin her bir çukuruna konulmuştur. Nemli kutu içerisine yerleştirilen plate'ler 37 °C'de 2 saat süre ile inkübe edilmişlerdir.

- Inkübasyon süresi sonunda yine yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile plate'ler 5 kez yıkanmıştır.

- Substrat tamponu ile 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate 100 µl'lik miktarlarda plate'lerin çukurlarına konulmuş ve karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Sonuçlar 60-120 dk süre sonunda ilk olarak görsel daha sonra da THERMO-Multiskan FC marka ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri okunarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.3. Moleküler Test Çalışmaları**

#### **3.2.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu**

Trakya Bölgesi badem üretim alanlarından 2010 yılında toplanan çiçek ve yaprak örneklerinin total nükleik asit ekstraksiyonları Foissac ve ark. (2001) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Buna göre 100 mg bitki materyali 1 ml Ekstraksiyon tamponu ile steril havan içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Steril eppendorf tüpler içerisinde 500 µl hacimdeki özsu konularak üzerlerine 100 µl miktarlarda % 10'luk Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler ara sıra sallanmak üzere 10 dakika süreyle 70 °C'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırılan tüpler soğutulmuştur. Tüpler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı fazın 300 µl'si daha önceden hazırlanmış eppendorf tüplere transfer edilmiş ve içerisinde 150 µl ethanol, 25 µl Silica süspansiyonu ve 300 µl 6 M Sodium iodine ilave edilmiştir. Karışım, sallayıcı platform üzerinde oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmış ve 500 µl yıkama tamponu ile oluşan peletler yıkanmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 1 dakikalık santrifügasyona tabi tutulduktan sonra ikinci defa eppendorf tüplerdeki peletler aynı hacimdeki yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen peletler, 150 µl RNase-free su ile çözündürüldükten sonra ve 4 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, sıvı faz yeni hazırlanan eppendorf tüplere transfer edilerek, peletler atılmıştır. Elde edilen total nükleik asit, complementer DNA (cDNA) elde edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test**

RT-PCR testi simptom sergilediği halde ELISA testlerinde negatif sonuç veren örnekler ile ELISA testlerinde şüpheli sonuçlar veren badem çiçek ve yaprak örneklerine uygulanmıştır.

### 3.2.3.2.1. Complementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, kitin satın alındığı firmanın (Fermentas) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Nükleaz-free microsantrifüj tüp içerisine aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

- 2 µl total RNA
- 1 µl antisens primer (100 pmol/µl )
- 9 µl RNase free

su eklenerek 12 µl'ye tamamlanmış ve elde edilen karışım vortekslenerek 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve hızla buza daldırılarak soğutulmuştur.

- 4 µl 5X First strand buffer
- 1 µl Ribonukleaz inhibitör
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Revers transkriptaz enzim

eklenmek suretiyle elde edilen 8 µl'lik hacimdeki bileşenler tüplere aktarılmış ve mikropipetle aşağı yukarı çekmek suretiyle karıştırılmıştır. 42 °C'de 1 saat süre ile inkübe edilmiş ve daha sonra 70 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra elde edilen cDNA, PCR işlemi yapılmaya kadar – 20 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.3.3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) Test

Çalışma materyalini oluşturan badem çiçek ve yaprak örneklerinden elde edilen total nükleik asitler *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Plum pox virus* (PPV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüslerinin tespiti için PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR işleminde Çizelge 3.2.'de gösterilen primerler kullanılmıştır. 616 bp, 722 bp ve 220 bp uzunluğunda fragmentler veren PNRSV, PDV ve PPV virüslerine spesifik primer setleri IDT (USA) firmasına sentezletilmiştir. Söz konusu üç virüsün tespiti için, steril PCR tüplerine toplam hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenler eklenmiştir. Çizelge 3.3.'de belirtildiği üzere her bir virüs için araştırmacıların önermiş oldukları sıcaklık aralıkları uygulanmıştır.

**PNRSV için:**

2,5 µl 10x PCR buffer  
1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,5 µl dNTP (10 mM)  
0,5 µl Primer 1  
0,5 µl Primer 2  
0,2 µl Taq DNA polimeraz enzimi  
1 µl cDNA  
18,3 µl RNase ari su

**PPV ve PDV için:**

2,5 µl 10x PCR buffer  
3,75 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
1 µl dNTP (10 mM)  
1,5 µl Primer 1  
1,5 µl Primer 2  
0,2 µl Taq DNA polimeraz enzimi  
2 µl cDNA  
12,55 µl RNase ari su

**Çizelge 3.2.** PNRSV, PDV ve PPV virüslerini RT-PCR testi ile tespit etmede kullanılacak primer dizilerine ait baz dizimleri ve beklenen fragment uzunlukları

Virüs	Primer	Primer dizisi	Çoğaltılan alanın uzunluğu (pb), referans
PNRSV	PNRSV 1	5'-GAGCTCTGGTCCCCTCAGG-3'	616 bp (Spiegel ve ark., 1999)
PNRSV	PNRSV 2	5'-TCACTCTAGATCTCAAGCAG-3'	
PDV	PDV 1	5'-ACCGAGACCACTACACTCCC-3'	722 bp (Mekuria ve ark., 2003)
PDV	PDV 2	5'-CAGACTACAGCCTCGCCAGA-3'	
PPV	PPV 1	5'-GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA-3'	220 bp (Hadidi ve Levy, 1994)
PPV	PPV 2	5'-GTCTCTTGCACAAGAACTATAACC-3'	

