



Adıyaman ili badem ağaçlarını enfekte eden önemli Prunus virüslerinin DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri ile saptanması ve karakterizasyonu

Detection and characterization of some important Prunus viruses infecting almond trees in Adıyaman province of Turkey by DAS-ELISA and RT-PCR analysis

Sadık AKGÜL¹ , Mona GAZEL¹ , Bahar TUNÇ¹ , Kadriye ÇAĞLAYAN¹ 

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antakya-Hatay, Türkiye.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:


DOI: [10.37908/mkutbd.923357](https://doi.org/10.37908/mkutbd.923357)

Geliş tarihi / Received: 20.04.2021

Kabul tarihi / Accepted: 17.07.2021

Keywords:

Almond, virus, DAS-ELISA, RT-PCR, sequence analysis.

 Corresponding author: Mona GAZEL

 mhurigil@mku.edu.tr

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: In this study, it was aimed to investigate the presence of apple mosaic virus (ApMV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (PPV) and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in almond trees in Adıyaman province by Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) methods, to analyse the phylogenetic relationships of obtained virus isolates.

Methods and Results: Symptomatic and asymptomatic plant samples were collected from almond trees from Adıyaman province. All samples were tested by DAS-ELISA and RT-PCR methods. As a result of DAS-ELISA and RT-PCR analysis, 34 samples were found to be infected only with PDV and other viruses tested were not detected in the samples. PDV isolates obtained by RT-PCR were directly sequenced and then nucleotide sequences were phylogenetically analyzed with each other and compared with other PDV isolates, deposited in GenBank. Adıyaman-PDV isolates were clustered in a same group with a high homology and differed from other PDV isolates retrieved from the GenBank. This is the first report of the presence of PDV in almond plantations in Adıyaman province. 15 of the PDV almond isolates were registered in GenBank with the accession numbers MW357407-MW357421.

Conclusions: The presence of prune dwarf virus (PDV) in almond trees in Adıyaman has been proven for the first time by this study as a result of both DAS-ELISA and RT-PCR tests. The fact that the almond trees in Adıyaman are infected with PDV with an infection rate of 30.90% which makes it necessary to take measures during the establishment of the almond plantations in the region. Since ACLSV, ApMV, PNRSV and PPV are not detected in the tested almond samples, so in future studies, it is recommended to increase the number of samples by surveying larger areas to make new tests using different virus specific primer pairs.

Significance and Impact of the Study: Detection and characterization of important prunus viruses on almonds in Adıyaman province has been investigated for the first time.

Atf / Citation: Akgül S, Gazel M, Tunç B, Çağlayan Ç (2021) Adıyaman ili badem ağaçlarını enfekte eden önemli Prunus virüslerinin DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri ile saptanması ve karakterizasyonu. *MKU. Tar. Bil. Derg.* 26(3) : 576-585. DOI: [10.37908/mkutbd.923357](https://doi.org/10.37908/mkutbd.923357)

GİRİŞ

Türkiye'nin Doğu Karadeniz kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylalar dışında kalan her yöresinde badem (*Prunus amygdalus* Bathsch.) yetiştirilmektedir. Ülkemiz 2019 yılı verilerine göre ortalama 150.000 ton üretimi ile (Anonim, 2019), dünyanın önde gelen badem üreticisi ülkelerden birisi olmasına rağmen badem ihtiyacını karşılayamamakta ve iç badem ithalatında bulunmaktadır. Türkiye ekolojisi badem üretimi için büyük bir potansiyel içermektedir ve ülkemiz bu değerli meyve türünde iddialı bir konuma gelecek durumdadır. Badem ülkemizde birçok ilde kapama bahçeler ve plantasyonlar halinde üretilmekte ve son yıllarda üretimi teşvik edilmektedir. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Adıyaman ili badem yetiştiriciliğinde üretim alanı bakımından İstatistik Veri Ağı (İVA) 2017 yılı tahmini verilerine göre 51.495 da ile Türkiye'de ilk sırada yer almaktadır. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türünde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları büyük sorunlara neden olmaktadır (Dunez, 1988; 2000). Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi badem ağaçlarında da virüs hastalıkları genellikle yaprak ve meyvede renk bozulmalarına, gövdede deformasyona, üründe azalmalara ve aşı uyumsuzluklarına ve hatta ileri aşamalarda ağaçlarda ölümlere neden olmaktadır. Bunun yanında virüs enfeksiyonları badem ağaçlarında verim ve kaliteyi önemli ölçüde düşürmektedir (Kahn, 1976). Sert çekirdekli meyve ağaçlarının yetiştirildiği her yerde yaygın olarak bulunan virüslerden badem ağaçlarında da ekonomik zarar yapan virüsler; erik nekrotik halkalı leke virüsü (*prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), elma klorotik yaprak leke virüsü (*apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), erik cücelik virüsü (*prune dwarf virus*, PDV), elma mozaik virüsü (*apple mosaic virus*, ApMV) ve erik şarka virüsü (*plum pox virus*, PPV)'dür (Nemeth, 1986; Dunez, 1988). Yapılan pek çok çalışma bu virüslerin başta Avrupa olmak üzere tüm dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir (Dunez, 1988; Myrta ve ark., 2003). Ancak badem ağaçlarının diğer sert çekirdekli meyve ağaçlarına oranla daha az sayıda virüs ve virüs benzeri etmen tarafından enfekte edildiği bildirilmiştir (Digiario ve ark., 1992). Literatürlerde badem ağaçlarında 10'dan daha az sayıda virüs hastalığı rapor edilmiş olmasına karşın bu sayı vişnede 39, şeftalide ise 37'dir (Nemeth, 1986). Ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarında virüslerin saptanması konusunda çok çalışma bulunmasına karşın (Gazel, 1997; Elibüyük ve Erdiller, 1998; Çağlayan ve ark.,

