T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİ CEVİZ ve BADEM ÜRETİM ALANLARINDA VİRÜS HASTALIKLARININ ARAŞTIRILMASI

KISMET GÜRBÜZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
ARALIK - 2022

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİ CEVİZ ve BADEM ÜRETİM ALANLARINDA VİRÜS HASTALIKLARININ ARAŞTIRILMASI

KISMET GÜRBÜZ
ORCID:0000-0003-3757-270X

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. GÜLŞEN SERTKAYA

ORCID: 0000-0003-3319-1790

HATAY
ARALIK - 2022

02/12/2022

TEZ BİLDİRİMİ

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

İmzası

Kısmet GÜRBÜZ

ÖZET

HATAY İLİ CEVİZ ve BADEM ÜRETİM ALANLARINDA VİRÜS HASTALIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma, Hatay ilinin Altınözü, Antakya-Serinyol, Belen, Kırıkhan, Reyhanlı, Samandağ ve Yayladağı ilçelerinde badem ve ceviz üretim alanlarında virüs enfeksiyonlarının araştırılması amacı ile yürütülmüştür. Arazi çıkışlarında belirti gösteren 160 ceviz ve 70 badem, 13 yabancı ot türüne ait toplam 243 adet bitki örneği alınmış ve DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Toplanan badem ve ceviz örnekleri arabis mosaic virus (ArMV), cherry leaf roll virus (CLRV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virüs (şarka virüsü-PPV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) yönünden biyolojik indeksleme (özsu inokulasyonu) ve serolojik (DAS-ELISA), fitoplazma enfeksiyonu için moleküler yöntemler (nested PCR- nPCR) kullanılarak yapılmıştır.

Badem örnekleri için yapılan testlemeler soncunda %7.1 oranı ile en fazla PNRSV ve PDV enfeksiyonları belirlenmiştir. Bu virüsleri ArMV (%5.7) izlemiştir. Badem örneklerinde CLRV ve PPV belirlenmemiştir.

Hatay ili ceviz örneklerinde en yaygın ve en fazla virüs enfeksiyonu CLRV (%8.7) ve PDV (%4.3) olarak belirlenmiş, bunu ArMV (%2.5) ve PNRSV (%1.8) izlemiştir. Ceviz örneklerinde PPV belirlenmemiştir. Samandağ ilçesinde meyve fidanlığından alınan ceviz örneklerinde virüs enfeksiyonu belirlenememiştir. Genç bir ceviz bahçesinden alınan 1 adet yabancı ot (*Solanum nigrum*) örneği ilk kez PPV yönünden pozitif bulunmuştur.

Fitoplazma enfeksiyonlarından şüphelenilen badem örneklerinde yapraklarda şiddetli sararma veya kırmızımsı-mor renk oluşumu, yapraklarda kıvrılma, yaprak sayısında azalma, aynı gözden çoklu kısa sürgün gelişimi veya genç sürgünlerin ölmesi gibi simptomlar gözlenmiştir. Nested PCR (nPCR) yöntemi ile analiz edilen badem örneklerinde 4/8 oranında fitoplazma için pozitif sonuç alınmıştır.

2022, 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: Badem, Ceviz, DAS-ELISA, PCR, Virüs

ABSTRACT

INVESTIGATION of VIRUS DISEASES in WALNUT and ALMOND PRODUCTION AREAS in HATAY

This study was carried out to investigate viral infections in almond and walnut production areas in Altınözü, Antakya-Serinyol, Belen, Kırıkhan, Reyhanlı, Samandağ and Yayladağı districts of Hatay province. During the surveys in the orchards, a total of 243 plant samples belonging to 160 walnut and 70 almond and 13 weed species showing symptoms were collected and tested by biological indexing and DAS-ELISA methods for presence of arabis mosaic virus (ArMV), cherry leaf roll virus (CLRV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (sharka virus-PPV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV). Phytoplasma infections were also analyzed by using molecular method (nested PCR-nPCR) in suspected almond and walnut samples.

As a result of the analyzes made for almond samples, the highest infection rates were determined for PNRSV and PDV by the rate of 7.1%. These viruses were followed by ArMV (5.7%). CLRV and PPV were not determined in tested almond samples.

The most common viruses were CLRV (8.7%) and PDV (4.3%) in walnut samples from Hatay province. Then, ArMV and PNRSV were detected by the rates of 2.5% and 1.8%, respectively. PPV was not determined in walnut samples. Virus infections were not found in walnut samples taken from nurseries in Samandağ district. One of the weed samples (*Solanum nigrum*) taken from a young walnut orchard was found positive for PPV infection for the first time.

The main symptoms such as yellowing, reddish-purple discoloration of the leaves, decreasing in the number of leaves, multiple shoot regenerations or dieback of young shoots were observed on almond samples suspected for presence of phytoplasma infection. Almond samples analyzed by nested PCR (nPCR) method gave a positive result by the rate of 4/8.

2021, 36 pages

Key Words: Almond, Walnut, DAS-ELISA, PCR, Virus

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan gerek doktora tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarıma ışık tutan ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA 'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (HMKÜ-BAP) Koordinatörlüğüne ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarımda yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Dr. Öğr. Üyesi Hakan ÇARPAR ve Zir. Müh. Dilan ÇEN' e çok teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

ÖZET I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ V
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ VII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
3. MATERYAL ve YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.2. Yöntem 11
3.2.1. Arazi Çalışmaları 11
3.2.2. İklim Odası (Mekanik İnokulasyon) Çalışmaları 12
3.2.3. Laboratuvar Çalışmaları 13
3.2.3.1. Serolojik Çalışmalar (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 13
3.2.3.2. Moleküler Çalışmalar 14
3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu 14
3.2.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları 16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 17
4.1. Arazi Çalışmalarına Ait Bulgular 17
4.2. Serolojik Çalışmalara (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Ait Bulgular 21
4.3. Fitoplazma Analizi için Moleküler Çalışmalara (nPCR: nested Polymerase Chain Reaction) Ait Bulgular 24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 27
KAYNAKLAR 31
ÖZGEÇMİŞ 34
EKLER 35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye'de 1995-2020 yılları arasında badem üretim miktarı (Anonim, 2021).....1
Çizelge 1.2. Dünyada önemli badem üreticisi bazı ülkeler (Anonymous, 2020) 2
Çizelge 1.3. Türkiye'de önemli badem üreticisi iller (Anonim, 2020).....2
Çizelge 1.4. Dünyada önemli ceviz üreticisi bazı ülkeler (Anonymous, 2020).....3
Çizelge 1.5. Türkiye'de ceviz üretimi yapılan önemli iller (Anonim, 2021).....3
Çizelge 1.6. Sert çekirdekli meyvelerde sorun olan yaygın bazı virüs ve benzeri etmenler …….…….4
Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri 12
Çizelge 3.2. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri……. 16
Çizelge 1.3. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR girdileri ve miktarı. 16
Çizelge 1.4. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR döngüleri…… 16
Çizelge 4.1. Hatay ili badem üretim alanlarından toplanan örnek sayıları ve DAS-ELISA sonuçları.....21
Çizelge 4.2. Hatay ilinde ceviz alanlarından toplanan örnek sayıları ve DAS-ELISA sonuçları 23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Hatay ilinde bitki materyali toplanan ilçeler.....11
Şekil 3.2. İklim odasında test bitkilerinde mekanik inokülasyon çalışmaları (A-B) 13
Şekil 4.1. Hatay ilinde ceviz ve badem bahçelerinden genel görünüm: A) Samandağ'da ceviz fidanlığı, B) Yayladağı'nda genç ceviz bahçesi, C- D) Altınözü badem bahçeleri 17
Şekil 4.2. Badem ve ceviz ağaçlarında gözlenen genel simptomlar: A-B) Badem yapraklarında kızarıklık ve kaşıklaşma, C-D) Ceviz yapraklarında kaşıklaşma, E-F) Ceviz sürgünlerinde geriye doğru kuruma, F-I) Ceviz ana dal ve gövdesinde-aşı bölgesinde nekroz oluşumu 18
Şekil 4.3. Samandağ ve Yayladağı'nda gözlenen bazı ceviz zararlıları: A-B) Ceviz küçük yaprakbiti (*Chromaphis juglandicola*), C) Yayladağ- Aslanyazı yöresinde genç ceviz ağacının gövde ve anadallarında çamuratan (*Agalmatium flavescens*), D) Ceviz yaprakuyuzu (*Aceria erinea*), E) Ceviz yaprak gal akarı (*Eriophyes tristriatus*) ……..20
Şekil 4.4. Ceviz bahçesinden alınan ve PPV pozitif bulunan *Solanum nigrum* örneğindeki genel belirtiler: A-B) Şiddetli kloroz, mozaikleşme, yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu ve kaşıklaşma.....24
Şekil 4.5. Bazı ceviz ve badem örneklerinin fitoplazma yönünden PCR sonuçları: A) Ceviz örnekleri (1-13), B) Badem örnekleri (1-8), M: Moleküler markır, PK (1 ve 2): Pozitif kontrol, W: Su kontrol 25

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
Ha	: Hektar
µg	: mikrogram
mg	: miligram
g	: gram
kg	: kilogram
mL	: mililitre
µm	: mikrometre
min	: Dakika
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)
%	: Yüzde

KISALTMALAR

ACLSV	: Apple chlorotic leaf spot virus
CLRV	: Cherry leaf roll virus
DAS-ELISA	: DoubleAntibodySandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IgG	: Immuno globulin G
NaCl	: Sodium klorür
PDV	: Prune dwarf virus
PNRSV	: Prunus necrotic ring spot virus
PPV	: Plum pox virus
RT-PCR	: Reverse Trancriptase- Polimeraz Chain Reaction
Taq polymerase	: Tag polimeraz enzimi
WB	: Washing buffer

1. GİRİŞ

Türkiye farklı iklim bölgesi olarak birçok ekolojilere sahip ve çok sayıda tür ve çeşitliliklerin olduğu bir ülkedir (Anonim, 2011). Ülkemizde turunçgil, sert ve yumuşak çekirdekli meyvelerin yanı sıra sert kabuklu meyvelerin de önemli derecede üretimi yapılmaktadır. Sert kabuklu meyveler arasında antepfıstığı, badem, ceviz, fındık, kestane bulunmaktadır.

Türkiye'de hemen hemen tüm bölgelerde yetişebilen badem, Doğu Karadeniz'in kıyı bölgesinde ve yüksek yaylaları dışında her bölgede üretilebilmektedir. Ülkemizde badem yetiştiriciliği en fazla Ege Bölgesi'nde yapılmakta olup sırayla Akdeniz, İç Anadolu ve Marmara bölgelerinde üretimi yapılmaktadır. Ege Bölgesi'nde ise en önemli üretim yeri Datça yarımadasıdır (Anonim, 2007; 2011). Türkiye'de badem üretiminin yıllara göre dağılımı Çizelge 1.1.'de görülmektedir (Anonim, 2021).