**Çizelge 3.3.** PNRSV, PPV ve PDV virüslerinin PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları

Virüsün Adı	Uygulanan Sıcaklık Aralıkları		
	<u>1 döngü</u>	<u>40 döngü</u>	<u>1 döngü</u>
<b>PNRSV</b>	94 °C 4 dk	94 °C 30 sn 54 °C 30 sn 72 °C 1 dk	72 °C 10 dk
<b>PPV</b>	<u>1 döngü</u>	<u>30 döngü</u>	<u>1 döngü</u>
	95 °C 5 dk	94 °C 30 sn 62 °C 30 sn 72 °C 45 sn	72 °C 10 dk
<b>PDV</b>	<u>1 döngü</u>	<u>34 döngü</u>	<u>1 döngü</u>
	94 °C 1 dk	94 °C 30 sn 56 °C 45 sn 72 °C 1 dk	72 °C 5 dk

#### **3.2.3.4. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması**

2 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında 3-4 dk süreyle ısıtılmıştır. Düz bir zemin üzerindeki jel tabağına yüklenecek örnek sayısına uygun jel tarağı yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel, jel tabağına kabarcık oluşturmayacak şekilde dikkatle dökülmüştür. 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra katılaştıran jel, içerisinde 1x TAE tamponu bulunan jel tankı içerisine yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde 5 µl yükleme tampon çözeltisi ve 10 µl PCR ürünü konularak karıştırılmış ve jelin çukurlarına yüklenmiştir. Jelin ilk çukuruna 3 µl DNA marker (100 bp) yüklendikten sonra 100 volt'luk bir akımda 40-50 dakika süre ile elektroforeze tabi tutulmuştur.

#### **3.2.3.5. DNA'yı Boyama ve Görüntüleme**

Elektroforez işleminden sonra bantların görünür hale gelebilmesi için, 1 litre saf suya 200 µl ethidium bromide (10 µg/ml ) eklenmiş bir kap içerisinde 25-30 dakika bekletilerek agaroz jelin boyanması sağlanmıştır. Ethidium bromide ile boyanan jel, Vilber Lourmat marka jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Sürvey Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Trakya Bölgesi'nde 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 2009 yılı Nisan ayında Tekirdağ ilinde kapama badem bahçelerinde ön sürvey çalışmaları yapılmış ve virüs belirtisi sergileyen ağaçların bulunduğu gözlenmiştir. Bu doğrultuda bölgedeki badem tesislerinin virüs hastalıkları açısından incelenmesi ve daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gereği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla, 2010 yılında Şekil 3.1'deki haritada gösterilen Trakya Bölgesi'nin Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ il ve ilçeleri iki ayrı sürvey çalışmasında ziyaret edilmiştir. Badem tesislerinde virüs belirtisi sergileyen ve özellikle de bireysel olarak yetiştirilen yaşlı badem ağaçlarında çiçeklenmede noksanlık, yapraklarda ise klorotik ve nekrotik lekeler, şekil bozuklukları ve mozayik belirtileri sergileyen ağaçların varlığı gözlenmiştir. Trakya Bölgesi'nde erken ilkbaharda çiçeklenme döneminde virüs enfeksiyonundan ve yarı parazit bitki *Viscum album* L.'un zararından etkilenmiş virüs enfeksiyon kaynağı ağaçların varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.1).



**a**

**b**

**Şekil 4.1.** Edirne ili Keşan ilçesinde erken ilkbaharda virüs enfeksiyonuna uğramış yaşlı badem ağaçları (a: *Viscum album* zararı ve b: Hastalıktan etkilenmiş yaşlı badem ağaçları)



2010 yılı Haziran ayında yapılan arazi gözlemlerinde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Kampüs arazisinde bulunan kapama badem bahçesinde çiçeklerde noksanlık, yapraklarda ise klorotik ve nekrotik lokal lekelerle, mozayik semptomları sergileyen ağaçların (Şekil 4.2, Şekil 4.3), mevsim sonunda hastalıktan dolayı kurumalara maruz kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.2.** Tekirdağ ili'nde kapama badem bahçesinde yapraklarda klorotik lekelerle başlayan enfeksiyona uğramış badem ağacının görüntüsü



**Şekil 4.3.** Virüs enfeksiyonu sonucu klorotik ve nekrotik lekeler sergileyen badem ağacının görünümü



**Şekil 4.4.** Tekirdağ Ziraat Fakültesi arazisindeki kapama badem tesisinde virüs enfeksiyonuna uğramış ve kuruma belirtisi sergileyen badem ağaçları

Şekil 4.5’de görüldüğü üzere virüs enfeksiyonu sonucu Tekirdağ ili Çorlu ilçesi’ndeki üretici bahçesindeki ağaçlarda yaprakta şekil bozuklukları ve mozayik simptomları dikkati çekmiştir. Bölgede özellikle yaşlı badem ağaçlarında virüs enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan şekil bozuklukları ile klorotik ve nekrotik lekeler, mozayik simptomları gözlenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Enfeksiyonun ileri dönemlerinde ağaçların kuruduğu ve bölgede bu ağaçların enfeksiyon kaynağı olarak tehdit oluşturduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.5.** Tekirdağ ili Çorlu ilçesi’ndeki badem ağaçlarında yaprakta kıvrılmalar, şekil bozuklukları ve mozayik simptomlarının görüntüsü



**Şekil 4.6.** Virüs enfeksiyonu sonucu meydana gelen mozayik belirtisi sergileyen badem yaprağının görünümü



**Şekil 4.7.** Virüs enfeksiyonu sonucu yapraklarda oluşan klorotik lekeler ve mozayik belirtileri



**Şekil 4.8.** Enfeksiyon sonucu sürgün ucundan başlayan ve yapraklarda oluşan klorotik lekelerin olduğu badem ağacının görünümü



**Şekil 4.9.** Kırklareli ili Babaeski ilçesi'ndeki badem tesisindeki ağaçlarda şekil bozukluğu, yapraklarda kıvrılma, nekrotik ve klorotik lekeler sergileyen yaprakların görünümü

Nitekim Kırklareli ili Babaeski ilçesi badem üretim tesislerinde de şekil bozuklukları, nekrotik ve klorotik lekeler sergileyen ağaçların da yeni kurulan tesislerde enfeksiyonun başladığını göstermektedir (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Özellikle üretici bahçelerinde bireysel olarak muhafaza edilen yaşlı ağaçların birer enfeksiyon kaynağı olduğu ve yeni kurulan tesisler için virüs inokulum kaynağı oluşturdukları yapılan sürveysler sonucunda tespit edilmiştir.