1998; Sipahioğlu ve ark., 1999; Sertkaya ve ark., 2004; Gümüş ve ark., 2007; Ulubaş Serçe ve ark., 2009), yalnızca badem virüsleri konusunda Kahramanmaraş ve Tekirdağ illerinde yapılmış iki farklı çalışma bulunmakta ancak Adıyaman ili badem ağaçlarında virüslerin tespiti konusunda bir çalışma bulunmamaktadır.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne ait badem bahçesinde virüslerin yaygınlığının araştırıldığı bir çalışmada toplanan 222 örnek, DAS-ELISA yöntemi ile PNRSV, PDV, PPV, ACLSV ve ApMV'nin saptanması amacıyla testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemiyle testlenen 222 badem ağacının 52 tanesinde (%23.4) PNRSV ve ACLSV'lerinin tekil enfeksiyonları saptanmıştır. Yapılan testlemelerde en yaygın virüs PNRSV (%20.3) olarak saptanırken, onu ACLSV (%3.2) takip etmiştir, ancak bu sonuçlar RT-PCR analizleriyle desteklenmemiştir. Testlenen badem örneklerinde PDV, ApMV ve PPV enfeksiyonu bulunmamıştır (Öztekın, 2006).

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

Bu çalışmada, Adıyaman ilinde badem ağaçlarının elma mozaik virüsü (ApMV), elma klorotik yaprak leke virüsü (ACLSV), erik cüceleşme virüsü (PDV), erik nekrotik halkalı leke virüsü (PNRSV) ve erik şarka virüsü (PPV)'lerine karşı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenerek bu virüslerin badem ağaçlarındaki yaygınlık oranlarının belirlenmesi ve elde edilen virüs izolatlarının nükleotid dizilerinin tespit edilerek moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Arazi çalışmaları ve bitki materyalinin toplanması

Çalışma kapsamında 2016-2018 yılları arasında Adıyaman ili Merkez ve Kahta ilçelerinde badem bahçelerinde survey çalışmaları yapılarak, virüs simptomu gösteren ağaçlar yanında simptom

göstermeyen ağaçlardan toplam 110 örnek toplanmış ve -20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

DAS-ELISA testleri

Toplanan bitki materyali Clark ve Adams (1977)'e göre DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Test PDV'e karşı antiserum içeren ticari ELISA kiti (BIOREBA AG, İsviçre) kullanılarak ilgili firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda plakalarda meydana gelen renk değişimleri gözlenmiş ve ayrıca sonuçlar SEAC SIRIO S ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Okumalar sonucunda absorbans değerleri, negatif örneklerin iki katı ya da daha fazla olan örnekler pozitif yani virüs enfekteli olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981; Gazel ve ark., 2018).

Toplam nükleik asit eldesi, cDNA sentezi ve PCR analizleri

Badem ağaçlarından toplanan yaprak örneklerinden toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu Rott ve Jelkmann (2001)'nin protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen TNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır. İzole edilen RNA'ların kalitesi Nanodrop cihazı (Nanodrop 1000c, Thermo Sci., USA) ile ölçülmüş ve cDNA eldesinde kullanılmıştır. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer (Thermo