Çizelge 1.1. Türkiye'de 1995-2020 yılları arasında badem üretim miktarı (Anonim, 2021)

Yıllar	**Üretim (ton)**
1995	37.000
2000	47.000
2005	45.000
2010	55.398
2011	69.838
2012	80.261
2013	82.850
2014	73.230
2015	80.000
2020	158.000

Dünya badem üretimine bakıldığında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) toplam üretimin %58.8'ini sağlayarak 1. sırada yer almaktadır. Dünya sıralamasında İspanya 2. sırada yer alırken (%10.7), İran %4.4'lük üretim payı ile 3. sırada yer almaktadır. Türkiye ise toplam dünya üretiminin %3,1'ni sağlayarak 5. sırada yer almaktadır (Çizelge1.2) (Anonymous, 2020).

Türkiye'de illere göre badem üretimi yapılan önemli bazı iller Çizelge1.3'de verilmiştir. Çizelge1.3 incelendiğinde badem üretiminde %12.8 ile Mersin 1. sırada yer alırken %6 ile Adıyaman 2. sırada yer almaktadır.

Çizelge 1.2. Dünyada önemli badem üreticisi bazı ülkeler (Anonymous, 2020)

Ülkeler	**Üretim (Ton)**
ABD	1.872.500
İspanya	339.033
İran	139.029
Fas	117.270
Türkiye	**159.187**
İtalya	79.801
Avustralya	69.880
Toplam	3.182.902

Çizelge 1.3. Türkiye'de önemli badem üreticisi iller (Anonim, 2020)

İller	**Üretim (Ton)**
Mersin	22.929
Adıyaman	15.470
Antalya	9.795
Manisa	8.030
Çanakkale	7.786
Muğla	9.955
Denizli	6.316
Gaziantep	3.369
Hatay	**709**
Toplam	**286.706**

Ceviz dünya genelinde yetiştiriciliği yapılan önemli bir meyve türüdür. Besin değerinin ve tüketiciler için talep potansiyelinin yüksek olması cevizin; gıda, mobilya, ilaç gibi sanayi sektörlerinde üreticilerin de tercihi olmaktadır. Bu özellikler nedeniyle dünya ve Türkiye'de ceviz dikimiyle ağaçlandırma alanlarında artış meydana gelmektedir. Ceviz, 2016 yılı verilerine göre sert kabuklu meyveler içerisinde dünyada alan olarak %24'lük pay ile ilk üç sırada yer almakta olup, üretim miktarı bakımından ise %34'lük pay ile ilk sıradadır. Üretim miktarı olarak daha sonra sırasıyla %29 ile badem, %21 ile kestane, %10 ile antepfıstığı ve %6 ile fındık yer almaktadır. Türkiye 2016 yılında %61,31 ile fındık ilk sırada yer alırken, bunu %27.24 ile antepfıstığı, %7.55 ile

ceviz, %2.90 ile badem ve son olarak %1 ile kestane izlemektedir. Ağaç başına elde edilen verimde ise 33 kg/ağaç ile kestane, 24 kg/ağaç ile ceviz ve 13 kg/ağaç ile badem ilk üç sırada yer almaktadır (Anonim, 2017).

Türkiye sert kabuklu bir meyve türü olan cevizin anavatanı arasında yer almaktadır. Bu tür dünyada Anadolu veya İran cevizi olarak da bilinmektedir (Özçağıran ve ark., 2007). Dünyada en fazla ceviz üretimi yapılan ülkelerin başında Çin gelmekte, bunu ABD, İran, Türkiye, Ukrayna Meksika izlemektedir. Dünyada ceviz üretimi yapılan önemli ülkeler aşağıdaki Çizelge 1.4' de görülmektedir.

Çizelge 1.4. Dünyada önemli ceviz üreticisi bazı ülkeler (Anonymous, 2020)

Ülkeler	**Üretim (Ton)**
Çin	1.100.000
ABD	707.604
İran	356.666
Türkiye	**286.706**
Ukranya	113.320
Meksika	164.652
Dünya toplamı	**3.323.045**

Ülkemizde en fazla ceviz üretimi yapıldığı iller arasında birinci sırada Mersin yer almaktadır. Bunu Bursa, Denizli, Çorum izlemektedir. Türkiye'de ceviz üretimi yapılan iller aşağıdaki Çizelge 1.5' de görülmektedir.

Çizelge 1.5. Türkiye'de ceviz üretimi yapılan önemli iller (Anonim, 2021)

İller	**Üretim (Ton)**
Mersin	22.598
Bursa	18.991
Denizli	13.595
Çorum	10.986
İzmir	10.286
Antalya	10.225
Çanakkale	10.149
Sakarya	10.104
Hatay	**2.147**

Sert kabuklu meyvelerden ceviz ve badem üretimini sınırlayan birçok biyotik ve abiyotik faktör bulunmaktadır. Badem ağaçları rakımı yüksek yerlerde ilkbahar geç donlarından olumsuz etkilenmekte, bunun sonucunda önemli zarar ve ürün kaybı meydana gelebilmektedir (Karadeniz ve ark., 2019; Anonim, 2022). Biyotik kökenli bazı hastalık ve zararlılar da önemli sorunlar arasında yer almaktadır. Fungal hastalıklar arasında antraknoz, yaprak delen, solgunluk gibi hastalık etmenleri yer almaktadır. Badem yetiştiriciliğinde fungal hastalık ve zararlılar dışında önemli olan bir diğer patojen grubu ise virüslerdir. Önemli ekonomik kayıplara neden olan virüsler üretim materyali, aşılama, farklı kültürel işlemler, polen ve böcekler ile taşınmaktadır. Virüs hastalıklarının herhangi bir kimyasal mücadelesi bulunmamakta olup bu yönü ile yetiştiricilikte diğer hastalık gruplarına kıyasla önemi bir kat daha artmaktadır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde sert çekirdekli meyvelerde sorun olan bazı virüs ve virüs benzeri etmenlerin badem ve ceviz gibi sert kabuklu meyvelerde de zarar yaptığı görülmektedir (Dunez, 1988; Dunez, 2004; Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Sert çekirdekli meyvelerde sorun olan yaygın bazı virüs ve benzeri etmenler

Etmen Adı	**Kısaltması (Acronym)**	**Taksonomik Grubu**	**Taşınma Yolu**
Apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	Trichovirus	Ü.M
Apple mosaic virus	ApMV	Ilarvirus	Ü.M
Apple stem pitting virus	ASPV	Foveavirus	Ü.M
Arabis mosaic virus	ArMV	Nepovirus	Ü.M
American plum line pattern virus	APLPV	Ilarvirus	Ü.M
Cherry green ring mottle virus	CGRMV	Foveavirus	Ü.M
Cherry leaf roll virus	CLRV	Nepovirus	Ü.M, P., T.
Cherry rasp leaf virus	CRLV	Cheravirus	Ü.M, N.
Plum pox virüs sharka	PPV	Potyvirus	Ü.M., A,
Prune dwarf virüs	PDV	Ilarvirus	Ü.M., P., T.
Prunus necrotic ringspot virüs	PNRSV	Ilarvirus	Ü.M., P., T.
Tomato ring spot virüs	ToRSV	Nepovirus	Ü.M., N.
Cherry lethal yellows phytoplasma	CLY	Elm yellows (16SrV) group	Ü.M., B.

*A: afit; B.: böcek; N.: nematod; Ü.M.: üretim materyali; P.: polen; T.: tohum

Sert çekirdekli meyve türlerinde görülen birçok virüs ve benzeri etmenler; üretim materyali, nematod, tohum, polen, yaprak bitleri ve unlu bitler ile taşınmaktadır (Dunez, 1988).

Cevizde en önemli virüs hastalıkların başında cherry leaf roll virus (CLRV) gelmektedir (Civerolo ve Mircetich, 2002). CLRV, nepovirüs grubunda yer almaktadır. Ancak bu gruptaki virüslerden farklı olarak nematodlar ile taşınmadığı düşünülmekte aşı, tohum ve polen ile taşınmaktadır (Wang ve ark. 2002). CLRV cevizde oldukça etkili bir virüs olup iki farklı tipte belirti oluşumuna neden olmaktadır. Eğer anaç ile kalem yerli kültür cevizi (*Juglans regia*) ise çoğu zaman yapraklarda belirgin simptomlar oluşturmamasına rağmen sadece yapraklarda halkalı leke şeklinde belirtiler oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak gelişme ve verimde %20'ye kadar azalmalara neden olmaktadır ve ilerleyen zaman içinde ağaçlar giderek zayıflamakta ve hızla yaşlanmaktadır. CLRV kiraz ve vişne ağaçlarında yapraklarda sararma, yukarıya doğru kıvrılma, yapraklar kırılgan bir yapı oluşumu, hassas çeşitlerde morumsu-erguvani renk oluşumu, daha sonra genellikle yaprak dökülmesi belirtilerine neden olduğu, bulaşık ağaçlarda çiçeklenmenin üç hafta kadar geciktiği, kirazda CLRV enfeksiyonunun yaprak kıvrılması ve bitki ölümü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cropley, 1961; Cropley ve Tomlinson, 1971; Schimanski ve ark., 1975).

Badem, sert kabuklu meyve türleri içerisinde oransal olarak daha az sayıda virüs ve virüs benzeri hastalıklar ile enfektelendiği bildirilmiştir. Virüs enfeksiyonları badem ağaçlarından alınacak ürünün kalite değerleri üzerine olumsuz etki yaptığı ancak bu etkinin boyutları ve virüs epidemiyolojisi hakkındaki araştırmaların yetersiz olduğu veya bölgesel olarak sınırlı kaldığı rapor edilmiştir. Bademde ekonomik zarar yapan virüsler arasında prune dwarf virus (PDV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), plum pox virus (PPV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) ve apple mosaic virus (ApMV) olduğu bildirilmektedir (Digiaro ve ark. 1992).

Türkiye'de Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinde badem ve cevizde mevcut virüslerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yürütülmüş (Yegül ve Baloğlu 2020), Hatay ilinde yapılan bir çalışmada ceviz örneklerinin %43.86 oranında CLRV ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Yegül, 2017).

Hatay ilinde sert kabuklu meyvelerden ceviz ve badem üretiminin yoğun olarak yapıldığı ilçelerde fidan üretim alanları ile yeni tesis edilmiş genç bahçelerde virüs

hastalıklarının durumunu belirlemek için 2018-2022 yılları arasında yürütülmüş bu çalışma ile;

1- Hatay ilinde ceviz ve badem üretiminde sorun olabilecek virüs etmenleri belirlenmiş,

2- Belirlenen virüs enfeksiyon oranlarının ve yaygınlığı tespit edilmiş,

3- Ceviz ve badem alanlarında konukçu olabilecek yabancı ot türleri incelenmiş,

4- Ceviz ve badem alanlarından toplanan potansiyel vektör veya zararlı böcek türleri belirlenmiş,

5- Ceviz ve badem yetiştiriciliğinde önemli sorun olabilecek diğer hastalık ve zararlı durumu genel olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ong (1987) sert kabuklu meyveler arasında yer alan bademde 150' den fazla virüs ve virüs benzeri hastalık etmeninin varlığını ve farklı oranlarda zarara neden olduğunu tespit etmiştir.