Özellikle Tekirdağ ili, Çorlu ilçesi'ndeki üretici bahçesinde virüs hastalığı tespit edilen üç badem ağacının çok yakın mesafede bulunan ve yeni kurulan badem tesislerine virüs hastalıklarını bulaştırma riski taşıdığı bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir.

#### **4.2. Serolojik Testlere İlişkin Bulgular**

Sürveysler esnasında toplanan toplam 158 adet çiçek ve 260 adet yaprak örnekleri antiserumların temin edildiği firmanın prosedürüne göre ELISA testlerine tabi tutulmuştur. Yapılan ELISA testleri sonucunda erken ilkbahar döneminde toplanan 158 adet çiçek örneğinden sadece bir örnekte *Plum pox virus* (PPV) tespit edilmiştir. Tekirdağ ili, Çorlu ilçesi, Pınarbaşı köyü'ndeki üretici bahçesindeki yaşlı bir ağaçtan temin edilen 1 adet çiçek örneğinin PPV ile enfekteli olarak tespit edilmesine rağmen *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV) virüsleri saptanamamıştır. İkinci sürveysler esnasında toplanan 260 badem yaprak örneklerinde söz konusu üç virüsün varlığı ELISA ve RT-PCR testleri ile araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda Çizelge 4.1'de gösterildiği şekilde 81 örneğin PNRSV, 11 örneğin PDV ve 5 yaprak örneğinin ise PPV ile enfekteli oldukları saptanmıştır. Yaprak örneklerinde karışık enfeksiyonlar da saptanmıştır. 3 yaprak örneğinin PNRSV + PDV ile 1 örneğin ise PNRSV + PPV ile karışık enfeksiyonlar halinde bulunduğu ELISA testleri sonucunda ortaya çıkmıştır. Serolojik testler sonucunda çiçek ve yaprak örneklerine ait en yüksek ve en düşük pozitif sonuç veren absorbans değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ayrıca ELISA testi sonucunda negatif sonuç veren 5 yaprak örneğinin RT-PCR testi ile pozitif reaksiyon gösterdiği örnekler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Trakya Bölgesi badem üretim alanlarından toplanan yaprak örneklerine ilişkin ELISA ve RT-PCR testi sonuçları

İl adı	İlçe adı	ELISA ve RT-PCR ile enfekteli örnek adedi					Enfekteli örnek adedi	Hastalık oranı (%)
		PNRSV	PDV	PPV	PNRSV+ PDV	PNRSV+ PPV		
Edirne	Merkez	4+1*	-	-	-	-	5	11.36
	Keşan	24+2*	4	1	-	-	31	68.88
	Süloğlu	1	-	-	-	-	1	16.6
Kırklareli	Merkez	12+1*	-	-	-	-	13	92.86
	Babaeski	15	-	1	-	-	16	30.77
	Pınarhisar	-	-	-	-	-	-	-
Tekirdağ	Merkez	14	-	-	3	1	18	60.0
	Şarköy	4	4	-	-	-	8	20.0
	Çorlu	2+1*	3	3	-	-	9	56.25
	Çerkezköy	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM	10	81	11	5	3	1	101	38.84

\*ELISA'da negatif RT-PCR'da pozitif sonuç veren yaprak örnekleri

**Çizelge 4.2.** ELISA reader'da okunan PNRSV, PDV ve PPV virüslerine ait absorbans değerleri

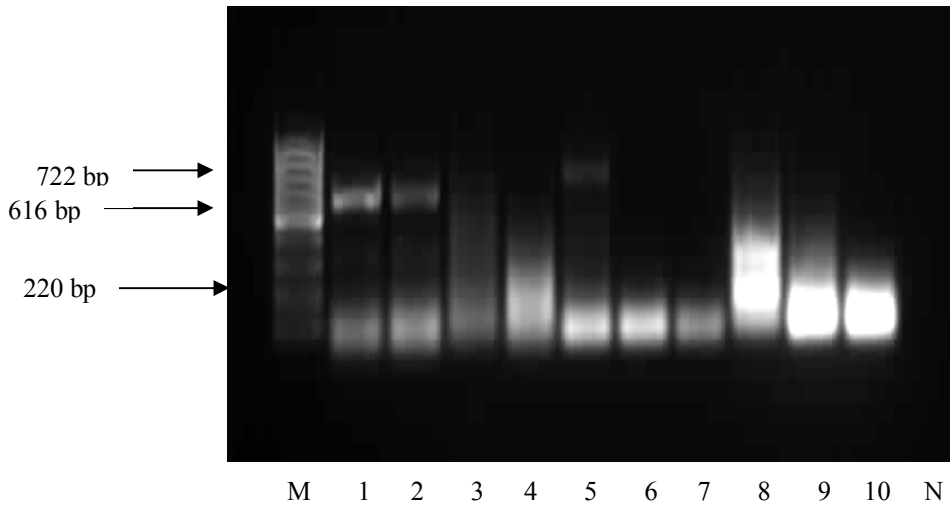
Virüs adı	En yüksek ve en düşük pozitif absorbans değerleri	En yüksek ve en düşük negatif absorbans değerleri	Ticari pozitif absorbans değeri	Ticari negatif absorbans değeri
PNRSV	4.139-0.719	0.527-0.207	4.165	0.275
PDV	4.292-0.842	0.198-0.073	3.320	0.123
PPV	2.316-0.512	0.206-0.071	3.223	0.108