Fisher Scientific), 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buz üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5XRT tampon çözeltisinden (Thermo Fisher Scientific) 4 µl, d₂H₂O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden (Thermo Fisher Scientific) 1µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42°C'de 1 saat 72°C'de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmış ve bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmalarında 5 farklı virüse spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR işlemlerinde 2.5 µl 10× PCR buffer, 1.5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, her bir primerden (10 µM) 1 µl ve 0.25 µl Taq DNA polymerase (5 units/µl, Thermo Fisher Scientific) içeren 25 µl'lik reaksiyon karışımı kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 94°C'de 5 dakikayı takiben 35 döngü 94°C'de 30 saniye, 54°C'de 45 saniye ve 72°C'de 1 dakika ve son uzama ise 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma sıcaklığı çalışılan virüse göre değiştirilmiştir. Badem ağaçlarındaki ApMV, ACLSV, PNRSV, PDV ve PPV'ünün PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri, primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri Çizelge 1'de verilmiştir. PCR ürünleri TAE buffer içeren %1'lik agaroz jel elektroforezinden sonra EtBr ile boyanarak UV altında gözlemlenmiştir.

Çizelge 1. Badem örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge ve baz büyüklükleri

Table 1. Viruses for which almond samples are tested, nucleotide sequences of primer pairs used in PCR analysis, the region and base sizes in which they are amplified

Virüs	Primer dizilimleri (5'-3')	Amplikon büyüklüğü	Hedef gen bölgesi	Referans
ApMV	F:ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA R:GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	262	CP	Menzel ve ark., 2002
ACLSV	F:TTCATGGAAAGACAGGGGCAA R:AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	677	CP	Menzel ve ark., 2002
PDV	F:AGTTTCCGCTGAAGATTGG R:ACAGACTCGGCTTCCTTGA	756	MP	Predajna ve ark., 2017
PNRSV	F:TCACTCTAGATCTCAA GCAG R:CGTTTTTCTTTCTTTCTTCC	785	CP	Rosner ve ark., 1998
PPV	F:ACCGAGACCACTACACTCCC R:CTTCAACAACGCCTGTGCGT	193	CP	Olmos ve ark., 1997

DNA dizileme ve filogenetik analiz

PCR reaksiyonları ile çoğaltılan her bir virüs izolatına ait DNA fragmentleri baz dizileri tayin edilmek üzere ürünler ticari bir firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Nükleotid dizisi kromotogramları birleştirilmiş ve GAP4 programı kullanılarak düzenlenmiştir (Bonfield ve ark., 1995).

Çoklu nükleotid hizalamaları ile yapılan filogenetik analizler Neighbor-Joining metodu ile (Saitou ve Nei, 1987) MEGAX programı (Kumar ve ark., 2018) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Arazi surveyleri

Adıyaman ili badem ağaçlarında virüs benzeri belirtiler kapama bahçelerde yetiştirilen badem ağaçlarından ziyade bahçe ve yol kenarlarında yetişen yaşlı badem ağaçlarında gözlenmiştir. En yaygın belirtiler yetersiz çiçeklenme, yapraklarda sararma, klorotik lekeler, şiddetli mozaik belirtileri, damar bantlaşması, halkalı

lekeler ve meşe yaprağı deseni olarak gözlenmiştir (Şekil 1). Bazı ağaçlarda bu belirtilerin sadece birisi görülürken, bazı ağaçlarda ise birden fazla belirtiler bir arada görülmüştür. PDV ile bulaşık ağaçların yapraklarında küçülme ve daralma, damar bölgesinde kırışma, sürgün aralarında kısalma özellikle kiraz yapraklarında klorotik halka ve lekeler meydana geldiği bildirilmiştir (Nemeth, 1986; Sutic ve ark.,1999).



Şekil 1. Adıyaman ilinde badem yapraklarında gözlenen damar bantlaşması, halkalı leke ve şiddetli mozaik belirtileri

Figure 1. Vein banding, ring spot and severe mosaic symptoms observed on almond leaves in Adıyaman province