Cropley (1961) ve Jones (1985) tarafından 28-30 mm çapında izometrik bir yapıda nepovirüs olan CLRV'nin tek sarmal RNA'dan oluştuğu, vejetatif üretim materyali ve kamalı nematodlar (*Xiphinema* coxi, *X. diversicaidaiitm* ve *X.vuittenezi*) ile taşındığı, çoğu doğal konukçusunda (%0.5-35) ve birçok otsu konukçuda (%100) tohumla taşındığı, bu virüsün ceviz ve huş ağacında polenle taşındığı, CLRV ile bulaşık kirazda yaprak kıvrılması ve bitki ölümü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Cropley (1961) ve Schimanski ve ark. (1975) tarafından CLRV ile bulaşık ağaçlarda çiçeklenmenin üç hafta kadar geciktiği, çiçeklenmedeki bu gecikmenin virüsün teşhisinde önemli rol oynadığı, hastalığın ağaçta başladığı kısımdan geriye doğru sürekli ilerleyerek gövdeye ulaştığı ve ağacın ölümüne neden olabildiği bildirilmiştir.

Nemeth (1986); Ogawa ve ark. (1995) sert çekirdeklilerde ve bademde bugüne kadar değişen önemde birçok virüs hastalığının zarar yaptığı ve değişik etmenlerin farklı isimlerle anılan hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir. Virüsler badem ağaçlarında, büyük çoğunluğu yaprakta ve meyvede renk bozulmalarına, gövdede deformasyonlara, üründe kayıplara ve aşı uyuşmazlıklarına, hatta ileri aşamalarda ağaç ölümlerine neden olmaktadır.

Dunez (1988) yaptığı çalışmalarda, Akdeniz ülkelerinde ceviz ve badem başta olmak üzere sert kabuklu meyve yetiştiriciliğinin gün geçtikçe artmakta olduğunu, ekonomik anlamda ülke gelirine büyük ölçüde katkı sağlayan bu meyve türlerinde kimyasal mücadelesi olmayan virüs hastalıklarının büyük sorunlara yol açtığını vurgulamıştır. Önemli virüs hastalıklarının etmenleri arasında PPV, PNRSV, PDV ve ACLSV'nin sayılabileceğini bildirmiştir.

Digiaro ve ark. (1992) bademde ekonomik zarar yapan virüslerin PDV, PNRSV, PPV, ACLSV ve ApMV olduğunu bildirmiştir.

Brunt ve ark. (1996) PPV erik, şeftali, nektarin, kayısı, badem, kiraz gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarında en önemli virüs hastalıklarından başında gelmektedir. Virüs 70 x 20nm boyutunda ipliksi bir yapıya sahiptir. Yaprak bitleri tarafından non-persistent olarak ve üretim materyalleri ile yayılmakla birlikte tohum ve polenle taşınmaktadır.

Şahtiyancı (1969) PPV hastalığı ülkemizde ilk kez 1961 yılında Edirne ilinde tespit edilmiştir. Kuçman (1973) daha sonra 1973 yılında Ankara'da ortaya çıkmış ve 2 bahçede kayısı ve erik ağaçlarında dikkati çekmiştir. Şahtiyancı (1969); Yürektürk (1984); Elibüyük-Erdiller (1991) ve Azeri (1994) yapılan diğer araştırmalarda hastalığın Ankara, Aydın, Edirne, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, İstanbul, İzmir, İzmit, Manisa, Sakarya, Tekirdağ ve Yalova'da bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur.

Elibüyük (2003) Potyvirüs cinsinin bir üyesi olan ve tek iplikli bir genomdan oluşan şarka virüs hastalığı etmeni PPV'nin sert çekirdekli meyve ağaçlarında erik, şeftali, kayısı ağaçlarında ciddi belirtiler oluşturduğunu bildirmiştir. Ankara'da şeftalilerde ise PPV ilk kez 2002–2003 yıllarında saptanmıştır.

Dunez (2004) sert çekirdekli meyveler arasında badem ve cevizde virüs hastalıklarının sorun oluşturduğunu ve önemli kayıplara neden olduğunu bildirmiştir.

Fonseca ve ark. (2005) tarafından dünya çapında sert çekirdekli meyve ağaçlarının patojeni olan Prune dwarf virüsü (PDV), biyolojik, serolojik ve moleküler özelliklerinde büyük bir değişkenlik gösterdiği, badem bitkisinden elde edilen PDV izolatlarının aynı bölgede farklı sert çekirdekli konukçulardan izole edilen diğer PDV izolatları ile karşılaştırıldığında PDV'nin yüksek derecede genetik varyans gösterdiği bildirilmiştir.

Gilmer ve ark. (1976); Uyemoto ve ark. (1989); Dunez ve Kunze (1988) PDV ile enfekteli olan kiraz ağaçlarında özellikle ilkbaharda ilk çıkan yapraklarda beneklenmeler, klorotik halkalar, sarı lekeler şeklinde belirtiler meydana gelmektedir. Erik ve şeftalide boğum aralarının kısalması, cüceleşmenin meydana gelmesi önemli belirtiler arasındadır. Doğal bir vektörü tespit edilmemekle birlikte Ilarvirüsler gibi tohum ve polenle taşındığı, sert çekirdekli meyve türlerinde çeşitli oranlarda enfeksiyonlar meydana gelmektedir.

Küden ve ark. (1994) son yıllarda ülkemizin Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde Amerikan Texas ve İspanyol badem çeşitleri ile kapama badem bahçeleri tesisi artış gösterdiğini bildirmiştir.

Kaşka ve ark. (1994) tarafından Akdeniz Bölgesi ekolojik koşullarına en iyi uyum sağlayan Texas badem çeşidi Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde de en verimli çeşit olduğu bildirilmiştir.

Boari ve ark. (1997) PDV izolatlarının serolojik karakterizasyonu için sekiz monoklonal antikorun TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich- Enzyme Linked

Immunosorbent Assay) ile incelendiği bir çalışmada PDV izolatları arasında serolojik farklılaşmanın mümkün olduğu, tanımlanan serotiplerden biri olan PDV-B'nin tercihen badem ile ilişkili göründüğü bildirilmiştir.

Kanaan -Atallah ve ark. (2000) Lübnan'da ELISA ile testlenen badem örneklerinin ACLSV(%2.7), ApMV (%1.8), PNRSV (%3.3) ve PDV (%2.5) ile enfekteli olduğu rapor edilmiştir.

Jarrar ve ark. (2001) Filistin'de virüs simptomu sergileyen badem ağaçlarından alınan yaprak örneklerinin oranında PDV ile bulaşık olduğunu (%13.3) bildirilmiştir.

Paduch-Cichal ve ark. (2011) benzer sonuçlar PDV'nin Prunus mahaleb izolatına yönelik olarak 22 farklı izolatların serolojik değişkenliğini araştırmak için monoklonal antikorlar (MAb'ler) ile TAS-ELISA kullanılarak yapılan bir çalışmada da bildirilmiş, Almanya (1), İtalya (7), Polonya (13) ve ABD (1) izolatlarının MAbs reaksiyonun analizi sonucu, PDV'nin yüksek serolojik değişkenlik gösterdiği ve 13 serogrubun tanımlanabildiği bildirilmiştir.

Agrios (2005) bademde saptanmış olan bazı virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri arasında Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple mosaic virus (ApMV), Plum pox virus (PPV), Prune dwarf virus (PDV) Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) Raspberry ring spot virus (RpRSV) Peach rosette mosaic virus (PRMV), Tomato ring spot virus (ToRSV) ile Almond calico disease ve Almond necrotic ring spot disease bulunmaktadır.

Sertkaya ve ark. (2005), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2002 yılında sonbahar dönemi başlangıcında fitoplazma enfeksiyonu yönünden araştırılan badem örneklerinde PCR-RFLP analizi ve TEM (geçirimli elektron mikroskopi: Transmission electron microscopy) tekniği ile incelenmesi sonucu toplanan örneklerin 16SrX-B grubu fitoplazma ile enfekteli olduğunu belirlemiştir.

Öztekin (2006) Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi deneme alanlarında yapılan bir çalışmada yer alan badem ağaçlarında viral enfeksiyonlar araştırılıp ACLSV, ApMV, PNRSV, PPVnin varlığı DAS-ELISA yöntemi ile testlenerek 222 badem ağacında PNRSV (%20.3) ve ACLSV (%3.2) belirlenirken; PDV, ApMV ve PPV enfeksiyonları rastlanmadığı bildirilmiştir.

Sertkaya ve ark., (2009) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2006 yılı yaz sonu-sonbahar döneminde yapılan bir çalışmada fitoplazma enfekteli badem ağaçlarında

genellikle sürgün kabuğu ve yapraklarda kırmızılaşma, ince dalların çalılaşması, yapraklarda içe doğru kıvrılma ve yaprak sayısında azalma gözlendiği bildirilmiştir.

Usta ve ark., (2009), 2006 yılında Van gölü havzasında yetiştirilen cevizlerde CLRV ve PPV enfeksiyonlarının ELISA ve RT-PCR yöntemi ile araştırdıkları bir çalışmada CLRV'nin %12.9 oaranında enfeksiyon oluşturduğunu, testlenen örneklerde PPV'nin belirlenmediğini, CLRV'nin Adilcevaz ve Ahlat izolatlarının *Chenopodium amaranticolor*'da sistemik olarak yapraklarda klorotik leke ve uç nekrozuna neden olduğu bildirmiştir.

Yegül (2017) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesindeki ceviz ve badem ağaçlarında virüs hastalıklarını araştırıldığı bir çalışmada Hatay ilinde ceviz örneklerinin %43.86 oranında CLRV ile bulaşık olduğu bildirilmiş, CLRV'nin NCBI'a kayıtlı izolatlar ile nükleotit düzeyde %89-98 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yegül ve Baloğlu (2020) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bademlerde ekonomik olarak zarar yapan PDV), PNRSV, PPV, ACLSV, ApMV ve CLRV'nin üretim alanlarındaki dağılımının araştırıldığı bir çalışmada, 5 ilden badem örneği toplanarak DAS-ELISA ile analiz edilmiş, toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (%27.9) en az bir virüsle enfekteli bulunmuştur. Bu örneklerden, Adana ilinde %20.1 Mersin'de %30.10 Kahramanmaraş'ta %15.49 Hatay'da %38.20 ve Osmaniye'de %47.06 oranında en az bir virüs ile enfekteli bulunmuştur. Test edilen örneklerde PNRSV %64 PDV %18, ACLSV %11 ve karışık enfeksiyon %7 oranında tespit edilmiş, ApMV, PPV ve CLRV'nin ise belirlenemediği bildirilmiştir.

Akgül ve ark. (2021) tarafından Adıyaman ilinde badem ağaçlarında ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV ve PPV'nin DAS- ELISA yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada Adıyaman ilindeki badem ağaçlarında %30.90 oranında PDV'nin var olduğu belirlenmiş ve ACLSV, ApMV, PNRSV, PPV' nin tespit edilmediği bildirilmiştir.