### 4.3. Moleküler Çalışmalara İlişkin Bulgular

Trakya Bölgesi badem üretim alanlarından 2010 yılında toplanan çiçek ve yaprak örneklerinden, ELISA testi sonucunda şüpheli olan ve semptom gösterdiği halde negatif sonuç veren örnekler ile pozitif sonuç veren örneklerden bazıları RT-PCR testi ile de testlenmiştir. PNRSV, PDV ve PPV virüslerinin tanısında kullanılan total nükleik asit ekstraksiyon yöntemi (Foissac ve ark. 2000) ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve yeterli düzeyde RNA purifikasyonu sağlanmıştır. Spektrofotometrede yapılan ölçümlerde RNA konsantrasyonlarının 0.049-0.129 µg/µl düzeylerinde olduğu saptanmıştır. PNRSV, PPV ve

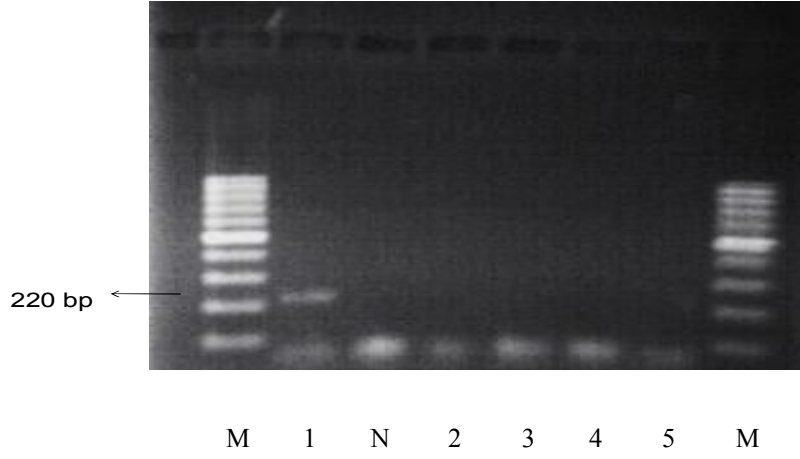
PDV virüslerine ait izolatların total nükleik asit ekstraksiyonundan sonra gerçekleştirilen RT-PCR ile söz konusu üç viral etmenin teşhisleri başarı ile gerçekleştirilmiş ve virüslere ait beklenen uzunluktaki DNA fragmentleri agaroz jelde görüntülenmiştir.

PNRSV, PPV ve PDV virüslerinin RT-PCR testi ile teşhisinde toplam 105 badem yaprak örneği testlenmiştir. Çizelge 3.2’de gösterilen ve her bir virüse ait primer çiftleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan PNRSV virüsü için 71 yaprak örneği, PDV için 20 adet yaprak örneği ve PPV için ise 14 yaprak örneğine RT-PCR testi uygulanmıştır. PCR sonrasında Şekil 4.10’da görüldüğü üzere PNRSV, PPV ve PDV virüslerine ait beklenen uzunluktaki spesifik bantlar elde edilmiştir.

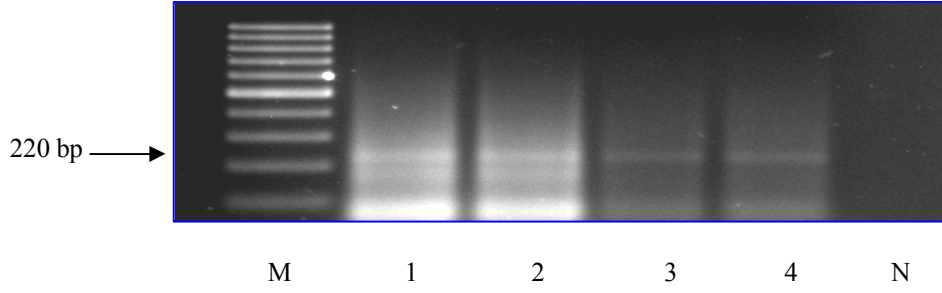


**Şekil 4.10.** PNRSV, PPV ve PDV virüslerine ait DNA fragmentlerine ait bantlar (M: 100 bp DNA marker; 1,2,3,4 no’lu örnekler PNRSV; 5,6,7 no’lu örnekler PDV; 8,9,10 no’lu PPV ile enfekteli örnekler, N: Negatif kontrol).

Badem çiçek örneklerinden ELISA testinde PPV için 1 adet pozitif reaksiyon veren çiçek örneği ile şüpheli sonuçlar veren 39 çiçek örneği RT-PCR ile testlenmiştir. RT-PCR testi sonucunda PPV virüsü genomuna ait 220 bp uzunluğundaki fragmentin sadece pozitif reaksiyon veren örnekte varlığı kanıtlanmıştır (Şekil 4.11). Diğer 39 çiçek örneği RT-PCR testi sonucunda da PNRSV ve PDV virüsleri için pozitif reaksiyon vermemiştir. Serolojik testler sonucunda badem yaprak örneklerinin RT-PCR ile teşhisi için seçilen 14 adet yaprak örneğinde ELISA testi sonucunda pozitif reaksiyon veren 4 badem yaprak örneğinin dışında PPV ile enfekteli örneklere rastlanmamıştır. Şekil 4.12’de görüldüğü üzere 4 yaprak örneğinde 220 bp uzunluğunda yeterli amplifikasyon ürünü elde edilmiştir.