DAS-ELISA testlerinin sonuçları

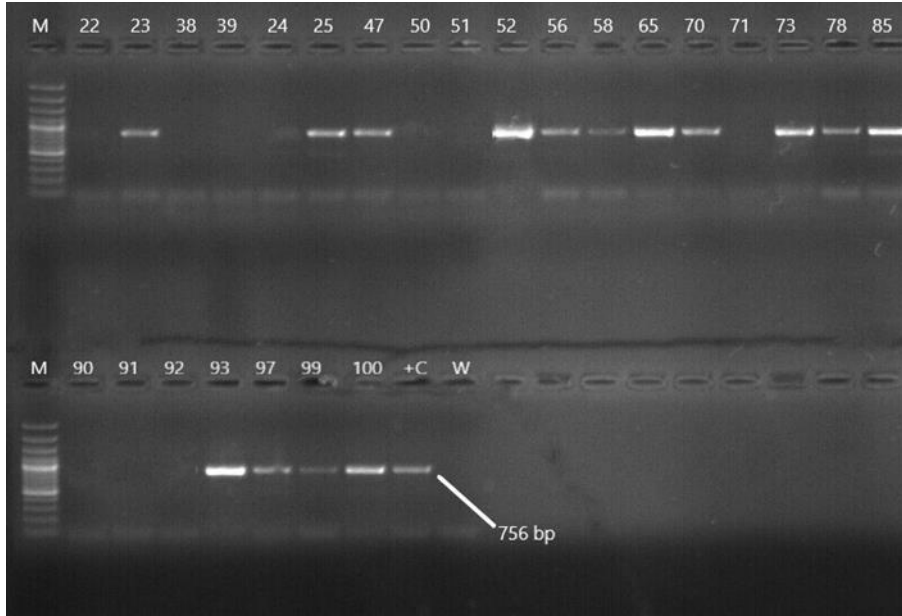
Adıyaman ilinde badem ağaçlarındaki virüslerin saptanması amacıyla yapılan surveyler kapsamında toplam 110 örnek toplanmış olup tüm örnekler antiserumların temin edildiği firmanın prosedürüne göre DAS-ELISA testlerine tabi tutulmuştur. Yapılan DAS-ELISA testlemeleri sonucunda toplanan 110 adet badem örneğinden 34 tanesinde yalnızca PDV saptanmış olup, testlenen örneklerde ApMV, ACLSV, PNRSV ve PPV tespit edilememiştir. Toplanan örneklerde mozaik lekeler ve damar bantlaşması biçiminde belirtiler gösteren örneklerin tümü DAS-ELISA testinde pozitif sonuç vermiştir. Belirtiler gözlenmeyen örnekler DAS-ELISA testleri sonucunda negatif bulunmuşlardır. DAS-ELISA testinde beklediği gibi pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerin absorbans değeri oldukça yüksek bulunurken negatif kontrollerde düşük absorbans değerleri elde edilmiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre Adıyaman ilinde testlenen badem örneklerinin PDV ile enfeksiyon oranı %30.90 olarak saptanmıştır. Serolojik testler sonucunda elde edilen bulgular, daha önce Akdeniz ülkelerinde, Myrta ve ark. (2003), ülkemizde Ege Bölgesi'nde Gümüş ve ark. (2007) ve Isparta'da Çevik ve ark. (2011)'nin

yaptığı çalışmalar sonucunda PDV'nin tüm sert çekirdekli meyve ağaçlarında en sık görülen virüs olduğu sonuçları ile paralellikler göstermektedir. Bulgaristan'ın güneyinden toplanan 2592 adet sert çekirdekli meyve ağacı örneğinin DAS-ELISA ile analiz edilmesi sonucunda en yüksek PDV enfeksiyonu kirazda (%15.8) bulunurken bunu sırasıyla kayısı (%15.46), erik (%14.47), şeftali (%11.25), badem (%8.6), P. mahaleb (%1.45) ve vişne (%1.4) izlemiştir (Milusheva ve Borisova, 2005). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ne ait badem bahçesinden toplanan 222 örnekte ACLSV, ApMV, PDV, PNRSV ve PPV'lerinin varlığı DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmış ve testlenen 222 badem ağacında PDV, ApMV ve PPV'leri saptanamamış olup, PNRSV %20.3, ACLSV ise %3.2 oranında bulunmuştur (Öztekin, 2006).

RT-PCR ve sekans analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan badem örneklerinden izole edilen toplam nükleik asitler, ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV ve PPV tanısı için geliştirilen primer çiftleri ve uygun PCR koşulları kullanılarak RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. RT-PCR analizleri ile testlenen 110 badem örneğinde söz konusu beş viral etmeden sadece

PDV'üne ait beklenen uzunluktaki (756 bp) DNA fragmenti çoğaltılırken (Şekil 2) testlenen örneklerde ApMV, ACLSV, PNRSV ve PPV saptanamamıştır.



Şekil 2. Adıyaman ilinden toplanan badem örneklerinde prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PD3-331F/PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 22, 23, 38, 39, 24, 25, 47, 50, 51, 52, 56, 58, 65, 70, 71, 73, 78, 85, 90, 91, 92, 93, 97, 99, 100: Badem örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

Figure 2. Agarose gel electrophoresis result of RT-PCR analysis using PD3-331F / PD3-1086R primer pair to detect prune dwarf virus (PDV) in almond samples collected from Adıyaman province. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 22, 23, 38, 39, 24, 25, 47, 50, 51, 52, 56, 58, 65, 70, 71, 73, 78, 85, 90, 91, 92, 93, 97, 99, 100: Almond samples, +C: Positive control, W: Water control