Karabacak ve İlbağı, (2011) tarafından Trakya Bölgesi'nin 10 ilçesinden toplanan 158 adet badem çiçek örneği ve 260 adet yaprak örneğine uygulanan DAS-ELISA, TAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde PPV, PNRSV ve PDV virüsleri araştırılmış, Bölgedeki badem ağaçlarının %31.15 oranında PNRSV, %4.23 oranında PDV, %1.92 oranında ise PPV saptanmıştır. Ağaçların %1.54'ünün PNRSV+PDV ve PNRSV+PPV ile karışık enfekteli olduğu, toplam bulaşıklık oranının ise % 38.85 olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Hatay ilinde ceviz ve badem yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Altınözü, Antakya, Arsuz, Kırıkhan, Reyhanlı, Samandağ Yayladağı ilçelerindeki (Şekil 3.1) badem ve ceviz üretim alanlarından yaprak, sürgün, yabancı ot örnekleri ile iklim odasında üretilen test bitkileri çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur.



Şekil 3.1. Hatay ilinde bitki materyali toplanan ilçeler.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

Hatay ilinde Altınözü, Antakya, Arsuz, Kırıkhan, Reyhanlı, Samandağ ve Yayladağı ilçelerinde ceviz ve badem üretim alanları gezilerek simptomatolojik olarak

virüs ve benzer simptom oluşturan patojenler yönünden şüphelenilen bitkilerden yaprak, sürgün ve bahçe içindeki yabancı ot örnekleri toplanıp polietilen torbalara alınmış, etiket yazılarak laboratuvara getirilmiştir. Bu örnekler serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler yöntemler (nPCR) kullanılarak testlenmiştir.

3.2.2. İklim Odası (Mekanik İnokulasyon) Çalışmaları

A) Test Bitkisi Üretimi: Tez çalışması kapsamında incelenecek olan virüsler için sağlıklı tütün (*Nicotiana benthamiana, N. glutinosa, N. tabacum*), hıyar (*Cucumis sativus*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), börülce (*Vigna unguiculata*) test bitkileri kullanılmıştır. Test bitkilerine ait tohumlar kontrollü iklim odası (24ºC±2, 16:8 saat gündüz: gece) koşullarında viyollere ekildikten sonra homojen gelişen fideler, torf içeren plastik saksılara şaşırtılarak yetiştirilmiştir (Şekil 3.2).

B) Mekanik (Özsu) İnokulasyon Çalışmaları: Her bir şüpheli bitki örneği için 5'er adet test bitkisi inokule edilmiş ve ayrıca sağlıklı bitkiler kontrol olarak kullanılmıştır. İnokulasyon işleminde şüphelenilen bitkiden alınan yaprak ve sürgün içeren doku parçaları steril havanlarda fosfat tampon çözeltisinde (pH:7.1) oranında ezilerek test bitkisinin karborandum tozu serpilmiş yapraklarına inokule edilmiştir. İnokule edilen bitkiler iklim odasında simptomlar yönünden izlenmiş ve şüpheli bitkiler inokulasyondan 20-30 gün sonra serolojik olarak testlenmiştir. Araştırılan virüsler bakımından pozitif bulunan bitkiler aşılama ve taşıma denemeleri ile laboratuvar çalışmalarında kaynak bitki olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri

Türkçe Adı	**Bilimsel Adı**
Tütün	*Nicotiana glutinosa*
	Nicotiana benthamiana
	Nicotiana tabacum
Fasulye	*Phaseolus vulgaris*
Börülce	*Vigna unguiculata*
Hıyar	*Cucumis sativus*



Şekil 3.2. İklim odasında test bitkilerinde mekanik inokülasyon çalışmaları (A-B).

3.2.3. Laboratuvar Çalışmaları

Arazide yapılan surveyler sonunda şüpheli bulunan ceviz ve badem genç yaprak ve sürgün örnekleri alınmıştır. Toplanan örnekler polietilen torbalarda verilen kodlarla beraber analiz için laboratuvara getirilmiştir. Şüpheli ceviz ve badem örnekleri önemli virüsler (ArMV, CLRV, PDV, PNRSV ve PPV) yönünden DAS-ELISA ile incelenmiştir.

Fitoplazma yönünden şüpheli görülen toplam 23 adet örnek (13 badem ve 10 ceviz) moleküler çalışmalar (nPCR) ile analiz edilmiştir.

3.2.3.1. Serolojik Çalışmalar (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Ceviz ve badem örnekleri ile bahçe içerisinde belirlenen diğer doğal konukçulara ait şüpheli bitki türlerinin genç yaprak ve sürgün örnekleri alınarak arabis mosaic virüs (ArMV), cherry leafroll virüs (CLRV), prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (şarka virüsü-PPV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) enfeksiyonlarının varlığı araştırılmıştır. Serolojik çalışmalarda toplam 243 adet (70 badem, 160 ceviz ve 13 adet yabancı ot) örnek test edilmiştir.

Örneklerin testlenmesi DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay) standart metoduna göre yapılmıştır (Clark ve Adams, 1977). Yaklaşık 1 g taze yaprak örneği tampon çözelti içerisinde homojenize edilerek antiserumu kullanılan firma önerilerine göre laboratuvarda analiz edilmiştir. ELISA testlerinde Nunc-Maxisorb ELISA plate (plaka) ve ilgili firmalardan elde edilen ELISA kitleri kullanılmış ve sonuçlar Sirio-S ELISA okuyucusu kullanılarak değerlendirilmiştir. Renk değişimine göre 1 saat ve 2 saat sonra plakalar optik okuyucuda 405nm dalga boyunda Absorbans (A405nm) değerleri okunmuştur. Testlenen örneklerin 405 nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri incelenerek sağlıklı örneklerin (negatif kontrollerin) 3 katından yüksek absorbans değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981; Thomas ve ark., 1986).

Arazi çalışmalarında yabancı ot türleri ve potansiyel vektör böcekler yönünden de incelemeler yapılmıştır. Araştırma boyunca belirlenen şüpheli yabancı ot türlerinin gösterdiği simptomlar tespit edilmiş ve polietilen torba içerisinde laboratuvara getirilerek biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılan patojenler yönünden testlenmiştir.

3.2.3.2. Moleküler Çalışmalar

Yapılan arazi çalışmaları sırasında badem, ceviz ve yabancı ot türlerinde virüs enfeksiyonlarına benzer belirtiler gösteren örneklerden sarama, yapraklarda renk değişimi ve küçülme gibi fitoplazma benzeri simptomlar sergileyen bitki örnekleri de toplanmıştır. Moleküler çalışmalar kapsamında fitoplazma yönünden şüpheli görülen toplam 21 adet örnek (8 badem ve 13 ceviz) fitoplazma varlığı yönünden nPCR yöntemiyle incelenmek üzere DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.3.2.1. DNA İzolasyonu

Badem ve ceviz ağaçlarından virüs belirtisi görülen yaprak ve sürgünlerde sararma, yaprak küçülmesi, çalılaşma gibi belirtiler fitoplazma enfeksiyonlarına bağlı olarak da gelişebildiği şüpheli örneklerden nPCR analizi için DNA izolasyonu yapılmıştır. Araziden toplanan örneklerin odunsu doku ve yaprak kısımlarından alınan parçalar

ayrılarak floem dokusu yönünden zengin kısımlar sıvı azotta ezildikten sonra steril ependorf tüplere doldurulup analiz edilinceye kadar -80 ºC de saklanmıştır. Sıvı azotta ezilen 0.1 g'lık bitki doku örneklerinden Doyle ve Doyle (1990) yöntemine göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

Bitki örneklerinden Doyle ve Doyle (1990) yöntemine göre DNA izolasyonu:

1. Şüpheli bitkilerin yaprak orta damarları veya çiçek kısımları alınan 0.1 g bitki dokusu sıvı azot yardımıyla ezilmiştir.
2. Havanlar oda sıcaklığında örnek çözününceye kadar bekletilip üzerine 1 ml %2 CTAB solüsyonu ve %2 merkaptoetanol eklenerek ve 2 ml'lik tüplere konulmuştur.
3. Örnekler 60°C'lik sıcak su banyosunda bekletildikten sonra 25°C'de 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Yeni 2 ml'lik tüplere 750 µl phenol: chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1) konmuş üzerine santrifüjden çıkan örnek içerisinden 750 µl üst faz sıvısı eklenmiş ve 25°C'de 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir (bu işlem 2 kez yapılmıştır).
5. Yeni 2 ml'lik tüplere 700 µl phenol: chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1) eklenerek santrifüjden çıkan örnek içerisinden 700 µl üst faz sıvısı eklenmiş ve 25°C'de 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
6. Örnek içerisinden 500 µl üst faz sıvısı yeni 1.5 ml'lik tüplere alınıp üzerine 800 µl soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 4°C'de 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüjden çıkan örneklerden üst faz dökülerek izopropanol uzaklaştırılıp çökelti üzerine 2 kez %70'lik 1 ml soğuk ethanol yıkaması yapılmıştır ve kalan sıvıyı çökeltmek için 4°C'de 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
8. Sıvı faz dökülerek uzaklaştırılmış ve çökelti 37ºC'de 30 dk bekletilerek kurutulmuştur. Daha sonra bu çökeltinin üzerine 80-100 µl TE tampon eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir.

3.2.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Çalışmaları

DNA izolasyonu sonunda elde edilen DNA'lar 1/30 oranında sulandırılarak polimeraz zincir reaksiyonu (direct ve nested PCR: nPCR) ile analiz edilmiştir. PCR işlemi direct-PCR ve nested-PCR (nPCR) olmak üzere iki aşamada yapılmıştır. Direct-PCR'de 1.8 kbp ürün veren üniversal P1/P7 primer çifti (Deng ve Hiruki 1991; Schneider ve ark., 1995) kullanılmıştır. Nested-PCR için ise 1,250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primerleri (Gundersen ve Lee, 1996) kullanılmıştır (Çizelge 3.2; Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4). PCR işleminden sonra elde edilen ürünler agarose jelde görüntülenmiştir.

Çizelge 3.2. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Primer dizilimleri		**Kaynak**
P1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3'	Deng ve Hiruki, 1991
P7	5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	Schneider ve ark., 1995
F2n	5'-CGACTGCTAAGACTGG-3	Gundersen ve Lee, 1996
R2	5'- TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	Gundersenn ve Lee, 1996

Çizelge 3.3. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR girdileri ve miktarı

Direct-PCR Girdileri	**Miktar (1 örnek için)**	**Nested-PCR Girdileri**	**Miktar (1 örnek için)**
Distile su	16,34 µl	Distile su	16,34 µl
10X buffer	2,5 µl	10X buffer	2,5 µl
$MgCl_2$	2 µl	$MgCl_2$	2 µl
dNTP	0,5 µl	dNTP	0,5 µl
P1	1 µl	F2n	1 µl
P7	1 µl	R2	1 µl
Taq	0,16 µl	*Taq*	0,16 µl
Toplam	23,5 µl	Toplam	23,5 µl
Genomik DNA	1,5 µl	Genomik DNA	1,5 µl

Çizelge 3.4. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR döngüleri

Direct-PCR			**Nested-PCR**		
94 ˚C	3 dk		94 ˚C	3 dk	
94 ˚C	1dk		94 ˚C	30 sn	
50 ˚C	2 dk	35 döngü	50 ˚C	30 sn	35 döngü
72 ˚C	3 dk		72 ˚C	1 dk	
72 ˚C	10 dk		72 ˚C	10 dk	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmalarına Ait Bulgular

Hatay ilinde ceviz ve badem yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Altınözü, Antakya-Serinyol, Belen, Kırıkhan, Samandağ ve Yayladağı gibi ilçelerdeki ceviz üretim alanları gezilerek virüs ve benzer belirtiler oluşturabilen fitoplazma hastalıkları yönünden incelemeler yapılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Hatay ilinde ceviz ve badem bahçelerinden genel görünüm:
A) Samandağ'da ceviz fidanlığı, B) Yayladağı'nda genç ceviz bahçesi, C- D) Altınözü badem bahçeleri.