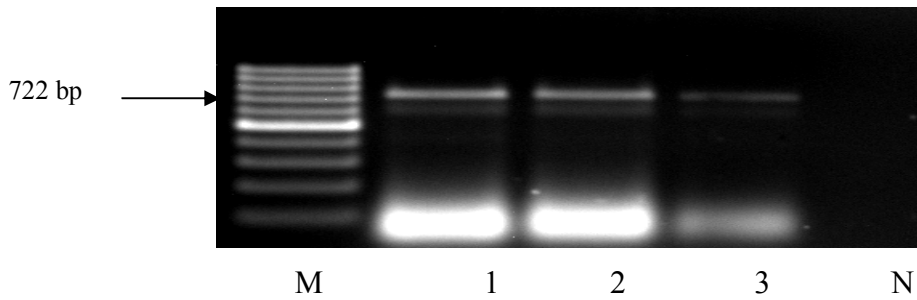


**Şekil 4.11.** RT-PCR sonucu PPV ile enfekteli badem çiçek petal yaprak örneklerine ait 220 bp uzunluğundaki bantın görünümü (M: 100 bp DNA Marker, 1 no'lu örnek, N: Negatif Kontrol, 3,4,5 no'lu badem çiçek örnekleri)



**Şekil 4.12.** PPV virüsü ile enfekteli yaprak örneklerine ait PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen bantlar (M: 100 bp DNA marker; 1,2,3,4 no'lu PPV ile enfekteli örnekler, N: Negatif kontrol)

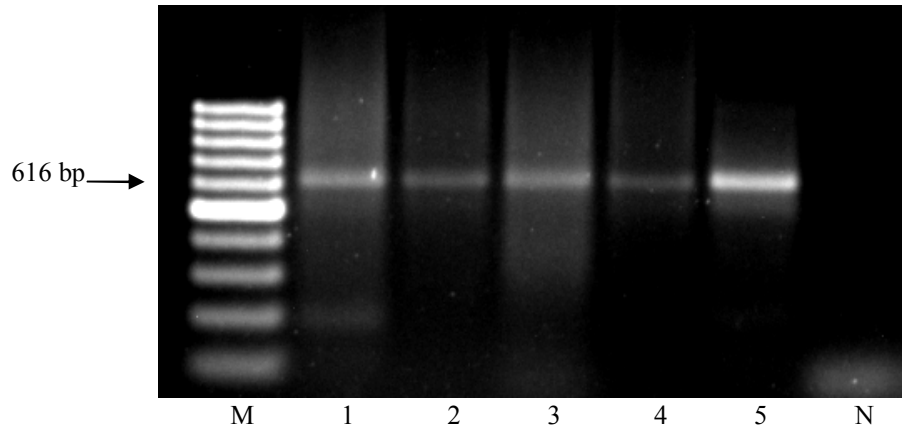
PDV virüsünün RT-PCR ile teşhisi için seçilen 20 ayrı izolattan üç pozitif örneğin dışında (Şekil 4.13) yeterli amplifikasyon ürünü sağlanamamış, böylece ELISA testi sonucu elde edilen bulgulardan farklı bir sonuç elde edilememiştir.



**Şekil 4.13.** PDV virüsü ile enfekteli örneklerde tespit edilen 722 bp uzunluktaki PCR ürünleri (M: 100 bp DNA marker, 1,2,3 no'lu PDV ile enfekteli yaprak örnekleri, N:Negatif kontrol)



PNRSV virüsünün RT-PCR ile teşhisi için, ELISA testi sonucunda pozitif reaksiyon veren örneklerin yanı sıra şüpheli sonuçlar veren örnekler ile simptom gösteren ancak negatif sonuçlar veren 71 yaprak örneği için uygulanmıştır. ELISA testinde negatif sonuç veren 5 yaprak örneği PCR sonucunda pozitif reaksiyon vermiştir. Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi bu sayı PNRSV saptanan yaprak örnek sayısına  $76+5=81$  eklenmiştir. Şekil 4.14’de gösterildiği gibi spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda PNRSV’nün 616 bp uzunluktaki DNA fragmentlerine ait bantlar elde edilmiştir.



**Şekil 4.14.** PNRSV virüsünün RT-PCR testi sonucu elde edilen PCR ürünleri (M: 100 bp DNA marker; 1,2,3,4,5 no’lu PNRSV ile enfekteli yaprak örnekleri, N: Negatif kontrol)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Trakya Bölgesi'nde tarla tarımı en önemli tarımsal uğraş alanı olmasına rağmen üreticilerin daha değerli bitkisel ürünlere yönelmeleri meyveciliği bir alternatif olarak ortaya çıkarmaktadır. Sert çekirdekli meyvelerden bademin (*Prunus dulcis* Mill.)'in geleneksel olarak bireysel ağaçlar halinde bölgenin her yerinde bulunması meyve türü olarak kapama badem bahçesi ve plantasyonları tesis edilmesini özendirilmektedir. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın Trakya Bölgesi üreticilerini, kültür bitkileri çeşitliliği bakımından polikültüre özendirmesi yanında Çevre ve Orman Bakanlığı'nın özel orman tesis projelerinde ceviz ve bademe öncelik vermesi çiftçileri badem üretimine yöneltmektedir. Bademin botanik taksonomideki yeri incelendiğinde Akalın (1952) ile Bayrak ve Yılmaz (2009) belirtmektedir. Türkiye florasının en az üç tür bademin anavatanı olduğunu göstermektedir. *Prunus amygdalus amara*, acı bademe acılığı veren siyanitrik asit olup tıbbi olarak acı badem yağından yararlanır. Diğer badem tür ve çeşitlerinde siyanitrik asit içeriği çok düşük veya hiç bulunmaz. Yenilerek tüketilebilecek bademler, tatlı bademlerdir. Halen Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na 11 çeşit yerli, 10 çeşit de ithal olmak üzere 21 çeşit badem tescil edilmiştir ve fidan üretimine izin verilmiştir (Bayrak 2009). Ayrıca 5 yerli 9 ithal olmak üzere 14 yeni aday çeşit tescil aşamasında bulunmaktadır. Bunun anlamı Türkiye'nin neresinde olursa olsun en olumsuz toprak ve iklim koşullarına uygun badem fidanı bulmak ve değerlendirmek mümkündür. Türkiye'nin yüksek üretim potansiyeline sahip olmasına rağmen 2008 yılı verilerine göre Dünya badem üretiminde 8. sırada yer alması ve yılda 1000 tona yakın ithalat yapması kabul edilebilir bir husus değildir. Halen Trakya Bölgesi'nde bazı ithal çeşitler ve yerli Dokuz Oğuz çeşidi ile kurulmuş tesislere rastlanmaktadır. Bunların artması gerekir.