Bu çalışma sonucunda Adıyaman ilinden toplanan 110 badem örneğinin RT-PCR yöntemiyle analiz sonucunda 34 tanesinin PDV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre PDV Adıyaman ilinde badem ağaçlarında ilk kez moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyve ağaçlarında PDV ve PNRSV'lerinin beraber bulunduğu saptanmış olmakla beraber her iki virüsün tekli enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır. Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan 1019 sert çekirdekli meyve ağacında (859 kayısı, 120 kiraz, 21 badem ve 19 şeftali) PDV enfeksiyonu %2.64 oranında bulunmuştur. Testlenen 21 badem ağacından 7 tanesinin PDV (%33 enfeksiyon) ile enfekteli olduğu saptanmış olup, bademlerde diğer virüsler saptanamamıştır (Sipahioğlu ve ark., 1999). Trakya Bölgesi'nde Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinde 2010 yılında toplanan 418 (158 çiçek ve 260 yaprak) badem örneğinin PDV, PNRSV ve PPV açısından ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmesi sonucunda badem ağaçlarının %31.15 oranında PNRSV, %4.23 PDV ve %2.31 oranında PPV ile enfekteli oldukları saptanmıştır (Karabacak, 2012 Jarrar ve ark. (2001),

Filistin'de simptomatik 196 badem ağacından aldıkları yaprak örneklerinin %13.3 oranında PDV ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir. Lübnan'da ELISA ile testlenen 599 badem ağacında PNRSV %3.3, ACLSV %2.7, PDV %2.5 ve ApMV ise %1.8 oranında saptanmıştır (Kanaan-Atallah ve ark., 2000).

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

Testlenen örnekler DAS-ELISA testleri ve RT-PCR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, sonuçların birbirleri ile paralel olduğu görülmektedir. Adıyaman ili badem ağaçlarında ilk kez yapılan bu çalışmada PDV'nin oldukça yaygın olduğu tespit edilmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda tespit edilen 15 PDV izolatının nükleotid baz dizileri tespit edilmiştir. Filogenetik analizlerde 718 baz

uzunluğunda nükleotid dizileri kullanılmış olup, izolatların kendi arasında en yüksek %99.584, en düşük ise %97.197 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. PDV izolatlarının nükleotid dizileri NCBI GenBankasına yüklenerek her biri için GenBank erişim numarası alınmıştır (MW357407-MW357421). Bu nükleotidlerden elde edilen 239aa uzunluğundaki aminoasit dizisinin kendi aralarında aminoasit düzeyindeki benzerliği ise %99.163 olarak tespit edilmiştir. PDV izolatlarımızın gen bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid seviyesinde %90.682 oranıyla HM015769 numaralı Polonya izolatı ile en yüksek benzerlik gösterdiği, %88.039 oranıyla MK560342 numaralı Kanada izolatı ile en düşük benzerlik gösterdiği saptanmıştır. PDV izolatlarına ait NJ (Neighbor Joining) dendogramı incelendiğinde PDV badem izolatlarımızın birbirine çok benzediği ve filogenetik ağaçta aynı grup içinde yer aldığı, gen bankası izolatlarının ayrı bir grupta kümelendiği belirlenmiştir (Şekil 3).