Ceviz ağaçlarında yaygın olarak uç dallarda gelişme geriliği, geriye doğru ölüm, yapraklarda sararma, mozaik lekeler, yukarı doğru kıvrılma- kaşıklaşma ve incelme, dallarda floem ve ksilem dokularında nekroz gibi simptomlar gözlenmiştir (Şekil 4.2).

Badem ağaçlarında çoğunlukla boğum arasında kısalma ve gelişme geriliği, yapraklarda küçülme ve şekil bozukluğu, mozaik lekeler veya morumsu-kırmızılaşma gözlenmiştir. Fidanlık ve yeni dikilmiş genç bahçelerde de gövde, yaprak, sürgün gibi bitkinin farklı kısımları incelenmiş, daha çok gelişme geriliği, yapraklarda küçülme ve şekil bozukluğu, kloroz, sürgünlerde çalılaşma gibi belirtiler gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Badem ve ceviz ağaçlarında gözlenen genel simptomlar: A-B) Badem yapraklarında kızarıklık ve kaşıklaşma, C-D) Ceviz yapraklarında kaşıklaşma, E-F) Ceviz sürgünlerinde geriye doğru kuruma, F-I) Ceviz ana dal ve gövdesinde-aşı bölgesinde nekroz oluşumu.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Adana, Hatay ve Mersin illerinde 2006 yılı yaz sonu-sonbahar döneminde badem ağaçlarında fitoplazma hastalıklarına özgü simptomların incelendiği bir çalışmada badem ağaçlarında genellikle sürgün kabuğu ve yapraklarda kırmızılaşma, ince dalların çalılaşması, yapraklarda içe doğru kıvrılma ve yaprak sayısında azalma gözlendiği bildirilmiştir (Sertkaya ve ark., 2009).

Kırıkhan yöresinde Chandler çeşidi ile kurulmuş bir ceviz bahçesinde genç ağaçlarda ana dallara kadar sürgün kurumaları, yapraklarda küçülme, yukarı doğru kıvrılma-kaşıklama ve ciddi oranda gelişme geriliği gözlenmiştir. Bu ağaçların gövdelerinin aşı noktası bölgesinde ve makasla kesilerek incelenen sürgünlerinin kabuk altı dokularında nekrozlar gözlenmiştir (Şekil 4.2). Üretici tarafından bu çeşitten yeterli sayıda fidan bulunamadığı için fidanların bir kısmının Kahramanmaraş ilinden bir kısmının ise Ege Bölgesi'nden getirtildiği bildirilmiştir. Ülkemizin önemli bir meyve fidanı üretim bölgesi olan Hatay ilinde özellikle ceviz fidanı üretimi olduğu halde sağlıklı sert kabuklu meyve fidanı temininde sorun yaşandığı belirlenmiştir.

Yapılan arazi çalışmaları sırasında badem, ceviz ve yabancı ot türlerinde belirgin simptomlar gösteren örnekler laboratuvara getirilmiş, virüsler yönünden biyolojik ve serolojik yöntemler ile, fitoplazmalar yönünden moleküler olarak incelenmiştir.

Hatay ilinde ceviz ve badem üretim alanlarında survey ve örnekleme çalışmaları sırasında 70 adet badem, 160 adet ceviz ve *Amaranthus retroflexus, Chenopodium album Sinapsis arvensis,* türlerinden toplam 13 adet yabancı ot örneği toplanmıştır. Ayrıca incelenen bahçelerde yoğun olarak *Cynodon dactylon, Capsella bursa-pastoris, Sonchus oleraceus, Xanthium strumarium, Cirsium arvense, Echinochloa crus-galli, Papaver rhoeas* türleri gözlenmiştir. Şüpheli simptom sergileyen 3 adet *Solanum nigrum* ile Samandağ ilçesinden 3 farklı fidanlıktan toplam 10 adet sarama simptomu gösteren ceviz örneği alınmıştır.

Potansiyel zararlı ve vektör böcekler yönünden yapılan incelemelerde özellikle Yayladağı-Aslanyazı yöresindeki genç ceviz bahçelerinde çamuratan (*Agalmatium flavescens*) yaygın olarak gözlenmiştir. Araştırma yapılan bütün ilçelerde küçük yaprak biti (*Chromaphis juglandicola*) araştırma yapılan bütün ceviz alanlarında ve fidanlıklarda belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Samandağ ve Yayladağı'nda gözlenen bazı ceviz zararlıları: A-B) Ceviz küçük yaprakbiti (*Chromaphis juglandicola*), C) Yayladağ- Aslanyazı yöresinde genç ceviz ağacının gövde ve anadallarında çamuratan (*Agalmatium flavescens*), D) Ceviz yaprakuyuzu (*Aceria erinea*), E) Ceviz yaprak gal akarı (*Eriophyes tristriatus*)

4.2. Serolojik Çalışmalara (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Ait Bulgular

Hatay ilinde ceviz ve badem üretim alanlarında survey ve örnekleme çalışmaları sırasında 70 adet badem, 160 adet ceviz ve *Amaranthus retroflexus* (5 adet), *Chenopodium album* (5 adet) ve *Solanum nigrum* (3 adet) olmak üzere toplam 13 adet yabancı ot türlerine ait bitki örneği toplanmıştır. Ayrıca Samandağ ilçesinden 3 farklı fidanlıktan toplam 10 adet şüpheli ceviz örneği alınmıştır. Alınan örneklerden ArMV, CLRV, PDV, PNRSV ve PPV için DAS-ELISA ile testlenmiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2).

Çizelge 4.1. Hatay ili badem üretim alanlarından toplanan örnek sayıları ve DAS- ELISA sonuçları

Örnek Toplanan Yer	**Toplam Örnek Sayısı**	**Testlenen Virüsler**				
		Enfekteli Örnek Sayısı (%)				
		ArMV	**CLRV**	**PDV**	**PNRSV**	**PPV**
Altınözü	10	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (20)	0 (0.0)
Antakya-Serinyol	15	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.6)	1 (6.6)	0 (0.0)
Belen	10	2 (20)	0 (0.0)	2 (20)	2 (20)	0 (0.0)
Samandağ	18	2 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Yayladağı	17	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (11.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Toplam	70	4 (5.7)	0 (0.0)	5 (7.1)	5 (7.1)	0 (0.0)

Badem örneklerinde yapılan serolojik çalışmalar sonucunda Belen ve Samandağ ilçelerinden alınan 2 şer adet badem örneğinde ArMV enfeksiyonu bulunmuştur. Antakya (1 adet), Belen (2 adet) ve Yayladağı (2 adet) ilçelerinde PDV, Altınözü (2 adet), Antakya (1 adet), Belen (2 adet) ve Yayladağı (2 adet) ilçelerinde PNRSV belirlenmiştir. Hatay ili badem üretim alanlarında PDV ve PNRSV %7.1 oranında bulunmuş, PDV ve PNRSV'nin araştırma yapılan ilçelerde genel olarak en yaygın ve oransal olarak daha fazla bulunan virüsler olduğu belirlenmiş, bunları %5.7 oranı ile ArMV enfeksiyonu izlemiştir. PNRSV'nin bulaşık olduğu ağaçlarda kloroz, nekroz, yapraklarda bant şeklinde belirtiler, halkalı leke veya mozaik şeklinde belirtiler oluşturduğu bilinmektedir. Arazi incelemeleri sırasında şüpheli görülen badem ağaçlarında da benzer belirtiler

gözlenmiş, testlenen örneklerin bir kısmı PNRSV ile enfekteli bulunmuştur. Badem örneklerinde CLRV ve PPV ile çoklu-karışık enfeksiyon tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada, 5 ilden badem örneği toplanarak bademlerde ekonomik olarak zarar yapan prune dwarf virus (PDV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), plum pox virus (PPV), apple chlorotic leafspot virus (ACLSV), apple mosaic virus (ApMV) ve cherry leaf roll virus (CLRV) DAS-ELISA ile analiz edilmiş, toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (%27.93) en az bir virüsle enfekteli bulunmuştur. Bu örneklerden, Adana ilinde %20.16, Mersin'de %30.10, Kahramanmaraş'ta %15.49, Hatay'da %38.20 ve Osmaniye'de %47.06 oranında en az bir virüs ile enfekteli bulunmuştur. Testlenen örneklerde PNRSV %64, PDV %18, ACLSV %11 ve karışık enfeksiyon %7 oranında tespit edilmiş, ApMV, PPV ve CLRV ise tespit edilemediği bildirilmiştir (Yegül ve Baloğlu, 2020). Adıyaman ilinde yapılan bir çalışmada DAS-ELISA ile ApMV, ACLSV, PDV, PNRSV ve PPV yönünden araştırılan örneklerde badem ağaçlarının %30.9 oranında PDV ile enfekteli olduğu belirlenmiş, ACLSV, ApMV, PNRSV ve PPV'nin tespit edilmediği bildirilmiştir (Akgül ve ark., 2021).

Ceviz örneklerinde yapılan serolojik çalışmalar sonucunda Belen ve Samandağ ilçelerinden alınan 2'şer adet ceviz örneğinde ArMV, Altınözü, ilçesinde aynı bahçeden alınan 2 adet ceviz örneğinde ise CLRV belirlenmiştir. Altınözü, Antakya-Serinyol, Belen ve Yayladağı örneklerinde PDV, Antakya-Serinyol ve Belen örneklerinde PNRSV bulunmuştur (Çizelge 4.2). Ceviz örneklerinde PPV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Van gölü havzasında yetiştirilen cevizlerde 2006 yılında CLRV ve PPV enfeksiyonlarının ELISA ve RT-PCR yöntemi ile araştırdıkları bir çalışmada CLRV'nin %12.9 oranında enfeksiyon oluşturduğu, benzer şekilde PPV enfeksiyonunun belirlenmediği bildirilmiştir (Usta ve ark., 2009). Hatay ilinde 2012-2016 yılları arasında yapılan bir çalışmada ceviz örneklerinin %43.86 oranında CLRV ile bulaşık olduğu, örnekleme için ilkbahar döneminin uygun olduğu bildirilmiştir (Yegül, 2017).