Her kültür bitkisi gibi bademin de patojenlerden ve stres faktörlerinden kaynaklanan hastalıkları vardır. Nitekim Horst (2008), Dünya'da bademin 18 fungal, 3 bakteriyel, 2 nematod, 6 adet de virüs hastalığı olmak üzere toplam 29 patojenik hastalıktan zarar gördüğünü bildirmiştir. Bu hastalıklardan sistemik virüs hastalıklarının Şekil 3.1'de gösterildiği üzere Trakya Bölgesi badem üretim alanlarında bulunabileceği hipotezi ile bu proje çalışması gerçekleştirilmiştir. 2010 yılında yapılan surveyler sonucu Trakya badem üretim alanlarındaki il ve ilçelerden Çizelge 3.1'de gösterilen 158 çiçek ve 260 adet yaprak örneği toplanmıştır. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.8, Şekil 4.9'da görüldüğü gibi sistemik semptomlar sergileyen ağaçlardan çiçek ve yaprak örnekleri elde

edilerek ve bu örnekler *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Plum pox virus* (PPV)'leri bakımından incelenerek sonuca ulaşılmıştır.

Bertozzi ve ark. (2002) tarafından da önerildiği şekilde elde edilen çiçek ve yaprak örneklerine zaman alıcı ve mekaniksel inokulasyon ve biyolojik indeksleme yerine doğrudan Clark ve Adams (1977)'in önerdiği ELISA serolojik testleri ile Mullis ve ark. (1986) ve Saiki ve ark. (1988) geliştirdikleri Polymerase Chain Reaction (PCR) testleri uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuçlardan ilki bölgeden toplanan 158 badem çiçek örneğinden sadece 1 tanesinde *Plum pox virus* (PPV)'ne rastlanmış olmasıdır. Halbuki Bertozzi ve ark. (2002) *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'nün araştırılmasında badem çiçek tomurcuk ve petal yapraklarının, Silva ve ark. (2003) ise *Prune dwarf virus* (PDV)'nün saptanmasında badem çiçek ve polenlerinin uygun materyal olabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Çalışmada her iki virüsün yaprak örneklerinde saptandıkları halde çiçek örneklerinde bulunmayışları bir çelişkiyi ortaya koymuştur.

Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi Trakya Bölgesi'nde badem ağaçlarından alınan yaprak örneklerine uygulanan ELISA ve RT-PCR test sonuçlarında *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'nün % 31,15 oranında, *Prune dwarf virus* (PDV)'nün % 4,23 oranında ve *Plum pox virus* (PPV)'nün % 2,31 oranında bulunduğu saptanmıştır. Bu bulgular Azeri ve Çiçek (1994) tarafından Ege Bölgesi badem fidanlıklarındaki *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) ve *Prune dwarf virus* (PDV)'ün bulunuş oranlarını teyit etmektedir. Ancak bademlerde % 2,31 oranında da olsa PPV'nün saptanmış olması, bu virüse hem çiçek ve hem de yaprak örneklerinde rastlanmış olması badem için yeni ve önemli bir bulguyu ifade etmektedir. Aslında İlbağı ve ark. (2008) PPV'nü Trakya Bölgesi'nin doğal bir bitkisi olan *Prunus spinosa* L.'da % 24,10 oranında saptamış olup virüsün PPV-M ırkı olduğunu da bildirmişlerdir. Keza Sipahioğlu ve ark. (1999) hem *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) hem de *Prune dwarf virus* (PDV)'nü Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki sert çekirdekli meyve türlerinde saptamış olmalarına rağmen PPV'nün bademlerde bulunduğu dair herhangi bir bulguya ulaşmamışlardır. Benzer şekilde Jarrar ve ark. (2001) Filistin'de badem ağaçlarında % 13,3 oranında *Prune dwarf virus* (PDV)'ne rastlarken *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'nü % 25 oranında kirazda ve % 26,7 oranında şeftalide bulmuşlardır. Bu üç virüsün Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında % 38,84 oranında bulaşık olması bölgede kurulan ve kurulacak olan badem bahçe ve plantasyonları için tesisleri kurma aşamasında önlemler alınmasını da gerekli kılmaktadır.

Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Plum pox virus* (PPV)'nün bulunuşu, moleküler RT-PCR testi ile de saptanarak üçü bir arada Şekil 4.10'da sergilendiği gibi bu virüslere ait DNA fragmentlerine ait bantlarla kanıtlanmıştır. Badem örneklerinde bu üç virüsün birden testlenmesi için Jarosova ve ark. (2010) tek tüpte multiplex RT-PCR yöntemini ve bunun için de bir primer kokteyli hazırladıklarını bildirmişlerdir. Böyle araştırmalar badem ağaçlarında saptanmış olan virüslerin diğer sert çekirdekli meyveler için de önemli olduğu şeklinde de değerlendirilmelidir. Ayrıca bu virüslerden *Plum pox virus* (PPV) badem çiçek örneğinde saptanarak 220 bp uzunluğundaki bant Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Keza *Plum pox virus* (PPV)'nün badem yaprak örneklerindeki varlığı keza tekrar saptanmıştır. Bu bulgular *Plum pox virus* (PPV)'nün Türkiye'nin Trakya Bölgesi badem ağaçlarında hem ELISA ile ve hem de RT-PCR testi ile saptanmış olduğu ilk bulgulardandır. Keza RT-PCR test sonuçlarına göre *Prune dwarf virus* (PDV)'nün varlığı da badem yaprak örneklerinde saptanmış olup 722 bp uzunluktaki PCR ürünlerini içeren bantlar Şekil 4.13'de sergilenmiş bulunmaktadır. ELISA testlerine göre; Trakya Bölgesi badem ağaçlarında % 31,15 oranında saptanan *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)'nün yaprak örneklerindeki varlığı RT-PCR testi sonucu Şekil 4.14'de görüldüğü gibi 616 bp'lik beklenen uzunluktaki bantları vermiştir.