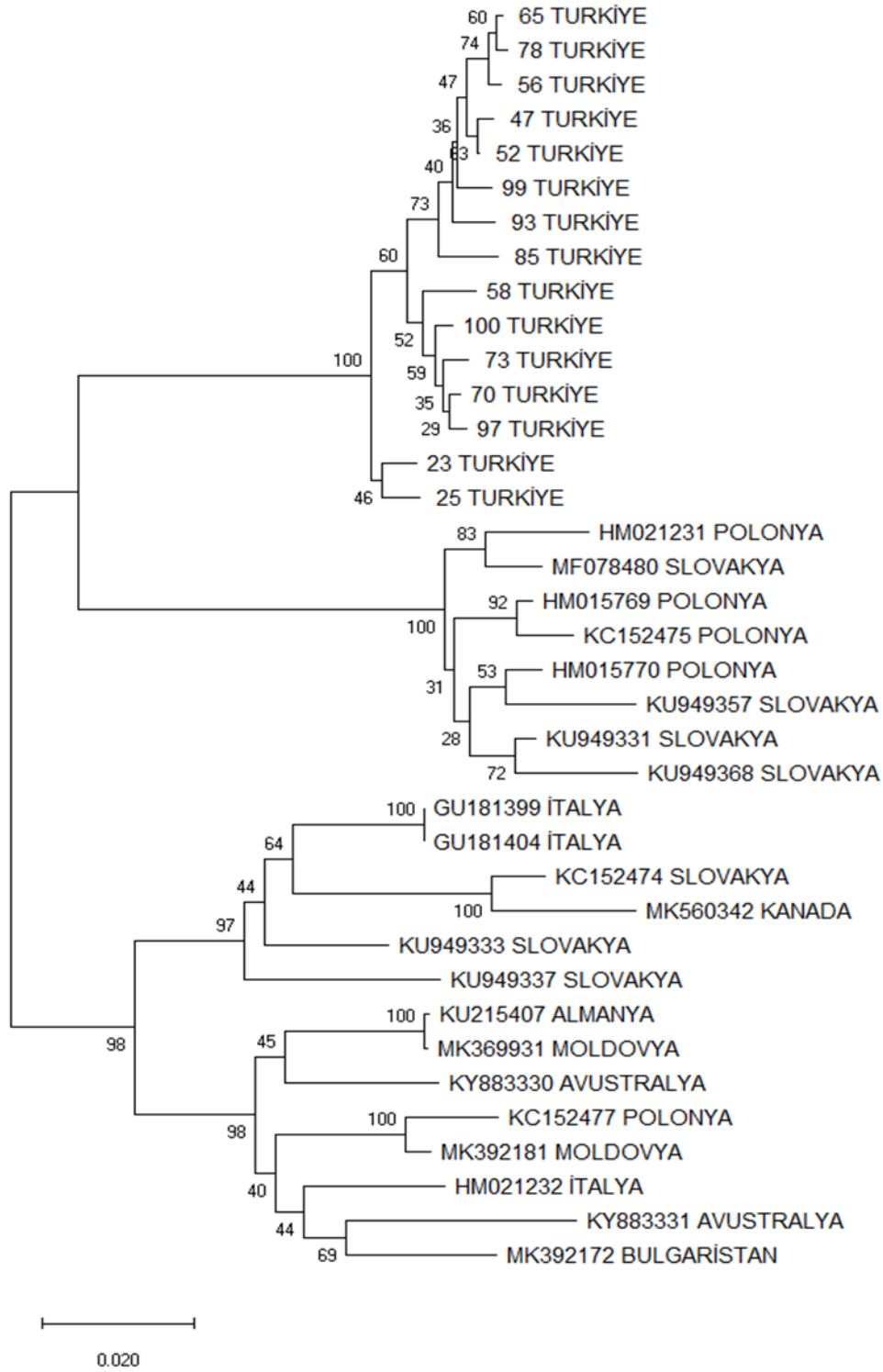
Sonuç olarak, Adıyaman ilimizde uzun yıllardır tarla tarımı en önemli tarımsal uğraş alanı olmasına rağmen, son yıllarda üreticiler farklı bitkisel ürünlerin yetiştiriciliğine yönelmişlerdir. Tarım ve Köyleri Bakanlığı'nın Adıyaman'da üreticileri, badem üretimine yöneltmesi sonucu badem yetiştiriciliği yaygınlaşmıştır. Ticari amaçla yapılan badem yetiştiriciliği Adıyaman ili için yeni bir ürün olmakla birlikte kapama bahçelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Ülkemiz genelinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında olduğu gibi (Yavuz ve ark., 2019; Gazel ve ark., 2020) sert çekirdekli meyve ağaçlarından olan bademlerde abiyotik stres, viral ve fitoplazmalardan kaynaklanan hastalıkları vardır. Horst (2008), dünyada badem ağaçlarının 18 fungal, 3 bakteriyel, 2 nematod, 6 adet de virüs hastalığı olmak üzere toplam 29 patojenik hastalıktan zarar gördüğünü bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında Adıyaman ilinde badem bahçelerinde virüs surveyi yapılarak toplanan örnekler ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV ve PPV'lerine karşı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmiş ve sonucu elde edilen izolatların DNA sekans analizi yöntemiyle

karakterizasyonu yapılmıştır. Testlenen örneklerde sadece PDV bulunurken (%30.90 enfeksiyon oranı) diğer virüsler bulunamamıştır.

PDV izolatlarının sekans analizi sonucunda, bu izolatların genetik olarak birbirine benzerlik oranının yüksek olduğu (en yüksek %99.584 en düşük %97.197) belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler "ön çalışma" niteliğinde olup, bu çalışmada kullanılan PDV'e özgü primer çiftinin yerli izolatları tanıyabildiği belirlenmiştir.

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

Virüslerin etkili bir kimyasal mücadelesi bulunmadığından korunma önlemleri ön plana çıkmaktadır. Yeni kurulacak badem bahçelerinin mutlaka virüsten ari ve sertifikalı fidanlarla oluşturulmasına dikkat edilmeli, bölgede aşı gözü ve fidan üreten tesisler her yıl düzenli olarak bu hastalık yönünden kontrolden geçirilmeli ve bulaşık olan bitkiler üretim dışı bırakılmalıdır. Bölgede kurulacak badem plantasyonları ve kapama badem bahçelerinin tesisinde bu virüslerden ari fidan temini ve dikimi yanında, semptomlu badem ağaçlarının eradikasyonu yapılmalıdır. Türkiye'de meyve ağaçlarında sertifikasyon programları konusunda resmi olarak ilk çalışmalar 1997 yılında başlatılmış olmasına rağmen, programın gerektiği koşullarda yürütülmemesinden dolayı sağlıklı bitkisel materyal elde edilmesi, taşınması ve kullanılması konusunda aksamlar bulunmaktadır. Meyve yetiştiriciliğinin geliştirilmesi için iç karantinaya önem verilmesi gerekmekte ve vakit kaybedilmeden ulusal boyutta sertifikasyon programının başlatılması ve kontrollü bir şekilde uygulanması gerekmektedir.



Şekil 3. Adiyaman ilinde badem ağaçlarından elde edilen PDV izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı PDV izolatlarının nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve %50' nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını (0.02) göstermektedir

Figure 3. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of PDV isolates obtained from almond trees in Adiyaman province and some PDV isolates registered in the GenBank (NCBI) database. Neighbor-joining (NJ) method in MEGA X software was used in phylogenetic analyses. In the dendrogram, bootstrap (select-connect prediction test) values are shown as percentages in branches and values below 50% are not included in the tree. The scale shows the amount of base change (0.02) for the same position.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Adıyaman ili genelinde yetişen badem ağaçlarında apple mosaic virus (ApMV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (PPV) ve apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)'lerinin Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) ve Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemleriyle belirlenmesi, elde edilen virüs izolatlarının filogenetik ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yöntemler ve Bulgular: Adıyaman ilinde yetişen badem ağaçlarından simptomsuz ve simptomsuz bitki örnekleri toplanmıştır. Toplanan tüm örnekler DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR analizi sonucunda 34 örneğin yalnız PDV ile enfekteli olduğu saptanmış, ancak testlenen örneklerde diğer virüsler bulunmamıştır. RT-PCR ile elde edilen PDV izolatları doğrudan sekanslanmıştır. Nükleotid sekansları birbiriyle ve GenBank'ta depolanan diğer PDV izolatları ile karşılaştırılarak filogenetik olarak analiz edilmiştir. Adıyaman PDV badem izolatlarının filogenetik ağaçta yüksek homolojiyle aynı grupta yer aldığı, GenBank'a kayıtlı diğer PDV izolatlarından ise farklı bir grupta kümelendiği belirlenmiştir. Bu çalışma Adıyaman ili badem ağaçlarında PDV'nin saptanması konusundaki ilk çalışmadır. PDV badem izolatlarından 15 tanesi MW357407-MW357421 erişim numaraları ile GenBankası'na kaydedilmiştir.

Genel Yorum: Adıyaman'da yetişen badem ağaçlarında prune dwarf virus (PDV)'unun varlığı, hem DAS-ELISA hem de RT-PCR testleri sonucunda ilk kez bu çalışma ile kanıtlanmıştır. Adıyaman'da yetişen badem ağaçlarının %30,90 oranında PDV ile bulaşık olması, bölgede badem plantasyonlarının kurulması sırasında önlem alınması gerektiğini göstermektedir. Test edilen badem örneklerinde ACLSV, ApMV, PNRSV ve PPV tespit edilmediğinden, ileride yapılacak çalışmalar ile daha geniş alanları tarayarak örnek sayısının artırılması ve virüslere özgü farklı primer çiftleri kullanılarak yeni testlerin yapılması gerekmektedir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Adıyaman ilinde yetişen badem ağaçlarında önemli Prunus virüslerinin tespiti ve karakterizasyonu ilk kez yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Badem, virüs, DAS-ELISA, RT-PCR, sekans analizleri.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: MKU BAP-18YL090).

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anonim (2019) TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10.06.2020)
- Bonfield JK, Smith K, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the micro-plate method of Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay for the detection of plant viruses. *J Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Clark MF (1981). Immunosorbent assay plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.
- Çağlayan K, Gazel M, Hadidi A (1998) Virus and virus-like diseases of stone fruits in the eastern Mediterranean of Turkey. *Acta Hort.* 472(2): 527-529.
- Çevik B, Yardımcı N, Çulal Kılıç H (2011). Detection of Viruses Infecting Stone Fruits in Western Mediterranean Region of Turkey. *Plant Pathol.* 27: 44-52.
- Digiario M, Savino V, Di Terlizzi B (1992) Ilarviruses in apricot and plum pollen. *Acta Hort.* 309: 93-98.
- Dunez J (1988) Situation of virus and virus-like diseases of stone fruits in the Mediterranean and Near east region. In: *Fruit crop sanitation in the Mediterranean and Near East region: status and requirements.* UNDP/FAO Publication, France. pp. 226-275.
- Dunez J (2000) Virus and virus-like diseases of stone fruits. *Options Méditerranéennes Serie B: Studies and Research Number 35, Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Bari.* pp 67.
- Elibüyük İÖ, Erdiller G (1998) Investigation on the causes of fruit dropping of apricot and plum trees in Ankara province. *J. Turk. Phytopath.* 17(3): 98.