Bu çalışmada araştırılan alanlardan özellikle Kırıkhan ilçesindeki Chandler çeşidi genç bir ceviz bahçesinde yoğun sürgün kurumaları ve gelişme geriliği gözlenmiş, yapılan örnek alma işleminde iç dokularda nekrozlar görülmüştür. Bu belirtilerin cevizde yaygın olarak belirlenmiş CLRV enfeksiyonlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

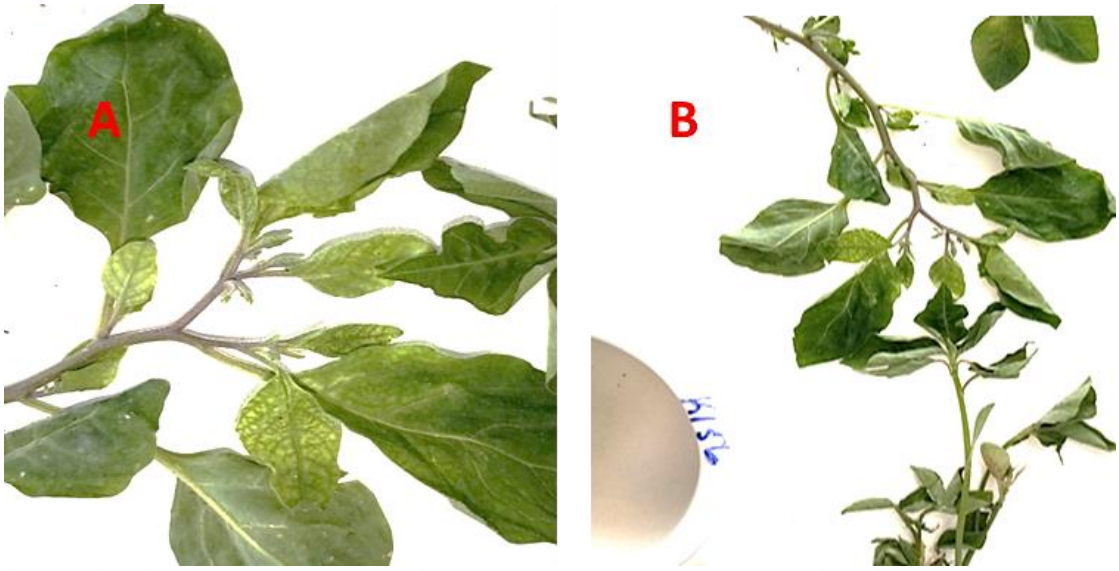
Çizelge 4.2. Hatay ilinde ceviz alanlarından toplanan örnek sayıları ve DAS-ELISA sonuçları

Örnek Toplanan Yer	Toplam Örnek Sayısı	Testlenen Virüsler				
		Enfekteli Örnek Sayısı (%)				
		ArMV	CLRV	PDV	PNRSV	PPV
Altınözü	14	0 (0.0)	2 (14.2)	2 (14.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
Antakya (Serinyol)	17	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.8)	1 (5.8)	0 (0.0)
Belen	12	2 (16.6)	0 (0.0)	2 (16.6)	2 (16.6)	0 (0.0)
Samandağ	21	2 (9.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0) (1/3**)**
Kırıkhan	52	0 (0.0)	12 (23.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Yayladağı	44	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
Toplam	160	4 (2.5)	14 (8.7)	7 (4.3)	3 (1.8)	0 (0.0) (1/3**)**

*Ceviz bahçesinden alınan PPV pozitif *Solanum nigrum* örneği

Hatay ilinde daha önce yapılan bir çalışmada analiz edilen örneklerin yarıya yakının (%43.86) CLRV ile enfekteli olduğunun bildirilmesi (Yegül, 2017) bu çalışmanın bulgular ile uyumlu bulunmuştur. Kirazda da CLRV enfeksiyonunun yaprak kıvrılması ve bitki ölümü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cropley, 1961; Schimanski ve ark., 1975). CLRV enfeksiyonunda yapraklarda bariz simptomlar görülmediği, aşısız türlerin nadiren yaprak simptomları gösterdiği bildirilmiştir (Savino ve ark, 1976; Mircetich ve ark., 1980; Mircetich ve Rowhani, 1986). CLRV'nin neden olduğu walnut ring spot (ceviz halkalı leke) hastalığında ceviz yapraklarında klorotik lekeler, halkalar veya çizgiler gözlendiği (Cooper, 1980), CLRV izolatlarının walnut yellow mosaic (ceviz sarı mozaik) hastalığında ceviz yapraklarında irili ufaklı parlak sarı lekeler meydana getirdiği bildirilmiştir (Savino ve ark, 1976). Cevizde önemli hastalıklara neden olan CLRV izolatlarının birbirlerinden farklılıklar gösterdiği ve bundan dolayı farklı simptomların gözlenebildiği bildirmiştir (Nemeth, 1986).

Samandağ ilçesinde genç bir ceviz bahçesinden alınan 3 adet köpek üzümü (*Solanum nigrum*,) örneğinden şiddetli kloroz, mozaikleşme, yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu ve yukarı doğru kıvrılma -kaşıklama belirtisi gösteren 1 adet *S. nigrum* örneği PPV yönünden pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).



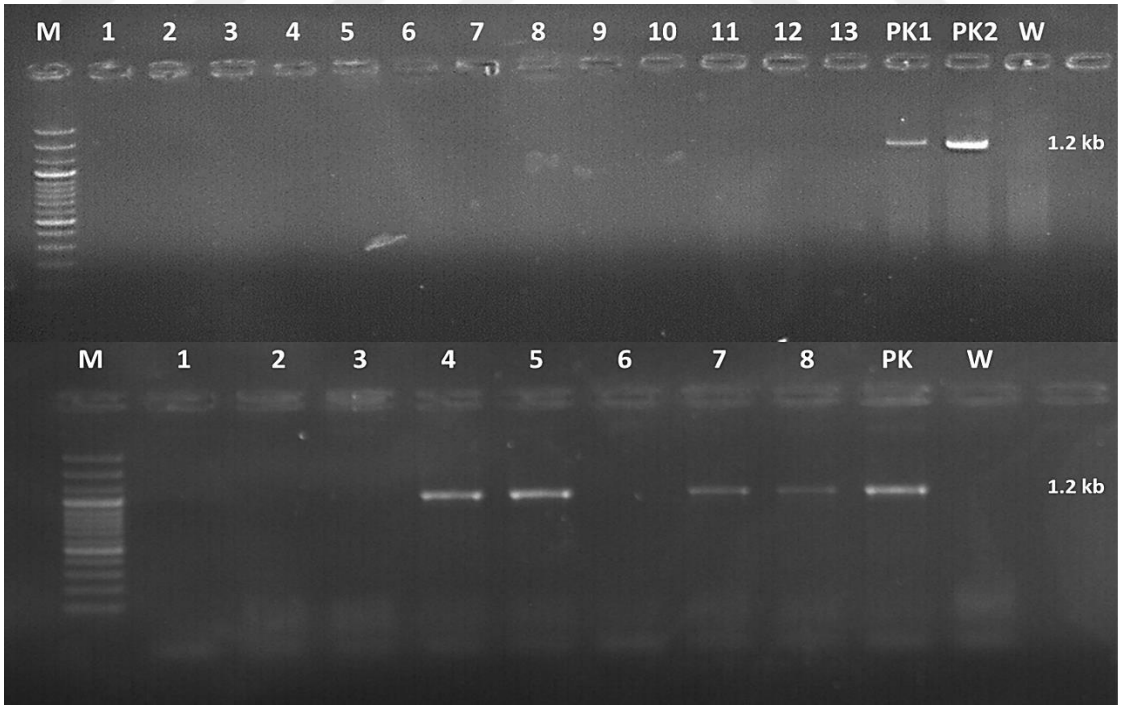
Şekil 4.4. Ceviz bahçesinden alınan ve PPV pozitif bulunan *Solanum nigrum* örneğindeki genel belirtiler: A-B) Şiddetli kloroz, mozaikleşme, yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu ve kaşıklaşma

4.3. Fitoplazma Analizi için Moleküler Çalışmalara (nPCR: nested Polymerase Chain Reaction) Ait Bulgular

Hatay ili badem ve ceviz üretim alanlarında yapılan arazi çalışmaları sırasında belirti gösteren ve fitoplazma enfeksiyonu için şüpheli olduğu düşünülen 8 adet badem ve 13 adet ceviz ağacından toplam 21 adet örnek alınarak DNA izolasyonu yapılmış ve nPCR çalışmaları yürütülmüştür.

Bu çalışmalar sonucunda analiz edilen 8 adet badem örneğinden 4 tanesi nPCR çalışmaları sonucunda pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.5). Bu örneklerde çoğunlukla yapraklarda aşırı kloroz veya morumsu-kızarık şeklinde renk değişimleri ve yaprak sayısında azalma ile ince sürgünlerde çalılaşma gibi belirtiler görülmüştür (Şekil 4.3). Ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2002 yılında sonbahar dönemi başlangıcında incelenen badem örneklerinde benzer belirtiler bildirilmiş, bu örneklerin PCR-RFLP analizi ve TEM (geçirimli elektron mikroskopi: Transmission electron microscopy) tekniği ile incelenmesi sonucu 16SrX-B grubu fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Sertkaya ve ark. 2005). Sertkaya ve ark. (2009) tarafından 2006 yılı yaz sonu-sonbahar başlangıcında aynı bölgeden (Doğu Akdeniz Bölgesi) toplanan şüpheli badem örnekleri PCR-RFLP analizi ve TEM tekniği ile fitoplazma enfeksiyonu yönünden

incelenmiş, TEM (Philips CM 10) ile yapılan çalışmalarda badem yapraklarından hazırlanan ve ince kesit alınan örneklerden genç badem dokularında fitoplazmalara özgü yapılar gözlendiği bildirilmiştir. Moleküler çalışmalarda ise universal primer çifti olarak P1/P7, daha sonra nested-PCR analizlerinde universal primer çifti- R16F2n/R16R2 ve apple proliferation phytoplasma grubuna özgü primer çifti- f01/r01 kullanıldığı, *Mse*I, *BsaA*I ve *Ssp*I enzimleri ile RFLP analizi yapıldığı, Mersin'den alınan ve çeşidi bilinmeyen iki adet simptomlu badem örneğinde fitoplazma belirlenmediği (0/2). Adana'dan 'Teksas' ve 'Nonpareil' çeşitlerinden alınan iki adet örnek (2/3) ile Hatay'dan alınan çeşidi bilinmeyen örneklerden birinin (1/2) fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Moleküler analizlerde enfekteli badem örneklerinde belirlenen fitoplazmanın 16SrX-B altgrubuna ait olduğu, bölgemizin durumunu tam olarak ortaya koymak amacı ile badem ağaçlarının fitoplazma enfeksiyonu yönünden ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada da badem örneklerinde fitoplazma hastalıklarının belirlenmiş olması daha önceki çalışmaların bulguları ile uyumlu bulunmuştur. İncelenen 13 adet şüpheli ceviz örneğinde pozitif sonuç alınamamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bazı ceviz ve badem örneklerinin fitoplazma yönünden PCR sonuçları: A) Ceviz örnekleri (1-13), B) Badem örnekleri (1-8), M: Moleküler markır (HibriGen, 100 bp ladder plus), PK (1 ve 2): Pozitif kontrol, W: Su kontrol

Surveyler sırasında Samandağ ilçesindeki genç bir ceviz bahçesinden alınan 1 adet *Solanum nigrum* örneğinde virüs enfeksiyonu (PPV) belirlenmiş (Şekil 4.4, Çizelge 4.2) ancak, aşırı kloroz, yapraklarda küçülme ve mozaikleşme gibi belirtiler gösteren *S. nigrum* örneklerinde (Şekil 4.4) fitoplazma enfeksiyonu tespit edilememiştir.