Gerek serolojik ELISA testleri ve gerekse moleküler RT-PCR testleri sonucunda Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında üç ayrı virüsün bulunduğu ve bunların *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) ve *Plum pox virus* (PPV) oldukları somut bir şekilde kanıtlanmıştır. Şüphesiz bölgede kurulacak badem plantasyonları ve kapama badem bahçelerinin tesisinde bu virüslerden arı fidan kullanımı yanında bireysel olarak Trakya'nın her yerleşim biriminde görülen yaşlı badem ağaçlarının eradikasyonu ile verimli tesisler kurulabilir. Nitekim bu doğrultudaki başarılı örnek çalışma Portekiz'de Miguel ve ark. (2000) bildirdiği gibi Türkiye'de de başarılabilir olduğu açıktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Agrios GN (2005). Plant Pathology. Fifth edition, Elsevier Academic Pres. 922 p, London, New York.
- Akalın Ş (1952). Büyük bitkiler kılavuzu. Cilt 1, Güzel Sanatlar Matbaası, 628s Ankara.
- Anonim (2004). Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Kurumu, Ankara.
- Anonim (2007). Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Kurumu, Ankara.
- Anonim (2008). Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Kurumu, Ankara.
- Azeri T, Çiçek, Y (1993). Detection of virus diseases affecting almond nursery trees in western Anatolia (Turkey). Bitki Koruma Bülteni, Ankara.
- Bayrak S, Yılmaz Ö (2009). Ceviz- Badem yetiştiriciliği. Rekmay Reklam ve Tanıtım Ltd. Şti., 321s Ankara.
- 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: 207-210.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L (1996). Viruses of Plants. Descriptions and lists from the VIDE Database. Cab International, University Press Cambridge, 1484 p, U.K.
- Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.
- Çağlayan K, Sertkaya G, Ulubas C, 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.
- Dunez J (1988). Fruit crop sanitation in the 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, 67 p, Italy.
- Fauquet CM, Mayo MA (1999). Abbreviations for plant virus names. Arch. Virol. 144:1249-1273.

- Foissac X, Savalle-Dumas L, Gentit P, Dulucq MJ, Canderesse T (2001). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357: 52-59.
- Fulton RW (1983). Description of Ilarviruses Group CMI/AAB Description of Plant Viruses No: 275.
- Hadidi A, Levy L (1994). Accurate identification of *Plum pox virus* and its differentiation from Asian prunus latent potyvirus in prunus germplasm. *EPPO Bulletin*, 24: 633-643.
- Horst RK (2008). *Westcott's Plant Disease handbook*. 7 th Editon Springer, 1317p, Berlin
- 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.
- Jarsova J, Kundu JK (2010). Detection of *Prune dwarf virus* by one-step RT-PCR and its quantitation by Realtime PCR. *Journal of Virological Methods*, 164:139-144.
- Kaşka N, Küden A, Küden, AB (1994). Almond production in Southeast Anatolia. *ISHS Acta Horticulturae 373,1 International Congress on Almond*.
- Küden AB, Küden A, Kaşka N (1994). Adaptations of some selected almonds to Mediterranean Region of Turkey. *ISHS Acta Horticulturae 373, 1 International Congress on almond*.
- Kölber M, Nemeth M, Topchiiska M, Glasa M, Metlitskaja T (2001). Corrent situation of Plum pox disease on stone fruitspecies 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*.
- Larsen HJ, Oldfield GN (1995). Peach Mosaic Virus. In compendium of stone fruit diseases Edit. By Ogawa et al. APS Pres, Minneapolis MN. 67-68 p,USA.
- Merkuria G, Ramesh SA, Alberts E, Bertozzi T, Wirthensohn M, Collins G, Sedgley M (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR fort he 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 MM, Nolasco G, Raquel MH, Ferreira EL (1997). Invitro culture and improvement of Portuguese almond varieties. Second international symposium on pistachios and almonda. *Acta Horticulturae*, 470: 562-569.

- Mullis KF, Faloon F, Scharf S, Saiki R, Horn G (1986). Specific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia. Quant.Biol., 51: 263-273.
- Myrta A, Boscia D, Potere O, Kolber M, Nemeth M, Di Terlizzi B, Cambra M, Savino V (2001). Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain, M. European Journal of Plant Pathology, 107: 845-848.
- Öztekin V (2006). K.S.Ü. Sekamer koleksiyon parselindeki badem ağaçlarında virüs hastalıklarının serolojik teşhisleri ve kontrol. Yüksek Lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Pribek D, Palkovics L, Gaborjanyi R (2001). Molecular characterization of *Plum pox virus* almond isolate. Proceedings of the 18 th International Symposium on Virus and Virus –like Diseases of Temprate fruit crops. Volume 1. ISHS Acta Horticulturae, 550: 91- 95.
- 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.
- Saade M, Aparicio F, Sánchez-Navarro JA, Herranz MC, 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 RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491.
- Savino V, Martelli GP, Digiaro M, Di Terlizzi B (1994). Virus and virus like diseases of almond in South East Italy. International Congress on almond. ISHS Acta Horticulturae 373.
- Serce C, Ertunc F, Ozturk A (2009). Identification and genomic variability of *Prune dwarf virus* variants infecting stone fruit trees in Turkey. Journal of Plant Pathology, 157: 298-305.
- Sertkaya G, Ulubaş SÇ, 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.
- Sipahioğlu HM, 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.

- Silva C, Tereso S, Nolasco G, Oliveira MM (2003). Cellular location of Prune dwarf virus in almond sections by insitu reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 93: 278-285.
- Smith KM (1972). A textbook of plant virus diseases. Academic Press. 684 p. New York and London.
- Spiegel S, Tam Y, Maslenin L, Kolber M, Nemeth M, Rosner A (1999). Typing Prunus necrotic ringspot virus isolates by serology and restriction endonuclease analysis of PCR products. *Annals of Applied Biology*, 135: 395-400.
- 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 DD, Ford RE, Tosic MT (1999). Handbook of plant virus diseases. C.R.C pres.553p. New York. USA.
- 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: 25-33.
- Yüzer D (2008). Kahramanmaraş'ta badem cadı süpürgesi (*Candidatus phytoplasma phoenicum*) fitoplazma hastalığının moleküler teşhisi. Yüksek Lisans tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.



## EK 1.

### DAS-ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 1. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline) (PBS) pH:7,4

NaCl.....	8,0 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2,9 gr veya
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2,3 gr
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	1,44 gr
*Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Susuz).....	1,15 gr
KCl.....	0,2 gr
NaN <sub>3</sub> .....	0,2 gr

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'ı 0,1 NaOH veya 0,1 N HCl ile ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

#### 2. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH: 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	1,59 gr
NaHCO <sub>3</sub> .....	2,93 gr
NaN <sub>3</sub> .....	0,2 gr

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'ı ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

#### 3. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) pH: 7,4

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) .....	1 litre
Tween-20.....	0,5 litre

1 litre PBS tampon çözeltisi içerisine 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır. Kullanım süresince +4 °C'de saklanmıştır.

#### 4. Örnek Tampon Çözeltisi (Sample Extraction Buffer)

Bir litre yıkama tampon çözeltisi içerisine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

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

Örnek tampon çözeltisi.....1 litre  
Ovalbumin (egg albumin).....2 gr

1 litre örnek tampon çözeltisi içerisine % 0,2 oranında ovalbumin ilave edilerek hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

#### 6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrat Buffer) pH: 9,8

Diethanolamine.....9,7 ml  
NaN<sub>3</sub>.....0,02 gr

9,7 ml Diethanolamine 80 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0,02 gr NaN<sub>3</sub> eklenmiş ve HCl ile pH: 9,8'e ayarlanarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti + 4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH'ı kontrol edilmiştir.

## EK 2.

### Total Nükleik Asit Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 1. Ekstraksiyon Buffer (Grinding Buffer) pH: 5,6-5,8

Guanidine Thiocyanate (4 M).....	23.64 gr
NaOAc (pH: 5,2) (0.2 M).....	1.36 gr
EDTA (25mM).....	0,465 gr
KOAc (1 M).....	4,9 gr
PVP-40 (% 2,5wt/vol).....	1,25 gr
2-ME (% 1)	

CH<sub>3</sub>COOH ile pH ayarlanır. Otoklav ile steril edilir. Çalışma süresince ezme tamponu 4<sup>0</sup>C'de saklanır. % 1'lik Mercaptoethanol ekstraksiyondan hemen önce eklenir. Ekstraksiyon tamponu, 50 ml'ye göre hazırlanmıştır.

#### 2. Sodyum İyodid Solüsyonu (NaI)

Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	0.75 gr
NaI (Sigma S8379).....	36 gr

40 ml steril saf su içerisinde kimyasallar çözdürülür. Daha sonra saf su ile 50 ml'ye tamamlanır. Otoklav ile steril edilir. Çalışma süresince 4<sup>0</sup>C'de saklanır.

#### 3. Silika Süspansiyonunun Hazırlanması pH: 2,0

Silica (Sigma %12 S5631).....	60 gr
-------------------------------	-------

Bir mezür kabındaki 500 ml saf su içerisine 60 gr silika koyulur ve karıştırılır. 24 saat beklenir. 470 ml üst sıvı atılır ve 500 ml'ye tamamlanarak iyice karıştırılır. 5 saat bekletilir ve 440 ml üst sıvı atılır. Geriye kalan 60 ml bulamaç HCl ile pH'ı 2,0 olarak ayarlanır. Otoklav edilir ve karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

#### 4. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer 1X)

Tris-HCl pH: 7,5 (1 M).....	10 mM
EDTA (5 M).....	0,5 mM
NaCl (0,5 M).....	50 mM
Ethanol % 50	

Bileşimler eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra % 50 oranında Ethanol yani 100 ml saf Ethanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanır. Ethanol eklemeden önce otoklav ile sterilize edilir ve 4<sup>0</sup>C'de saklanır.

### **EK 3.**

#### **Elektroforezde Kullanılan Tampon Çözeltiler**

##### 50 X TAE (Tris Acetate EDTA) Stok Solüsyonu

Tris-base.....	242 gr
Glacial Acetic Acid.....	57,1 ml
EDTA (0,5 M).....	100 ml

TAE tampon hazırlamada, 242 gr Tris base steril beherglasa konur. Üzerine 57,1 ml Glacial Acetic Acid ve 100 ml EDTA (pH: 8,0)'dan koyularak steril su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklanır.

## 7. TEŞEKKÜR

Trakya Bölgesi'nde Badem ağaçlarında görülen virüs hastalıklarını tez konusu olarak belirleyen ve hazırlanma süresince katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Havva İLBAĞI'na ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca deneyimlerini ve bilgilerini sürekli benimle paylaşan hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tez çalışmam esnasında yapıcı eleştirilerini ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU'na ve Araş. Gör. Mustafa USTA'ya çok teşekkür ederim. Tüm eğitimim boyunca bana her konuda destek veren ve cesaretlendiren aileme gönül dolusu teşekkürlerimi, minnettarlığımı ifade etmek isterim. Ayrıca TÜBİTAK-TOVAG 109 O 491 numaralı proje kapsamında tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkürlerimi sunarım.

**Melis KARABACAK**

## 8. ÖZGEÇMİŞ

- 1986 yılında İstanbul'da doğdu.
- 2004 yılında İstanbul İstek Özel Semiha Şakir lisesi'nden mezun oldu.
- 2008 yılında Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldu ve Ziraat Mühendisi ünvanını aldı.
- 2009 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.
- 2009 yılında Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında Selanik Aristotle Üniversitesi'nde bir yarıyıl öğrenim gördü.