- Gazel MH (1997) Hatay Bölgesi Prunus türlerindeki virüs hastalıklarının ELISA ve biyolojik yöntemlerle tanınması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 55 s.
- Gazel M, Tunç B, Çağlayan K (2018) Hatay ve Tekirdağ illeri bağ alanlarında odun dokusunda deformasyona (Rugose Wood) neden olan virüslerin serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 23: 181-187.
- Gazel M, Serçe CU, Öztürk H, Çağlayan K (2020) Farklı armut dokularında ve örnekleme zamanında 'Candidatus *Phytoplasma pyri*'nin PCR-RFLP analizleri ile saptanması. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 25: 406-412.
- Gümüş M, Paylan IC, Matic S, Myrta A, Sipahioğlu HM, Erkan S (2007). Occurrence and Distribution of Stone Fruit Viruses and Viroids In Commercial Plantings Of Prunus Species In Western Anatolia. Turkey. Journal of Plant Pathology 89: 265-268.
- Horst RK (2008) Westcott's Plant Disease handbook. 7 th Editon Springer, Berlin, 1317p.
- Jarrar S, Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V (2001) Viruses of stone fruits in Palestine. Proceedings of the 18Th international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops-top fruit diseases. Acta Horticulturae 550: 245-248.
- Kahn RP (1976) Quarantine and the detection of stone fruit viruses in plant importations, In: Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. (Ed. Fulton RW) U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service Press, Washington. pp 23-32.
- Kanaan-Atallah ZH, Abou-Jawdah Y, Saad A (2000) Virus diseases infecting almond germplasm in Lebanon. Phytopathol. Mediterr. 39: 417-422.
- Karabacak M (2012) Trakya Bölgesi'nde badem (*Prunus dulcis*) ağaçlarında görülen virüs hastalıklarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 44 sayfa.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35: 1547-1549.
- Menzel W, Jelkmann W, Maiss E (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. Virol. Methods 99: 81-92.
- Milusheva SA, Borisova AZ (2005) The incidence of prunus necrotic ringspot and prune dwarf viruses in Prunus species in South Bulgaria. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 19: 42-45.
- Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V, Martelli GP (2003) Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys, In: Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits with Particular Reference to the Mediterranean Region, (Eds. Myrta A. Di Terlizzi B, Savino V), Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 45, Bari. Pp 15-23.
- Nemeth M (1986) Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit trees, Springer Netherlands Publishing, Budapest, pp 841.
- Olmos A, Cambra M, Dasi MA, Candresse T, Esteban O, Gorris MT, Asensio M (1997) Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. J. Virol. Methods 68: 127-137.
- Öztekin V (2006) K.S.Ü. Sekamer koleksiyon parselindeki badem ağaçlarında virüs hastalıklarının serolojik teşhisleri ve kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 43 s.
- Predajňa L, Sihelská N, Benediková D, Šoltys K, Candresse T, Glasa M (2017) Molecular characterization of prune dwarf virus cherry isolates from Slovakia shows their substantial variability and reveals recombination events in PDV RNA3. Eur. J. Plant Pathol. 147: 877-885.
- Rosner A, Shibolet Y, Spiegel S, Krisbai L, Kölber M (1998) Evaluating the use of immunocapture and sap-dilution PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus. In: 17 th. International Symposium On Fruit Tree Virus Diseases. Ed. A. Hadidi, Acta Hort. 472: 227-233.
- Rott ME, Jelkmann W (2001) Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. Eur. J. Plant Pathol. 107: 411-420.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbour-Joining Method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- 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 Hort. 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, France. pp 439-442.
- Sutic DD, Ford RE, Tosic MT (1999) Handbook of plant virus diseases. C.R.C press.553p. New York. USA.

Ulubaş Serçe Ç, Ertunç F, Öztürk A (2009) Identification and genomic variability of prune dwarf virus variants infecting stone fruit trees in Turkey. *J. Phytopathol.* 157(5): 298-305.

Yavuz Ş, Gazel M, Çağlayan K (2019) Adana ve İçel illerinde elma bahçelerinde elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığı (Candidatus *Phytoplasma mali*)'nın varlığının belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 24: 15-20.

Yegül M (2017) Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ve ceviz ağaçlarında görülen virüs hastalıklarının saptanması, karakterizasyonu ve bazı çeşit davranışlarının belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 197s.