Ceviz gibi ikincil bileşikleri (fenolik bileşikleri) oldukça yüksek türlerde ekstraksiyon çözeltilerinde kullanılan tampon çözeltilerin içeriği büyük önem arz etmektedir. Şimşek ve ark (2008), fındık, avakado, Trabzon hurması, mandarin ve portakal türlerinden, MiniPrep DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemin modifiye edilmiş versiyonlarını kullanarak DNA elde ederek 1) yalnızca CTAB, 2) CTAB ve PVP beraber (CTAB+PVP), 3) CTAB ve SDS (CTAB+SDS) beraber ve 4) yalnızca SDS olacak şekilde test etmiş, özellikle fındık ve portakal türlerinde genel olarak tüm yöntemlerden yüksek konsantrasyonda DNA elde edildiğini, ancak; DNA saflığıyla değerlendirilen kalite sonuçlarında, bitki türleri arasındaki farklılıklar ve interaksiyon önemli bulunmadığını bildirmiştir. Spittle ve ark (2010), kontaminantların nükleik asit konsantrasyonunun ölçümünde hatalara neden olduğunu ve PCR'da DNA'ya bağlanarak yanlış sonuçlar doğurduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada badem ve ceviz örneklerinden kullanılan yöntemlere göre yürütülen DNA izolasyonu ve PCR çalışmalarında önemli bir sorun belirlenmemiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hatay ilinde önemli sert kabuklu meyvelerden ceviz ve badem üretimi yapılan alanlarda 2019-2021 yılları arasında yürütülen bu çalışmada virüs ve virüse benzer belirtiler meydana getiren fitoplazma hastalıklarının durumunun araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan biyolojik, serolojik ve moleküler çalışmalar ile badem ve ceviz ağaçlarının yanı sıra bu bahçelerdeki yabancı o türlerinde de önemli virüs ve fitoplazma hastalıklarının varlığı araştırılmıştır.

Hatay ilinde ceviz ve badem bahçeleri ile 3 farklı ceviz fidanlığında yapılan arazi çalışmaları sırasında 70 adet badem, 160 adet ceviz ve 13 adet yabancı ot olmak üzere toplam 243 bitki örneği alınmıştır. Badem ve ceviz alanlarından alınan bu örnekler ile yapılan iklim odası ve laboratuvar çalışmalarında bitki örneklerinde ArMV, CLRV, PDV, PNRSV ve PPV ile fitoplazma enfeksiyonları araştırılmış ve genel olarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Farklı dönemlerde (ilkbahar ve sonbahar) badem ağaçlarında yapılan gözlemlerde yapraklarda sararma, kıvrılma, şekil bozukluğu dallarda ise geriye doğru kuruma gibi belirtiler gözlenmiş, bu simptomlar gösteren yaprak ve dal örnekleri genellikle PDV ve PNRSV yönünden pozitif olarak test edilmiştir.
- Surveyler sonucunda şüpheli badem ağaçlarından alınan örnekler PNRSV ve PDV için 5/70 oranında (%7.1) pozitif sonuç vermiştir. ArMV enfeksiyonu %5.7 olarak belirlenmiştir. Badem örneklerinde CLRV ve PPV belirlenmemiştir.
- PDV ile enfekteli ağaçlarda gelişme geriliği, yapraklarda renk açılması gibi simptomlar gözlenmiştir.
- Sert kabuklu meyvelerden badem ağaçlarında PNRSV gibi virüslerin neden olduğu "saçma deliği" belirtisi ile bir fungal hastalık olan "yaprak delen" belirtileri benzerlik gösterdiği için başlangıçta genellikle birbiri ile karıştırılabilmektedir. Bu gibi bahçelerde virüs ve benzeri hastalıkların düzenli olarak analiz edilmesi doğru patojen ile mücadele edilebilmesi için önemlidir.
- Badem ağaçlarında şiddetli ürün kaybına sebep olduğu bilinen fitoplazma enfeksiyonlarından şüphelenilen badem ağaçlarında moleküler çalışmalar sonucu 4/8 oranında fitoplazma enfeksiyonu belirlenmiş ve bu badem örneklerinde yapraklarda sararma, küçülme ve kırmızımsı-morumsu renk değişikliği ile genç sürgün uçlarında

kuruma ve geriye doğru ölüm gibi belirtiler yaygın olarak gözlenmiştir. Ürün kaybı yönünden çiçeklenme ve meyve hasadı dönemlerinde değerlendirmelerin yürütülmesi gerektiği düşünülmektedir.

- Ceviz ağaçlarında en önemli virüslerden biri olan CLRV'nin yapraklarda belirgin simptom oluşturmamasına rağmen özellikle Kırıkhan yöresinde Chandler çeşidi ile kurulmuş bir bahçede genç ağaçlarda ana dallara kadar sürgün kurumaları, yapraklarda küçülme ve ciddi oranda gelişme geriliği gözlemlenmiştir. Bu ağaçların sürgünleri makasla kesilerek incelendiğinde kabuk altı dokularında nekrozlar gözlenmiştir. Üretici tarafından bu çeşitten yeterli sayıda fidan elde edilemediği için fidanların bir kısmının Kahramanmaraş ilinden bir kısmının ise Ege Bölgesi'nden getirtildiği bildirilmiştir.

- Badem ağaçlarında survey çalışmaları boyunca gözlemlenen fungal hastalıklarından yaprak delen hastalığı dikkate alınarak elde edilen sonuçlar kapsamında PNRSV'den kaynaklanan saçma deliği belirtileri arasında hastalığın belirtilerine göre yaprak sapına daha yakın bölgelerde meydana geldiği gözlenmiştir.

- Hatay ili badem üretim alanlarında ArMV, PDV ve PNRSV belirlenmiştir. PDV ve PNRSV pozitif olarak testlenmiş, bu iki virüsün il genelinde incelenen ilçelerde badem örneklerinde en yaygın ve oransal olarak daha fazla bulunan virüsler olduğu belirlenmiştir. Bu virüsleri ArMV enfeksiyonu izlemiştir. Badem örneklerinde PPV belirlenememiştir.

- Hatay ili ceviz üretim alanlarında PPV dışında araştırılan bütün virüsler (ArMV, CLRV, PDV ve PNRSV) belirlenmiştir. CLRV (%8.7) ve PDV (%4.3) yüksek oranda pozitif olarak testlenmiştir. İncelenen ilçelerde ceviz örneklerinde en yaygın ve en fazla virüs enfeksiyonu CLRV ve PDV olarak belirlenmiş, bunu ArMV (%2.5) ve PNRSV (%1.8) izlemiştir. Ceviz örneklerinde PPV belirlenmemiştir.

- Samandağ ilçesinde 3 meyve fidanlığından toplam 10 adet şüpheli ceviz örneği alınmış, virüs enfekteli örnek belirlenememiştir. Hatay ili ve ülkemiz için önemli bir meyve fidanı üretim yöresi olan Samandağ ilçesindeki fidanlıklardan alınan bitki örneklerinde araştırılan virüs ve fitoplazma etmenlerine rastlanmamıştır.

- Sert çekirdekli meyve ağaçlarında çoğunlukla yapraklarında klorotik bantlar, damar açılması, halka şeklinde klorotik lekeler, meyvede şekil bozukluğu ve çekirdekte halka şeklinde beneklenmeler, gövdede çatlamalar, çiçeklerde renk kırılması gibi

karakteristik belirtiler gösteren ve Hatay ilinde sert çekirdekli meyve türlerinde varlığı bilinen PPV, sert kabuklu meyvelerden ceviz ve badem örneklerinde belirlenmemiştir.

- Genç ceviz ağaçlarında geriye doğru kurumalar gözlenmiş, ana dallardan budama makası ile yapılan örnek alma işleminde iç dokularda nekrozlar görülmüştür. Bu belirtilerin cevizde yaygın olarak belirlenmiş CLRV enfeksiyonlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

- Arazi gözlemleri sırasında tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*), köpek üzümü (*Solanum nigrum*) gibi yabancı ot türleri yaygın olarak gözlenmiştir. Bu türlerden yapraklarda küçülme, kıvrılma, mozaik gibi virüs ve fitoplazma enfeksiyonları yönünden şüpheli *S. nigrum* örnekleri toplanmış serolojik ve moleküler olarak analiz edilmiştir.

- Samandağ ilçesinde genç bir ceviz bahçesinden alınan ve şiddetli kloroz, mozaikleşme, yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu ve kaşıklama belirtisi gösteren 3 adet köpek üzümü (*Solanum nigrum,*) örneğinden 1 adeti PPV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu çalışma ile ceviz alanlarında PPV ile enfekteli *Solanum nigrum* ilk kez belirlenmiştir.

Ülkemizin önemli bir meyve fidanı üretim bölgesi olan Hatay ilinde özellikle ceviz fidanı olmak üzere sağlıklı sert kabuklu meyve fidanı temininde sorun yaşandığı belirlenmiştir. Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliğe uygun bölgelerde sert kabuklu meyve alanlarının artması ile sağlıklı fidan ihtiyacı da artmaktadır. Bu virüslerin yeni alanlara girişinin engellenmesi için sağlıklı fidanlar ile yeni bahçelerin tesis edilmesi, karantina ve eradikasyon uygulamalarının ciddi bir şekilde uygulanması gerekmektedir.

Cevizde CLRV enfeksiyonunun bitkiye bulaştığında sürgün ve dallarda geriye doğru kurumalar, virüsün ilerlemesi ile kalın dallarda ve gövdelerde çürümelere ve hatta ağaç ölümlerine neden olduğu bilinmektedir. Yeni ceviz alanların hızla yayıldığı Hatay ilinde ve ülkemizin diğer önemli ceviz üretim bölgelerinde CLRV enfeksiyonunun düzenli olarak izlenmesi enfekteli ağaçların eradikasyonu önemli görülmektedir.

Hatay ilinde son yıllarda sert kabuklu meyve yetiştiriciliğinin artış eğiliminde olması bu çalışmada araştırılan virüsler ve fitoplazma hastalıkları ile bunların doğal konukçularının ve potansiyel vektörlerinin detaylı olarak araştırılması daha verimli ve kaliteli bir üretim için gereklidir.

Ceviz ve badem alanlarında nematod ile de taşınabilen virüslerin belirlenmesi nedeni ile fidanlıklarda bu vektörlerin durumunun araştırılması bu patojenlerin ve vektörlerinin yeni üretim alanlarına yayılmasının engellenmesinde önemli olacaktır.

Samandağ ve Yayladağı'nda daha yoğun olmak üzere ceviz küçük yaprakbiti (*Chromaphis juglandicola*) özellikle yaprak altında bulunduğu gözlenmiştir. Bazı ceviz bahçelerinde ceviz yaprakuyuzu (*Aceria erinea*) ve ceviz yaprak gal akarı (*Eriophyes tristriatus*) belirtileri gözlenmiştir. Yayladağ- Aslanyazı yöresinde yapılan çalışmalarda genç ceviz ağaçlarının gövde ve anadallarında çamuratan türünün yoğun olduğu gözlenmiş, bu alanlarda bu türlerin genç bahçe ve fidanlıklarda bu türlerin zararının ve yaygınlığının araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Ülkemizde ve Hatay ilinde badem ve ceviz üretim alanlarının artması be bu üretim alanlarında özellikle virüs ve fitoplazma ile fungal hastalıkların durumunun incelenmesi, bitki koruma sorunlarının ve çözüm yollarına yönelik araştırmaların yürütülmesi gerektiği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Agrios, G.N., 2005. **Plant Pathology**. Fifth Edition, Elsevier Academic Pres., London, NewYork. 922 p.

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. **HMKU. Tar. Bil. Derg.** 26(3): 576- 585. DOI: 10.37908/mkutbd.923357

Anonim, 2007. Badem Yetiştiriciliği. http://www.tarimkutuphanesi.com/BADEM_YETISTIRICILIGI_00009.html (Erişim Tarihi: 21.11.2022)

Anonim, 2011. http://www.uyurgezer.net/meyvecilik-kulturu-ve-turkiye- meyve-uretimi-t97324.html (Erişim Tarihi: 21.11.2022)

Anonim, 2017. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veritabanı. Türkiye İstatistik Kurumu, https://biruni.Anonim.gov.tr/medas/?kn=104&l ocale=tr. (Erişim Tarihi: 21.11.2022)

Anonim, 2020. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veritabanı. Türkiye İstatistik Kurumu, https://biruni.Anonim.gov.tr/medas/?kn=104&l ocale=tr. (Erişim Tarihi: 21.11.2022)

Boari, A., Boscia, D., Yurtmen, M., Potere, O., Turturo, C., Savino, V. 1997. Production of monoclonal antibodies to prune dwarf ilarvirus and their use in the serological characterisation of almond virüs isolate. **OEPP/EPPO Bull.** 27: 555-556.

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitzitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. 1996. Viruses of plants. CAB International, 1484 pp.

Civerolo, E.L., Mircetich, S.M., 2002. Disease caused by a virus: In: Tevitdale B.L., Michailides T.J., Pscheidt J.W., (eds.). **Compendium Nut Crop Diseases in Temperate Zones,** pp 82-83. APS pres, St. Paul, MN, USA

Clark, M. F., 1981. Immunosorbent assay in Plant Patholgy. **A. Rev. Phytopath.,** 19: 83-106

Clark, M.F., and Adams, A.N., 1977. Charecteristic of Microplate method of Enzlinked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses, J. Gen. Virol., 34: 475-483.

Cropley R, Tomlinson J.A., 1971. Cherry leaf roll virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 80. Wellesbourne, UK: **Association of Applied Biologists**. 4pp.

Cropley, R,, 1961. Cherry leaf-roll virus. **Ann Appl Biol** 49:524-529.

Deng, S., Hiruki, C., (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. **J. Microbiol. Methods** 14: 53-61.

Digiaro, M., Savino, V., DiTerlizzi, B., 1992. Ilarviruses in apricot and plum polen. **Acta Horticulture,** 309:93-98.

Dunez, J., 1988, Fruit Crop Sanitation in Mediterranean And Near East Region. United Nations Development Programme, FAO.

Dunez, J., 2004. Integrated Pest Management of Mediterranean Fruit Crops. Lecture, Virus And Virus Like Diseases of Stone Fruits, Academic Year 2003-2004.

Elibüyük, İ. Ö., 2003. Natural Spread of Plum Pox Virus in Ankara, Turkey. **J. Phytopathology**151 :617-619.

Elibüyük, İ. Ö., 2004. Current Situation of Sharka Disease in Ankara, Turkey. **Phyoparasitica, 32** :417-420.

Elibüyük, İ. Ö., Erdiller, G., 1991. Ankara İlinde kayısı, erik ve şeftali ağaçlarında görülen şarka hastalığının yayılış alanlarının tespiti ve tanısı üzerinde araştırmalar. 6. **Türkiye Fitopatoloji Kongresi.** 7-11 Ekim 1991, İzmir. s. 411-414

Fonseca, F., Neto, J. D., Martins, V., Nolasco, G., 2005. Genomic variability of Prune dwarf virus as affected by agriculrural practice. **Archives of Virology,** 150(8): 1607-1619.

Gilmer, R. M., Nyland, G. ve Moore, J. D., 1976. Prune dwarf virus in Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America. **USDA, Handbook,** 437.

Gundersen, D. E., ve Lee, I. M., 1996. Ultra sensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathologia Mediterranea,** 144-151.

Jarrar, S, Myrta, A., DiTerlizzi, B., Savino, V., 2001. Viruses of stone fruits in Palestine. Proceedings of the 18th international symposium on virüs and virus-like diseases of temperate fruit crops- top fruit diseases. **Acta Horticulturae** 550: 245-248.

Jones, A.T., 1985. Cherry leaf roll virus. CMI/AAB Descriptions ofplant viruses, No. 306, 9 pp

Kanaan-Atallah, Z.H., Abou-Jawdah, Y., Saad, A., 2000. Virus diseases infecting almond germplasm in Lebanon. **Phytopathol. Mediterr.** 39: 417-422.

Kaşka, N., Küden, A., Küden, AB.,1994. Almond production in Southeast Anatolia. 1.International Congress on Almond. **ISHS Acta Horticuturae** 373.

Kurçman, S., 1973. Nachweisdes Sharka-virus an Aprikosen und Pflaumenbaumen Aumenbaumen in Ankara. Journal of **Turkish Phytopathology** 2, 124–129.

Küden, A., Kaşka, N.,1994. Adaptations of some selected almonds to Meditterranean Region of Turkey. 1 International Congress on almond. **ISHS Acta Horticulturae** 373.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. And Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory ISBN** 0-87969-136-0. pp 545

Mircetich, S.M., DeZoeten, G.A., Lauritis, J.A., 1980. Etiology and natural spread of black line diseases of English walnut trees. **Acta. Phytopathology.** Acad. Sci. Hung. 437: 77-87.

Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees, Akademia Kiado, Budapest, 841.

Ogawa, M.J., Zehr, I.E., Bird, W.G., Ritchie, F.D., Uriu, K., Uyemoto, K.J., 1995. Compendium of stone fruit diseases, **The American Phytopathological Society Press,** 69 p.

Ong, C.A., 1987. Seperation and Characterization of Nucleoprotein Components of Prunus necrotic ringspot virus Isolates. **PhD Thesis**. Washington State University, Pullman.

Özçağıran, R., Ünal, A., Özeker, E., ve İsfendiyaroğlu, M., 2007. Ilıman İklim Meyve Türleri: Sert Kabuklu Meyveler, Cilt III, **EÜ Ziraat Fakültesi Yayınları** No: 566, S: 308.

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, **Bitki Koruma Anabilim Dalı,** 41s.

Paduch-Cichal, E., Sala-Rejczak, K., Mroczkowska, K., Boscia, D., Potere, O., 2011. Serological characterization of Prune dwarf virus isolates. **J. Plant Prot. Res**. 51(4): 389-392.

Schimanski H.H., Schmelzer K., Albrecht H.J., 1975. The late flowering black cherry (Prunus serotina Ehrh.) as natural host of cherry leaf roll virus. **Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz,** 11(5):329-334

Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp 369-380. (Eds Razin S. and Tully J.G.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology**, Vol. 1: 369– 380. Academic Press, San Diego, CA (US). 483 pp. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Sertkaya, G., Martini M., Musetti R., Osler R., 2009. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Badem Ağaçlarında Fitoplazmaların Araştırılması. **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri,** (15-18 Temmuz 2009. Van): 243.

Sertkaya, G., Martini, M., Ermacora, P., Musetti R. and Ruggero, O., 2005 Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. **Phytoparasitica, 33**: 380-390.

Şahtiyancı, Ş., 1969. Virus de la Sharka Ches la Prunier. **Bulletin Phytosanitary FAO**, 17: 69.

Usta, M., Öztürk M.Ö., Tekin Z., Öksüz T., Sipahioglu H.M., 2009. Van Gölü Havzasında Yetiştirilen Cevizlerde Kiraz Yaprak Kıvırcıklık Virüs (CLRV)'ünün Tespiti ve Etmenin Adilcevaz ve Ahlat İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri,** (15-18 Temmuz 2009. Van): 259.

Wang, S., Gergerich R.C., Wickizer S.L., Kim K.S., 2002. Localization of transmissible and non transmissible viruses in the vector nematode *Xiphinema americanum.* **Phytopathology 92**, 646-653.akgül

Yegül, M., Baloğlu, S., 2020. Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu. **Bitki Koruma Bülteni**, 60: 71-84.

EKLER

EK-1 ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)

Tampon Çözelti	İçerik	Miktar
Yıkama tamponu (PBST Buffer) pH: 7.4	PBS Buffer Tween 20	999.50 ml 0.50 ml
Örnek Ezme Tamponu (Extraction buffer) Ph:7.4	PBST Polyvinypyrolidone	1000.0 ml 20.00 g (MV=40000 K=40)
Konjugat Tamponu (Conjugate Buffer) Ph:7.4	PBST Polyvinypyrolidone Ovalbumin NaN3	1000.0 ml 20.00 g 2.00 g 0.20 g
Substrat Tamponu (Substrat Buffer) pH:9.8	NaN3 Karışım d_2H_2O ile	97.00 ml 0.20 g 1000 ml tamamlanmıştır.
Fosfat- Tuz Tamponu (PBS Buffer) ph:7.4	NaCl Na2HPO4 X 12 H2O NaN3 KCI KH2PO4	8.00 g 0.20 g 0.20 g 0.20 g 2.90 g
Kaplama Tamponu (Coating Buffer) Ph:9.6	Na2CO3 NaN3 NaHCO3	1.59 g 0.20 g 2.93 g

EK-2: Agaroz Jel Elektroforez Kullanılan Çalışmalarında Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (Maniatis ve ark., 1982)

TAE 50X (100 ml)	0.5 MEDTA Ph:8	10 ml
	0.6 Glacial acetic acide	5.71 m
	Trizma base	24.2 g

Çözelti 100 ml d2H2O'ya tamamlanıp otoklav edilerek oda sıcaklığında saklanır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)	0.5X TAE	200 ml
	Ethidium bromide	200 µl

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

%1,2 Agarose Jel Elektroforez

3 gr agaroz, 250 ml 0.5X TAE içinde mikrodalga fırında çözdürülür. Yaklaşık 40˚C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenir (20-25 dakika). 0.5X TAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilir.