



T.C.
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MALATYA, ELAZIĞ VE ADIYAMAN İLLERİ BADEM (*Prunus dulcis* Mill.)
VE CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÜRETİM ALANLARINDA *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

TUĞBA ÇEVİK AKOĞUL

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2021

T.C.
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MALATYA, ELAZIĞ VE ADIYAMAN İLLERİ BADEM (*Prunus dulcis* Mill.)
VE CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÜRETİM ALANLARINDA *Peach latent mosaic*
viroid (PLMVd) ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

TUĞBA ÇEVİK AKOĞUL

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tezin başlığı: Malatya, Elazığ ve Adıyaman İlleri Badem (*Prunus dulcis* Mill.) ve Ceviz (*Juglans regia* L.) Üretim Alanlarında *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) Etmelinin Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Tezi Hazırlayan: Tuğba ÇEVİK AKOĞUL

Sınav Tarihi: 24.06.2021

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Bitki Koruma Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum ‘Malatya, Elazığ ve Adıyaman İlleri Badem (*Prunus dulcis* Mill.) ve Ceviz (*Juglans regia* L.) Üretim Alanlarında *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) Etmeninin Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım tüm kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde belirttiğimi onurumla doğrularım.

Tuğba ÇEVİK AKOĞUL

ÖZET

Doktora Tezi

**MALATYA, ELAZIĞ VE ADIYAMAN İLLERİ BADEM (*Prunus dulcis* Mill.)
ve CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÜRETİM ALANLARINDA *Peach latent mosaic
viroid* (PLMVd) ETMENİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Tuğba ÇEVİK AKOĞUL

Malatya Turgut Özal Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

90 + xiv Sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU

Malatya, Elazığ ve Adıyaman illeri badem ve ceviz üretim alanlarında *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)'inin belirlenmesi amacıyla 2019-2020 yıllarında survey çalışmaları yürütülmüştür. Badem ve ceviz üretim alanlarından rastgele toplam 530 yaprak örneği toplanmış ve total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. PLMVd'nin toplanan örneklerdeki varlığını araştırmak için ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi ile testlenen badem örneklerinin hiçbirinde PLMVd enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Testlenen ceviz örnekleri içerisinde Malatya ili Hekimhan ilçesinden alınan örneklerin tamamında (10 örnek, H izolatları) ve Elazığ ili Keban ilçesinden alınan örneklerden sadece birinde (25 örnek, K1 izolatı) PLMVd'nin varlığı tespit edilmiştir. PLMVd-K1 izolatı ve rastgele seçilen H1, H2 ve H3 izolatlarının tüm genomları, bir TA klonlama vektörü olan pGEM-T Easy vektöre aktararak klonlanmıştır. Safılaştırılan rekombinant plazmidler, universal SP6 ve T7 primerleri ile çift yönlü olarak dizilenmiş ve elde edilen PLMVd dizileri CLC Mainworkbench programında üst üste çakıştırılmış (contig) ve referans dizi baz alınarak manuel olarak düzeltilmiştir. Elde edilen konsensus dizilerine göre; PLMVd-K1 (MW294170), -H1 (MW294171), -H2 (MW294172) ve -H3 (MW294173) izolatlarının 338 bp uzunluğunda oldukları tespit edilmiştir. RNA katlanma analizlerinde, tespit edilen dört PLMVd-ceviz izolatının da referans PLMVd izolatının (M83545) oluşturduğu gibi dallanmış küre şeklinde ikincil yapı oluşturdukları görülmüştür. Cevizlerde tespit edilen PLMVd izolatlarının dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde tespit edilen 20 farklı PLMVd izolatının nükleotid dizileri ile %96.7-99.1 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Malatya-Hekimhan ve

Elazığ illeri ceviz üretim alanlarında PLMVd infeksiyonlarının varlığı ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Adıyaman, badem, ceviz, Elazığ, Malatya, moleküler karakterizasyon, PLMVd, RT-PCR



ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) IN ALMOND (*Prunus dulcis* Mill.) AND WALNUT (*Juglans regia* L.) GROWING AREAS IN MALATYA, ELAZIG AND ADIYAMAN PROVINCES (TURKEY)

Tuğba ÇEVİK AKOĞUL

Malatya Turgut Özal University

Institute of Graduate Studies

Department of Plant Protection

90 + xiv pages

2021

Supervisor: Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU

Survey studies were conducted to investigate the presence of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) infections in almond and walnut production areas of Malatya, Elazig and Adiyaman provinces between 2019-2020. A total of 530 leaf samples were randomly collected in almond and walnut orchards and total RNA were extracted. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method was implemented to investigate the presence of PLMVd infections in collected samples. PLMVd was not detected in any of the almond samples tested by RT-PCR method. Among the walnut samples tested, the presence of PLMVd was identified in all of the samples taken from the Hekimhan district of Malatya province (10 samples, H isolates) and in only one sample taken from Keban district of Elazığ province (25 samples, K1 isolate). The purified recombinant plasmids were bidirectionally sequenced with universal SP6 and T7 primers, and the obtained PLMVd sequences were overlaped with the help of CLC Mainworkbench program and editid manually. According to the consensus sequences, PLMVd-K1 (MW294170), -H1 (MW294171), -H2 (MW294172) and -H3 (MW294173) isolates were found to be 338 bp in length. In RNA folding analyses, it was observed that all four detected PLMVd-walnut isolates formed a branched secondary structure, as did the reference PLMVd isolate (M83545). It was determined that PLMVd isolates detected in walnuts showed similarity between 96.7-99.1% with the nucleotide sequences of 20 different PLMVd isolates detected in different geographical regions of the world. With this study, the

PLMVd was identified for the first time in the walnut production areas of Malatya-Hekimhan and Elazig provinces.

KEYWORDS: Adiyaman, almond, walnut, Elazig, Malatya, molecular characterization, PLMVd, RT-PCR



TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince űstűn bilgi ve tecrűbelerinden faydalandıđım, benden yardımlarını esirgemeyen ve çalıőmamın her aőamasında sađladıđı bilimsel katkılardan dolayı kıymetli danıőman hocam sayın Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOđLU'na saygı ve teőekkűrlerimi sunarım. Tűm eđitim hayatım boyunca, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme teőekkűrű bir borç bilirim. Tezimi 191412 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Malatya Turgut Őzal Ŭniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teőekkűr ederim.

Tuğba ÇEVİK AKOğUL

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Cevizin Anavatanı ve Sistematikteki Yeri	1
1.2. Dünyada ve Türkiye’de Ceviz Verileri	2
1.3. Bademin Anavatanı ve Sistematikteki Yeri	5
1.4. Dünyada ve Türkiye’de Badem Verileri	6
1.5. Ceviz ve Bademde Üretimi Sınırlayan Faktörler	10
1.5.1. Viroidler.....	10
1.5.1.1. <i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd)	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
2.1. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	18
2.2. Dünyada Yapılan Çalışmalar	19
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Survey çalışmaları.....	29
3.1.2. Bitkisel materyal	29
3.1.3. Laboratuvar materyali.....	29
3.1.4. RNA ekstraksiyonu.....	29
3.1.5. Tamamlayıcı (komplementer) DNA (cDNA) sentezi.....	29
3.1.6. RT-PCR çalışmaları.....	29
3.1.7. PLMVd’ye spesifik primerler	30
3.1.8. Elektroforez çalışmaları.....	30
3.1.9. PCR ürünü DNA’nın görüntülenmesi.....	30
3.1.10. Moleküler klonlama.....	30
3.1.11. Moleküler karakterizasyon	31
3.2. Metot	31
3.2.1. Survey çalışmaları.....	31
3.2.2. Moleküler çalışmalar	36
3.2.2.1. RNA ekstraksiyonu	36
3.2.2.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi	37
3.2.2.3. RT-PCR çalışmaları	37
3.2.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi, DNA’yı boyama ve görüntüleme.....	38
3.2.2.5. Viroid izolatlarının moleküler karakterizasyonu.....	39
3.2.2.5.1. Moleküler klonlama	39
3.2.2.5.1.1. Katı LB ve sıvı LB ortamların hazırlanması	39
3.2.2.5.1.2. Bakterinin çoğaltılması	40
3.2.2.5.1.3. Bakterilerin purifikasyonu.....	41
3.2.2.5.1.4. Plazmide aktarılacak (insert) DNA’nın hazırlanması	42
3.2.2.5.1.5. DNA’nın agaroz jelden saflaştırılması.....	43
3.2.2.5.1.6. DNA’nın plazmide yerleştirilmesi (ligasyon).....	45

3.2.2.5.1.7. Plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon)	45
3.2.2.5.1.8. Plazmid aktarılmış bakterilerden kültür oluşturma	47
3.2.2.5.1.9. Plazmidin DNA fragmenti taşıyıp taşımadığının koloni PCR ile kontrol edilmesi	48
3.2.2.5.1.10. Rekombinant plazmidlerin saflaştırılması.....	50
3.2.2.5.2. Moleküler klonlama sonrası purifiye edilen DNA'ların dizi analizi ve filogenetik analiz	51
3.2.2.5.3. DNA dizilerinin gen bankasına girilmesi [National Center for Biotechnology Information (NCBI)].....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	52
4.1. Survey Çalışmaları	52
4.2. Moleküler Çalışmalar	53
4.2.1. Malatya ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	53
4.2.2. Elazığ ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	54
4.2.3. Adıyaman ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	55
4.2.4. Malatya ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	56
4.2.5. Elazığ ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	56
4.2.6. Adıyaman ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular.....	57
4.3. Tespit Edilen Viroid İzolatlarının Tüm Genom Dizilerinin Moleküler Karakterizasyonu.....	58
4.3.1. Dizilerin referans izolat yardımı ile edit edilmesi	58
4.3.2. Referans dizi kullanılarak manuel nükleotid düzeltilmesi.....	59
4.3.2.1. K1 izolatının moleküler karakterizasyonu	61
4.3.2.2. H1 izolatının moleküler karakterizasyonu	61
4.3.2.3. H2 izolatının moleküler karakterizasyonu	62
4.3.2.4. H3 izolatının moleküler karakterizasyonu	62
4.3.3. Filogenetik ağaç.....	63
4.3.4. Çoklu nükleotid dizi karşılaştırması	67
4.3.5. PLMVd'ye ait izolatların ikincil yapıları.....	73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
6. KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Dünya ceviz üretimi	2
Şekil 1.2. 2010-2018 yılları arasında ilk 10'da yer alan ülkelerde ceviz üretimi.....	3
Şekil 1.3. Dünyada 2010-2018 yılları arasında ceviz üretim/verim verileri	3
Şekil 1.4. Dünya badem üretimi.....	6
Şekil 1.5. 2010-2018 yılları arasında ilk 10'da yer alan ülkelerde kabuklu badem üretimi.....	7
Şekil 1.6. Dünyada 2010-2018 yılları arasında kabuklu badem üretimi verileri	8
Şekil 1.7. Genomik büyüklüğün azalan ölçek şeması	11
Şekil 1.8. Viroidlerin moleküler yapısı	12
Şekil 1.9. Viroidlerin sınıflandırılması.....	13
Şekil 1.10. PLMVd + (sol) ve - (sağ) çekiçbaşı ribozimlerinin şematik görünümü.....	16
Şekil 1.11. PLMVd'nin ikincil yapısının genel görünümü	17
Şekil 3.1. Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinde badem survey çalışmalarının yapıldığı ilçeler	31
Şekil 3.2. Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinde ceviz survey çalışmalarının yapıldığı ilçeler	32
Şekil 3.3. Survey gerçekleştirilen badem bahçeleri ve örnekleme yapılan badem ağaçlarından bazı görüntüler	33
Şekil 3.4. Survey gerçekleştirilen ceviz bahçeleri ve örnekleme yapılan ceviz ağaçlarından bazı görüntüler	33
Şekil 3.5. Katı LB ortamının petrilere dökülmesi (a) ve katılaşmaya bırakılması (b).....	40
Şekil 3.6. İnkübatör (a) ve bakterinin çoğalması için sallayıcı platforma (b) konulan falcon tüpleri.....	41
Şekil 3.7. Santrifüj (a) ve bakteri pelletleri (b)	42
Şekil 3.8. Elektroforeze yüklenen PCR ürünlerinin görüntüsü (M: Marker (100-10000 bp), 1-5: K1 izolatının PCR ürünü, 6-10: H1 izolatının PCR ürünü, 11-15: H2 izolatının PCR ürünü, 16-20: H3 izolatının PCR ürünü.....	42
Şekil 3.9. UV altında jel görüntüleme (a) ve DNA'nın kesilmesi (b).....	43
Şekil 3.10. Plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon) (a) rekombinant plazmid, spesifik küvetler ve SOC solüsyonlarının buzda tutulması, (b) mikropulser cihazı, (c) rekombinant plazmid ve bakterilerin olduğu karışımın spesifik küvete aktarılması, (d) şok verme işlemi, (e) SOC solüsyonunun spesifik küvete aktarılması pipetlenmesi, (f) karışımın falcon tüpe aktarılması	46
Şekil 3.11. Transformasyon sonrası gelişen mavi-beyaz koloniler (a) ve beyaz kolonilerin işaretlenerek seçilmesi (b).....	48
Şekil 3.12. Koloni PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünü, M: Marker (100-10000 bp), 1-2: K1 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 3-4: H1 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 5-6: H2 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 7-8: H3 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü.....	49
Şekil 4.1. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Malatya (Darendede) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel	

görüntüsü, (M:Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol.....	54
Şekil 4.2. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Elazığ (Merkez) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, (M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol.....	55
Şekil 4.3. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Adıyaman (Kahta) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, (M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol.....	55
Şekil 4.4. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Malatya (Hekimhan) ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, (M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol.....	56
Şekil 4.5. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Elazığ (Keban) ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol	57
Şekil 4.6. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Adıyaman ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), 1: Adıyaman merkez 1-10 arası örnek, 2-3-4-5: Gölbaşı 1-40 arası örnek, 6-7: Kahta 1-20 arası örnek, 8-9: Besni 1-20 arası örnek,10: Tut 1-10 arası örnek.....	58
Şekil 4.7. Blast programında düzenlenmiş ve düzenlenmemiş PLMVd izolatlarının nükleotid dizilerinin grafiksel görünümü.....	59
Şekil 4.8. Referans dizi referans alınarak consensus oluşturma	60
Şekil 4.9. PLMVd izolatlarının (K1, H1, H2, H3) dünyada tespit edilmiş diğer PLMVd izolatları ile CLC Main Workbench 20.0.4 programı aracılığıyla 1000 tekerrürlü olarak oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	64
Şekil 4.10. PLMVd (K1, H1, H2, H3 izolatları) tüm genomunun CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile yapılmış çoklu nükleotid dizi karşılaştırması.....	68
Şekil 4.11. PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) ve PLMVd referans izolatın (M83545) CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile oluşturulan ikincil yapılarının görüntüsü.....	74
Şekil 4.12. PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) P1 ve P2 gövde yapısında (hairpin) bulunan ve etkileşimli olmayan korunmuş 4-bp nükleotidleri.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Ceviz bitkisinin sınıflandırılması	2
Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de ceviz üretimi	4
Çizelge 1.3. Survey çalışması yapılan il ve ilçelerdeki ceviz üretimi ve alanı	5
Çizelge 1.4. Badem bitkisinin sınıflandırılması	6
Çizelge 1.5. Yıllara göre Türkiye’de badem üretimi	8
Çizelge 1.6. Survey çalışması yapılan il ve ilçelerdeki badem üretimi ve alanı	9
Çizelge 3.1. PLMVd’nin RT-PCR yöntemleri ile teşhisinde kullanılan primerler	30
Çizelge 3.2. Malatya, Elazığ ve Adıyaman ili ve ilçelerinden alınan örnek sayısı	35
Çizelge 3.3. PLMVd’nin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmasında uygulanan sıcaklık aralıkları, süre ve döngü sayıları	38
Çizelge 4.1. K1 izolatının tüm genom dizisi	61
Çizelge 4.2. H1 izolatının tüm genom dizisi	61
Çizelge 4.3. H2 izolatının tüm genom dizisi	62
Çizelge 4.4. H3 izolatının tüm genom dizisi	62
Çizelge 4.5. Nükleotid karşılaştırmasında kullanılan Gen Bankasında (NCBI) kayıtlı PLMVd izolatlarına ait orijin, konukçu, nükleotid uzunluğu, erişim numarası ve referans bilgileri	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
Da	: Dalton
dk	: Dakika
Gr	: Gram
g	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
Kg	: Kilogram
kb	: Kilobyte
M	: Molar
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MW	: Molekül Ağırlığı
Nm	: Nanometre
pmol	: Pikomol
U	: Ünite
V	: Volt
yy	: Yüzyıl

Kısaltmalar

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACLSV	: Apple chlorotic leaf spot virus
Amp	: Ampisilin
ApLV	: Apricot latent virus
ApMV	: Apple mosaic virus
ASSVd	: Apple skar scin viroid
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CChMVd	: Chrysanthemum chlorotic mottle viroid
CCR	: Merkezi korunmuş bölge
CGRMV	: Cherry green ring mottle virüs
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik asit
CVA	: Cherry virüs A
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat

DIG	: Digoksinin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinüklotidtrifosfat
DTT	: Ditiyotreitöl
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent testi
EtOH	: Etanol
FAO	: Dünya Tarım Örgütü
G	: Guanin
HCL	: Hidroklorik Asit
H1	: Hekimhan PLMVd izolatu 1
H2	: Hekimhan PLMVd izolatu 2
H3	: Hekimhan PLMVd izolatu 3
HSVd	: Hop stunt viroid
IPTG	: İzopropil β -d-1-tiyogalaktopiranosid
K1	: Keban PLMVd izolatu 1
NaCL	: Sodyum Klorür
Nt	: Nükleotid
PBCVd	: Pear blister canker viroid
PBNSPaV	: Plum bark necrosis stem pitting- associated virus
PC	: Peach kaliko
PDV	: Prune dwarf virus
PLMVd	: Peach latent mosaic viroid
PNRSV	: Prunus necrotic ringspot virus
PPV	: Plum pox virus
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal DNA
RdRP	: RNA-dependent RNA polymerase
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonükleaz enzim
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Ters transkriptaz
RT-PCR	: Ters transkriptaz-Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR-ELISA	: Ters transkriptaz-Polimeraz zincir reaksiyonu ile birleştirilmiş enzime bağlı immünosorbent testi
RT-RPA	: Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu
SHAPE	: Primer uzantısı ile analiz edilen RNA seçici 2'-hidroksil asilasyon
ssRNA	: Tek iplikli (single stranded) ribonükleik asit
T	: Timin
TAE	: Tris Asetat EDTA

Taq DNA : Termo stabil DNA polimeraz enzimi
TNA : Total Nükleik Asit
ToRSV : Tomato ringspot virus
TUİK : Türkiye İstatistik Kurumu
U : Urasil
UV : Ultraviyole



1. GİRİŞ

Türkiye, oldukça zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Bulunduğu coğrafyadan kaynaklı pek çok meyve türünün yetiştiriciliğinin yapıldığı ve birçoğunun anavatanı konumunda olan bir ülkedir (Gülsoy vd., 2016).

Ülkemizde bağ, turunçgiller, sert ve yumuşak çekirdekli meyveler yanısıra sert kabuklu meyveler de oldukça önemli bir yere sahiptir. Fındık, badem, antep fıstığı, ceviz ve kestane sert kabuklu meyveler grubuna dahildir. Bu gruptan badem ve ceviz üretimi hem ülke ekonomisi bakımından hem de insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ülkemizde özellikle son yıllarda mevcut üretim alanlarına ek olarak her yıl devlet teşvik ve destekleri ile özellikle orman vasfını kaybetmiş alanlarda proje kapsamında yeni ceviz ve badem bahçeleri tesis edilmektedir. Bu kapsamda çalışma alanımızı oluşturan Malatya, Elazığ ve Adıyaman'da da ceviz ve badem üretim alanları gün geçtikçe artmaktadır.

Son yıllarda dünyada ve Türkiye'de sağlıklı beslenme konusunda artan talep, hızlı çalışma ve zaman eksikliği nedeniyle besin değeri yüksek olan gıdalara olan talep artmakta ve tüketim alışkanlıklarındaki değişimlerden (örneğin kahvaltılık müsli vb ürünler, enerji veren çikolata ve barlar gibi) kaynaklı sert kabuklu meyvelere ve dolayısı ile ceviz ve bademe olan yönelim artmaktadır (Pezikoğlu vd., 2014).

1.1. Cevizin Anavatanı ve Sistematikteki Yeri

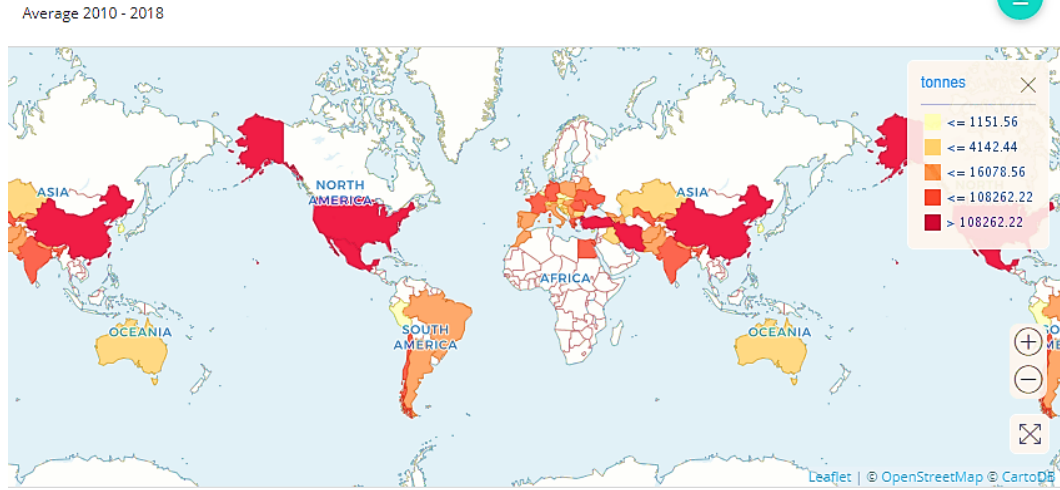
Cevizin kökeni, Hazar Denizi kıyısında bulunan Ghillan (İran'ın kuzeyi) bölgesindedir. Karpat Dağları'ndan İran, Irak, Afganistan, Türkiye, Mançurya, Güney Rusya, Hindistan ve Kore'ye kadar oldukça geniş bir bölgenin doğal bitkisi olup, buralardan Avrupa, ABD ve diğer ülkelere yayılmıştır (Kaplunan, 2015). Oldukça geniş ve farklı kullanım alanına sahip bir bitki olan cevizin yaprağı, meyvesi ve kerestesi sanayinin değişik alanlarında kullanılmaktadır (Tekintaş, 1991). Yeşil meyveler kabuk sertleşmeden önce gıda ve ilaç sanayinde; yaprakları, kabukları ve kökleri tanen ve boya sanayinde; ceviz yağı hem teknolojide hem de resim sanatında kullanılmaktadır. Ayrıca ceviz ağacı mobilyacılıkta da önemli bir hammadde kaynağıdır (Oliveira vd., 2008). Ceviz sistematik sınıflandırmadaki sıralamada *Juglans regia* L. bilimsel ismi ile ifade edilmektedir (Şen, 1986) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Ceviz bitkisinin sınıflandırılması

Cevizin taksonomisi	
Âlem	Plantae (Bitkiler)
Şube	Magnoliophyta (Kapalıtohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Juglandales
Familya	Juglandaceae (Cevizgiller)
Cins	<i>Juglans</i>
Tür	<i>Juglans regia</i> L.

1.2. Dünyada ve Türkiye’de Ceviz Verileri

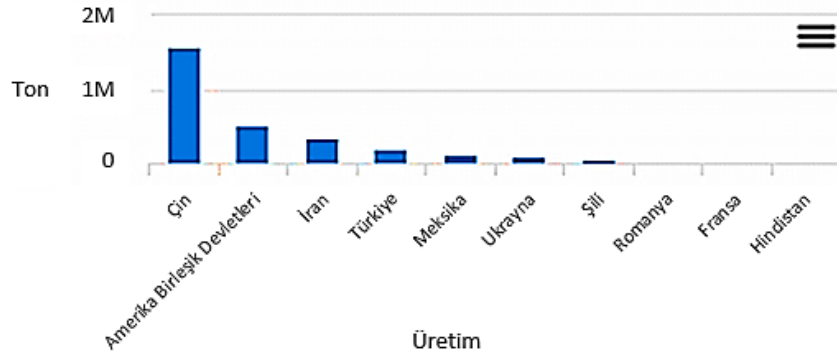
Dünya Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünyada 1 159 484 ha alandan 3 662 507 ton ceviz üretimi yapılmaktadır. 2000-2018 yılları arasındaki dünya ceviz üretim verilerine baktığımızda kıta olarak Asya ve Kuzey Amerika ilk sıralarda yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya ceviz üretimi (FAO, 2020a)

Dünyada 2010-2018 yılları arasındaki ceviz üretiminde ilk 10 ülke içerisinde Çin ilk sırayı alırken; bunu sırasıyla ABD, İran ve Türkiye takip etmektedir. Ceviz üretiminde Çin ile diğer ülkeler arasında oldukça önemli bir fark bulunmaktadır. Çin’de ceviz üretimi 1 925 403 ton iken, Amerika’da 571 526 ton, İran’da 349 192,

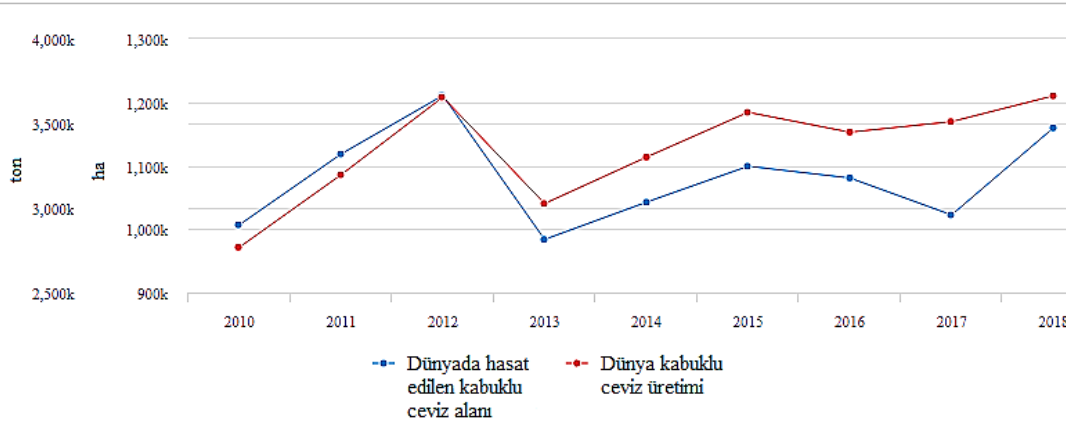
Türkiye’de 210 000 ton, Meksika’da 147 198, Ukrayna’da 108 660, Şili’de 81 163 ton ceviz üretimi yapılmıştır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. 2010-2018 yılları arasında ilk 10’da yer alan ülkelerde ceviz üretimi (FAO, 2020b)

Şekil 1.3’de görüldüğü gibi dünyadaki ceviz üretim alanı ile üretim miktarı yıllara göre değişmekle birlikte genel olarak paralel seyretmiştir. Dünyadaki en yüksek ceviz üretiminin 2012 ve 2018 yıllarında gerçekleştiği görülürken, en düşük ceviz üretimi ise 2010 ve 2013 yıllarında gerçekleşmiştir (FAO, 2020c).

Dünyada kabuklu ceviz üretim/verim miktarları + (Toplam)
2010-2018



Şekil 1.3. Dünyada 2010-2018 yılları arasında ceviz üretim/verim verileri (FAO, 2020c)

Ceviz, iklim koşullarının uygunluğu nedeniyle ülkemizin tüm tarım bölgelerinde yetiştirilmektedir. Özellikle son 25 yılda bölgeler ve iller bazında

üretimde artış görülmektedir (Bayazit vd., 2016). Türkiye’deki ceviz üretim alanı 1 245 527 da olup üretim miktarı 225 000 tondur (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de ceviz üretimi (TÜİK, 2020a)

Yıllar	Meyve veren yaşta ağaç sayısı (adet)	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı (adet)	Toplu meyveliklerin alanı (dekar)	Verim (kg/meyve veren ağaç)	Üretim (ton)
2010	5 441 051	3 643 380	413 932	33	178 142
2011	5 594 576	4 045 119	468 378	33	183 240
2012	5 977 397	4 541 958	552 019	34	203 212
2013	6 526 028	4 877 669	639 015	33	212 140
2014	7 000 897	5 374 456	693 947	26	180 807
2015	7 596 020	5 560 227	718 196	25	190 000
2016	8 171 185	6 873 271	868 528	24	195 000
2017	8 766 811	7 894 728	920 128	24	210 000
2018	9 875 068	8 896 575	1 117 749	22	215 000
2019	11 250 526	10 004 317	1 245 527	20	225 000

Survey çalışmalarını oluşturan illerdeki ceviz üretimi son yıllara kadar geleneksel yöntemlerle ve kenar bitkisi olarak yetiştirilmekte olup, tek ağaç şeklinde ev bahçelerinde de yetiştirilmektedir. Ancak son yıllarda Tarım ve Orman Bakanlığı’nın teşvikleriyle kapama bahçeler kurulmaya başlanmış ve her geçen gün kapama bahçelerin sayısı artmaktadır. Survey çalışmalarının yürütüldüğü il ve ilçelerdeki ceviz üretim miktarları ve üretim alanları Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Survey çalışması yapılan il ve ilçelerdeki ceviz üretimi ve alanı (TÜİK, 2020b)

İller	İlçeler	Üretim (ton)	Alan (dekar)
Malatya	Akçadağ	169	1 765
	Battalgazi	193	810
	Darende	333	1 679
	Doğanşehir	344	3 350
	Hekimhan	1 511	3 650
	Pütürge	293	955
	Yeşilyurt	233	1 537
	Toplam	3 853	17 173
Elazığ	Merkez	629	6 350
	Ağın	12	192
	Baskil	290	1 850
	Keban	438	1 300
	Toplam	2 187	12 305
Adıyaman	Merkez	230	1 050
	Besni	407	3 600
	Gölbaşı	1 806	11 660
	Kahta	363	2 800
	Tut	91	1 825
	Toplam	3 199	22 160

1.3. Bademin Anavatanı ve Sistematikteki Yeri

Bademin anavatanı Orta ve Batı Asya'dır. Buradan Çin, Hindistan, İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine yayılmıştır (Küden vd., 2014). Türkiye'de ise Doğu Karadeniz'in kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylalar haricinde hemen hemen her bölgede yetiştirilmektedir. Ülkemizdeki badem yetiştiriciliği Ege (Manisa, Muğla), Akdeniz (Antalya, Mersin) ve Güneydoğu Anadolu (Adıyaman, Şanlıurfa, Gaziantep) Bölgesinde yoğunlaşmıştır (Eldoğan, 2020). Ancak son yıllarda Malatya, Elazığ ve

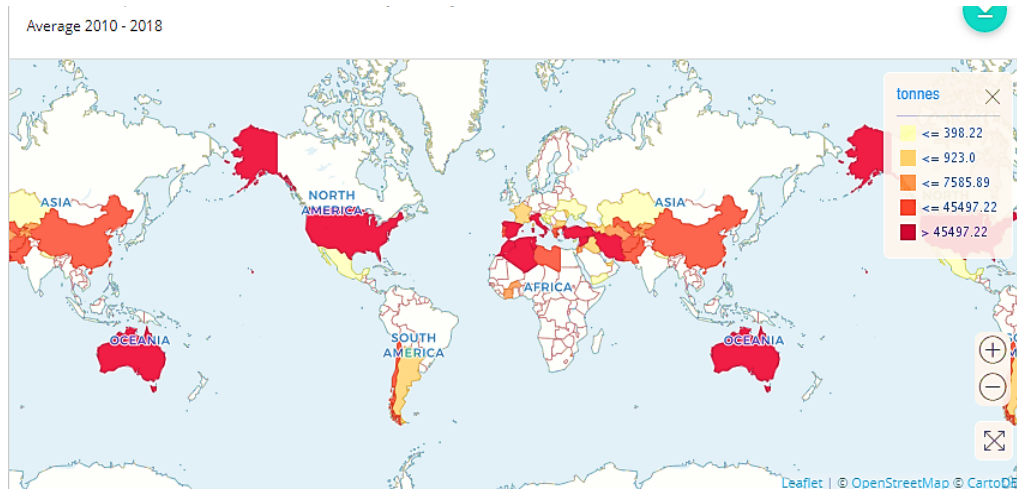
Adıyaman’da badem üretimi oldukça yaygınlaşmaya başlamıştır. Badem, sistematik sınıflandırmadaki sıralamada *Prunus dulcis* (Mill.) bilimsel ismi ile ifade edilmektedir (Barreca, 2020) (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Badem bitkisinin sınıflandırılması

Bademin taksonomisi	
Âlem	Plantae (Bitkiler)
Şube	Magnoliophyta (Kapalıtohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Rosales
Familiya	Rosaceae (Gülgiller)
Cins	<i>Prunus</i>
Tür	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.)

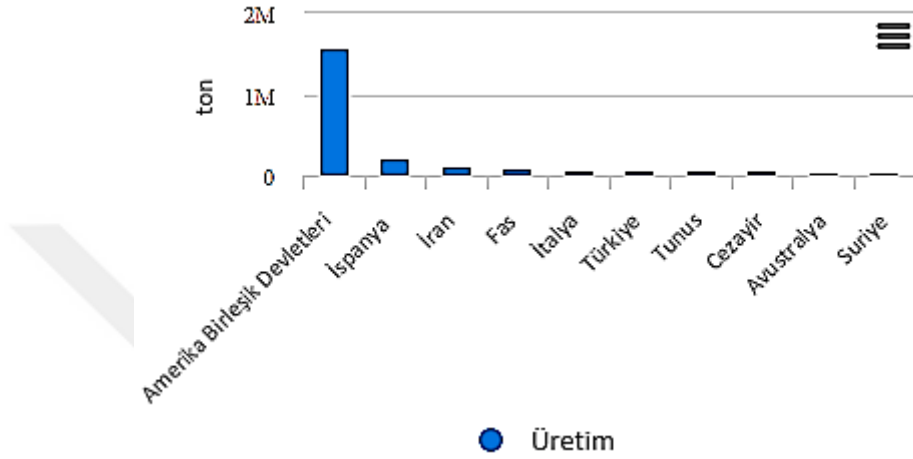
1.4. Dünyada ve Türkiye’de Badem Verileri

FAO verilerine göre, 2000-2018 yılları arasındaki dünya badem üretim verilerine baktığımızda kıta olarak Okyanusya ve Kuzey Amerika ilk sıralarda yer almaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Dünya badem üretimi (FAO, 2020e)

Dünyada 2 071 884 ha alandan 3 182 902 ton badem üretimi yapılmaktadır. 2010-2018 yılları arasındaki badem üretiminde ilk 10 ülke içerisinde ABD ilk sırayı alırken; bunu sırasıyla İspanya, İran, Fas, İtalya ve Türkiye takip etmektedir. Badem üretiminde ABD ile diğer ülkeler arasında oldukça önemli bir fark bulunmaktadır. Türkiye, Dünya badem üretiminde 150 000 ton ile ABD, İspanya, İran, Fas'tan sonra beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.5).

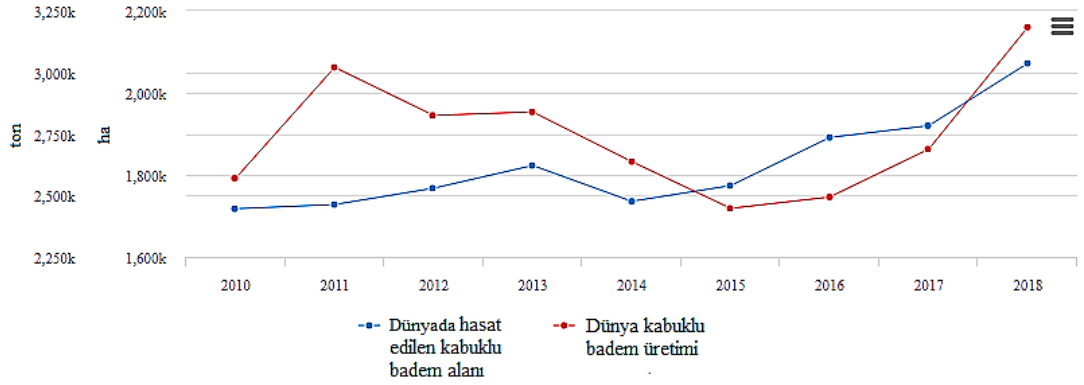


Şekil 1.5. 2010-2018 yılları arasında ilk 10'da yer alan ülkelerde kabuklu badem üretimi (FAO, 2020f)

Şekil 1.6'da görüldüğü gibi dünya badem üretim alanı ile üretim miktarı yıllara göre değişmekle birlikte, bazı yıllar üretim alanı artmasına rağmen üretim miktarında azalma meydana gelirken bazı yıllar ise üretim miktarındaki azalma ya da artışa bağlı olarak üretim miktarında da o yönde bir azalma ya da artış göstermiştir. Dünyadaki en yüksek badem üretimi 2018 yılında gerçekleşirken, en düşük badem üretimi ise 2015 yılında gerçekleşmiştir.

Dünyada kabuklu badem üretim/verim miktarları + (Toplam)

2010-2018



Şekil 1.6. Dünyada 2010-2018 yılları arasında kabuklu badem üretimi verileri (FAO, 2020g)

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; Türkiye'deki badem üretim alanı 470 881 da olup üretim miktarı 150 000 tondur (Çizelge1.5).

Çizelge 1.5. Yıllara göre Türkiye'de badem üretimi (TÜİK, 2020c)

Yıllar	Meyve veren yaşta ağaç sayısı (adet)	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı (adet)	Toplu meyveliklerin alanı (dekar)	Verim (kg/meyve veren ağaç)	Üretim (ton)
2010	3 683 032	2 589 493	171 478	15	55 398
2011	4 221 566	3 101 231	205 039	17	69 838
2012	4 679 833	3 242 945	235 547	17	80 261
2013	5 255 592	3 602 097	254 570	16	82 850
2014	5 637 326	3 814 999	270 203	13	73 230
2015	5 863 629	4 294 611	296 714	14	80 000
2016	6 663 996	4 964 011	333 221	13	85 000
2017	6 810 165	5 098 562	352 017	13	90 000
2018	8 490 351	5 400 809	421 914	12	100 000
2019	9 521 707	6 333 129	470 881	16	150 000

Survey çalışmalarının yürütüldüğü il ve ilçelerdeki badem yetiştiriciliği daha çok eğimli, taşlı ve sulama gerektirmeyen alanlarda yapılmakta olup, yabancı badem ağaçlarının da oldukça fazla olduğu görülmekte ve son yıllarda kapama bahçelerin sayısı gittikçe artmaktadır. Survey çalışmasının yapıldığı il ve ilçelerdeki üretim miktarları ve üretim alanları Çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Survey çalışması yapılan il ve ilçelerdeki badem üretimi ve alanı (TÜİK, 2020d)

İller	İlçeler	Üretim (ton)	Alan (dekar)
Malatya	Darende	172	1 720
	Doğanşehir	185	1 150
	Yeşilyurt	424	1 208
	Battalgazi	174	1 884
	Akçadağ	283	1 096
	Hekimhan	233	2 800
	Pütürge	56	194
	Toplam	2 126	13 318
Elazığ	Merkez	854	4 050
	Ağın	1 061	4 660
	Baskil	351	1 660
	Keban	387	2 500
	Toplam	3 303	13 307
Adıyaman	Merkez	697	8 600
	Besni	2 284	16 020
	Gölbaşı	1 430	7 800
	Kahta	10 455	35 500
	Toplam	15 470	72 350

1.5. Ceviz ve Bademde Üretimi Sınırlayan Faktörler

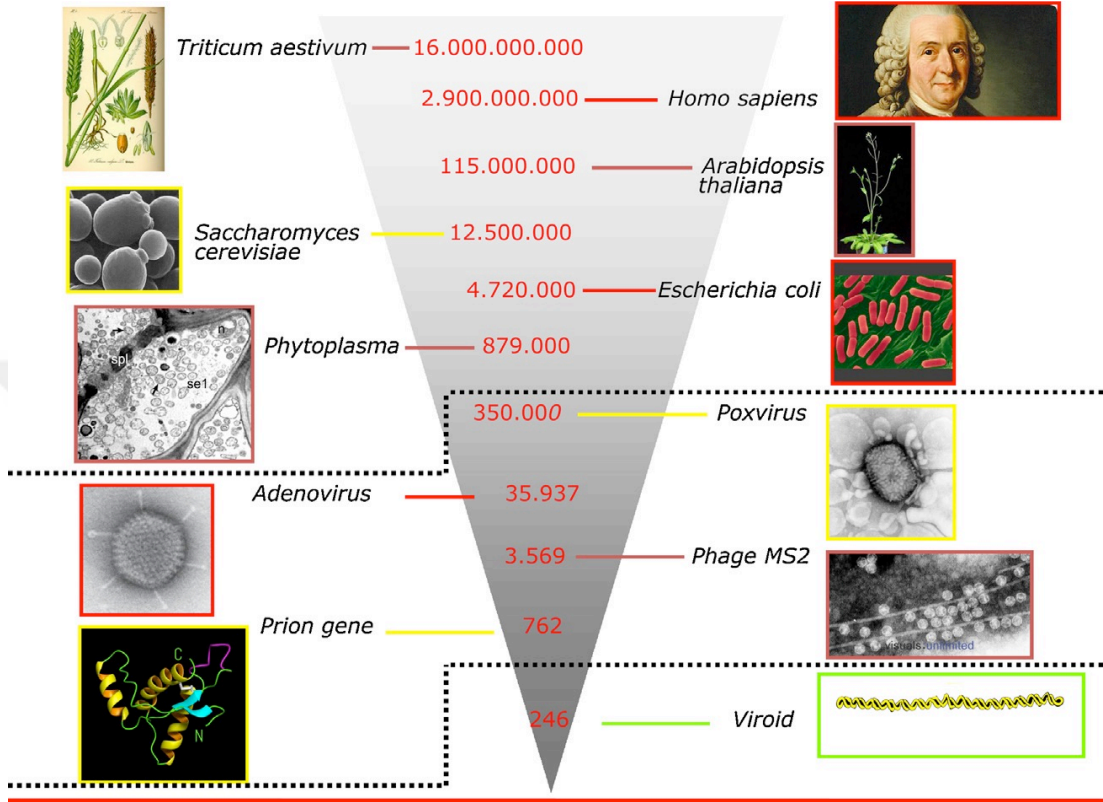
Sert kabuklu meyve türlerinden olan ceviz ve bademde üretimi sınırlayan pek çok biyotik ve abiyotik faktörler vardır. Biyotik faktörler arasında yer alan hastalıklar sert kabuklu meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde yetiştiriciliği ve verimi sınırlayan en önemli faktörlerdendir.

Biyotik faktörler içinde görülen hastalıklar arasında virüs, viroid ve virüs benzeri organizmalar yer almakta olup diğer bitkisel ürünlerde olduğu gibi, badem ve ceviz gibi sert kabuklu meyvelerde de üretimin kalite ve kantitesine etki ederek pazar değerlerinin düşmesine neden olmaktadır. Virüs, viroid ve virüs benzeri organizmalara karşı kimyasal mücadele yönteminin olmaması ve bu tarz hastalıkların üretim materyali, aşılama, kültürel işlemler, polen ve vektörler ile taşınması ve yayılmalarının oldukça kolay olmasından dolayı; bu hastalık etmenleri ile en etkili mücadele yöntemi olarak etmenlerin doğru ve erken tanı ve teşhisinin yapılması, viral hastalık kaynaklarının yok edilmesi, vektör ve yabancı ot mücadelesinin yapılması, dayanıklı veya tolerant çeşitlerin kullanılması, virüsten arı üretim materyali kullanması gibi temel koruyucu önlemlerin alınması önem arz etmektedir. Teknolojinin gün geçtikçe gelişmesi ile birlikte, virüs, viroid ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin teşhislerinin rutin olarak yapılabileceği test yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Kimyasal mücadelede yanlış ilaç kullanımı, bitki besin elementi fazlalığı veya noksanlığı ve virüs haricindeki patojenler de viral hastalıklarının neden olduğu belirtiler gibi belirtiler oluşturabilmektedir. Bu nedenle simptomolojik tanıya ek olarak serolojik, moleküler ve biyolojik testlerin de yapılması gerekmektedir (Uyemoto ve Scott, 1992; Koç, 2010).

1.5.1. Viroidler

Kültür bitkilerinde ekonomik zarar oluşturan 20. yy ortalarına kadar birçok araştırmacı tarafından klasik bitki virüsleri olarak düşünülmekteyken (Bitters, 1952) 1962 yılında patateslerde yapılan bir çalışmada patates iğ yumru hastalığına bir virüsün değil, farklı bir grup olan viroidlerin neden olduğu belirlenmiştir (Diener ve Raymer, 1967). Yapılan bu çalışmada, patates hücrelerinde serbest olarak bulunan, düşük moleküler ağırlığa sahip RNA'ları izole etmişler ve protein kılıfa sahip olmayan bu yeni patojen grubuna viroid adını vermişlerdir. Viroidler çoğaltma materyali ile

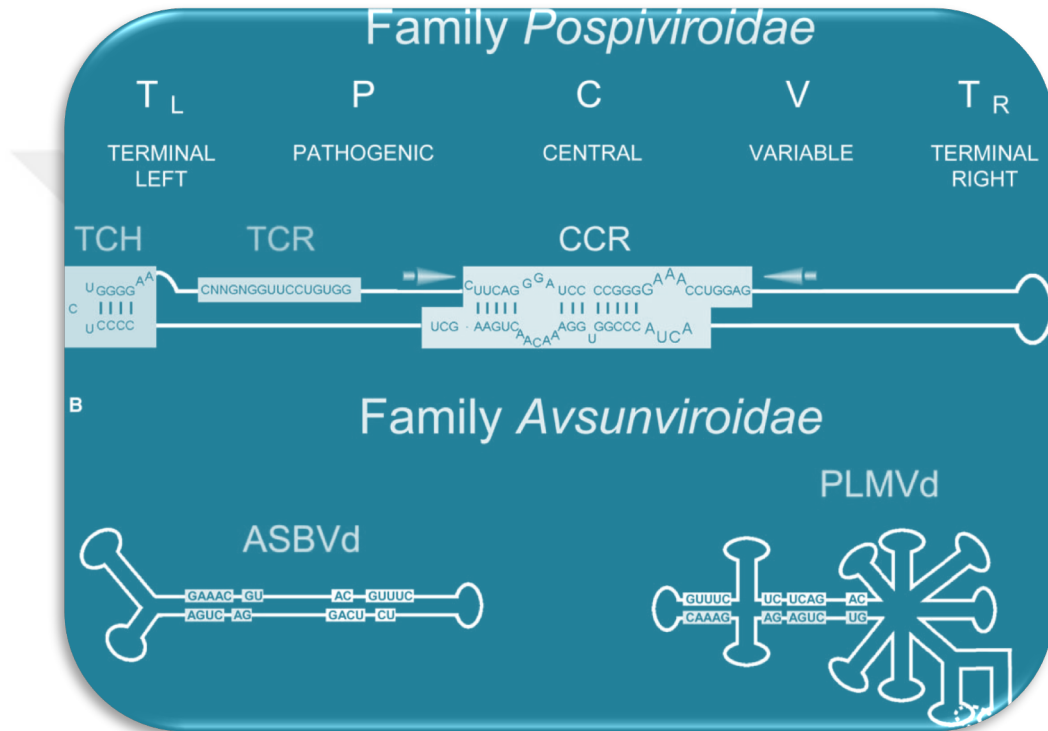
taşınan, ısıya dayanıklı RNA'lerden meydana gelen en küçük bitki patojenleridir (Şekil 1.7). Viroidler küçük (246–401 bp), dairesel, tek iplikli RNA (ssRNA=single stranded RNA) molekül yapısındaki etmenlerdir (Daros vd, 2006).



Şekil 1.7. Genomik büyüklüğün azalan ölçek şeması (Flores vd. 2015)

Şu ana kadar 32 viroid türü belirlenmiş ve Pospiviroidae ve Avsunviroidae olmak üzere 2 familyaya ayrılmıştır (Di Serio vd., 2014). Pospiviroidae familyasının merkezi koruma bölgesine (Central Conserved Region, CCR) sahip iken, Avsunviroidae familyası merkezi koruma bölgesine sahip değildir (Karagahi ve Hajizadeh, 2020). Pospiviroidae familyası üyelerinde ribozim aktivitesi bulunmamakta, nükleusta asimetric olarak çoğalmakta ve kendi kendine kesim yeteneğine sahip olmayan stabil çubuk şekilli ikincil yapılar oluşturmaktadırlar. Avsunviroidae familyası üyelerinde ise ribozim aktivitesi bulunmakta, kloroplastta simetric olarak çoğalmakta ve çekiç başı görünümüne ribozim oluşturan yapıları ile kendi kendine kesim yeteneğine sahiptirler. *Pospiviroidae* familyası üyelerindeki, çubuk şeklinde olan moleküler yapı 5 farklı fonksiyonel bölgeden oluşmakta olup bunlar; sağ (Terminal Right, TR) ve sol (Terminal Left, TL) uç bölgeleri, merkezi

korunmuş bölgeyi de (Central Conserved Region, CCR) içeren merkezi bölge (Central, C) ve her iki uç bölge ile merkezi bölge arasında kalan ve hastalık oluşumundan sorumlu bölge (Pathogenity, P) ile değişken bölge (Variable, V)'dir (Şekil 1.8). *Avsunviroidae* familyası üyelerinde ise, ikincil yapısının sol uç bölgesinin “Y” şeklinde olması haricinde doğal yapısı çubuk şeklindedir (Şekil 1.8). Viroidlerin çoğu termodinamik olarak sahip olduğu sirküler RNA'nın bazı kısımları tıpkı bir (tel) saç tokasını andırır gibi birleşerek içerisinde balon görünümüne küçük şişkinlikler ile çıkıntı şeklindeki yapılar ihtiva eden iki iplikli ikincil yapılar oluştururlar (Erkan vd., 2016).



Şekil 1.8. Viroidlerin moleküler yapısı (Flores vd. 2004)

Pospiviroidae familyası 5 farklı genusa ayrılırken, Avsunviroidae familyası üyeleri 2 cinse ayrılmaktadır. Bu cinslerin tamamı grubu temsil eden üye adının kısaltılmış hali olarak isimlendirilmektedir (Şekil 1.9).

FAMILY	SUBFAMILY	GENUS	SPECIES	
VIROIDS	POSPIVIROIDAE With CCR and without hammerhead self-cleavage	POSPIVIROIDAE	PSTVd (Potato spindle tuber viroid)	
			PCFVd (Pepper chat fruit viroid)	
			TPMVd (Tomato planta macho viroid)	
			CSVd (Chrysanthemum stunt viroid)	
			POSPIVIROID	CEVd (Citrus exocortis viroid)
			TASVd (Tomato apical stunt viroid)	
			IrVd (Íresine viroid 1)	
			POSPIVIROINAE	CLVd (Tomato chlorotic dwarf viroid)
			CLVd (Columnea latent viroid)	
			HOSTUVIROID	HSVd (Hop stunt viroid)
			DLVd (Dahlia latent viroid)	
			CCCvd (Coconut cadang-cadang viroid)	
			COCADVIROID	CTiVd (Coconut tinangaja viroid)
			HLVd (Hop latent viroid)	
	CBCVd (Citrus bark cracking viroid)			
	POSPIVIROIDAE Without CCR and with hammerhead self-cleavage	APSCAVIROINAE	APSCAVIROID	ASSVd (Apple scar skin viroid)
				CVd-III (Citrus viroid III)
				ADFVd (Apple dimple fruit viroid)
				GYSVd 1 (Grapevine yellow speckle viroid 1)
				GYSVd 2 (Grapevine yellow speckle viroid 2)
				CDVd (Citrus dwarfing viroid)
				CVd-V (Citrus viroid V)
				CVd-VI (Citrus viroid VI)
				PBCVd (Pear blister canker viroid)
				CBLVd (Citrus bent leaf viroid)
				PBCVd (Pear blister canker viroid)
				AGVd (Australian grapevine viroid)
				CbVd 1 (Coleus blumei viroid 1)
CbVd 2 (Coleus blumei viroid 2)				
CbVd 3 (Coleus blumei viroid 3)				
AVSUNVIROIDAE without CCR and with hammerhead self- cleavage	AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROID	ASBVd (Avacado sunblotch viroid)	
			ELAVIROID	ELVd (Eggplant latent viroid)
			PLMVd (Peach latent mosaic)	
			PELAMOVİROID	CChMVd (Chrysanthemum chlorotic mottle viroid)
AHVd (Apple hammerhead viroid)				

Şekil 1.9. Viroidlerin sınıflandırılması (ICTV, 2020)

Viroidlerin konukçu bitki içerisinde hücreden hücreye çok hızlı hareket ettikleri ve floemde oldukça hızlı ilerledikleri belirlenmiştir. Viroidler bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkilemekte ve bazı viroidler konukçu bitki içerisinde

latent olarak bulunabilmektedirler (Semancik ve Szychowski, 1992). Viroid hastalıklarının belirgin semptomları; enfekteli yapraklarda mozaik, lekelenme, damar bantlaşması veya kaliko şeklindedir. Viroid hastalık semptomları büyük çoğunlukla viroidin irkına, neden olduğu hastalığın şiddetine ve tipine, enfekte ettikleri konukçuya bağlıdır. Viroidlerin ikincil yapıları, viroidlerin yaşam döngüsünde özellikle de replikasyon, çoğalma, taşınma ve konukçu bitki istilasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, viroidlerin ikincil yapılarının değerlendirilmesi konukçu-viroid ilişkisini anlamada önemli bir parametredir. Viroidlerin ikincil yapılarının bilgisayar yardımıyla, termodinamiğe dayanan tahminleri geniş çaplı kullanılmasına rağmen, *in vitro* ve/veya *in cellulo* yapısal değerlendirmeleri daha çok biyolojik olarak viroidin yaşam döngüsü ile ilgilidir (Adkar-Purushothama ve Perreault, 2019).

Son yıllarda viroidlerin tanı ve teşhislerinin yapılabilmesi için; poliakrilamid jel elektroforez (polyacrilamide gel electrophoresis, PAGE) analizi (Faggioli vd., 1997), radyoaktif ve radyoaktif olmayan problarla nokta blot hibridizasyonu (Hernandez ve Flores, 1992; Kyriakopoulou vd., 2001; Shamloul vd., 1995) ve doku blotlama hibridizasyonu yöntemlerinden (Mandic vd., 2008) faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerin yanısıra hastalığa spesifik primer dizinleri kullanılarak yapılan RT-PCR yöntemi ile de oldukça hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Loreti vd., 1999; Ragazzino vd., 2004; Shamloul vd., 1995; Shamloul ve Hadidi, 1999).

Viroidlerin birçok ülkede (Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya, Avusturya, Çin, Fransa, Arnavutluk, Yunanistan, Japonya, Romanya, Sırbistan, İspanya ve Tunus vb.) hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (Desvignes, 1986; Flores ve Lacer, 1988; Kyriakopoulou vd., 2001; Mandic vd., 2008; Osaki vd., 1999; Shamloul vd., 1995). Virüs, viroid ve virüs benzeri organizmalar ürünün kalite ve kantite değerlerini bozmaktadır. Bu etmenlerin neden olduğu olumsuz sonuçların ve etmenlerin epidemiyolojisi hakkındaki araştırmaların yetersiz olduğu kaydedilmiştir.

Kayısı, nektarin, şeftali, kiraz ve vişnenin yer aldığı sert çekirdekli meyve türlerinde görülen virüs, viroid ve virüs benzeri hastalıkların çoğu bademde ve cevizde de hastalık yapmaktadır. Ancak badem ve ceviz ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sayısal olarak diğer sert çekirdekli meyvelere göre daha az sayıdadır (Ogava vd, 1995, Diekmann ve Putter, 1996, Micke, 1996). Sert çekirdekli ve sert kabuklu meyve

ağaçlarında görülen en önemli viroid hastalıklarından birisi de *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)'dir.

1.5.1.1. *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)

PLMVd etmeni ilk olarak Fransa'da tanımlanmış olmasına rağmen, daha önceden ABD ve Japonya'da başka hastalık isimleri ile rapor edilmiştir (Flores vd., 2006). PLMVd; Avrupa ülkelerinde kayısı, erik, kiraz, kültür armutu ve yabani armutta (Faggioli vd., 1997; Hadidi vd., 1997; Kyriakopoulou vd., 2001), Tunus'ta armut ve bademde bulunmuştur (Fekih Hassen vd., 2004 ve 2005).

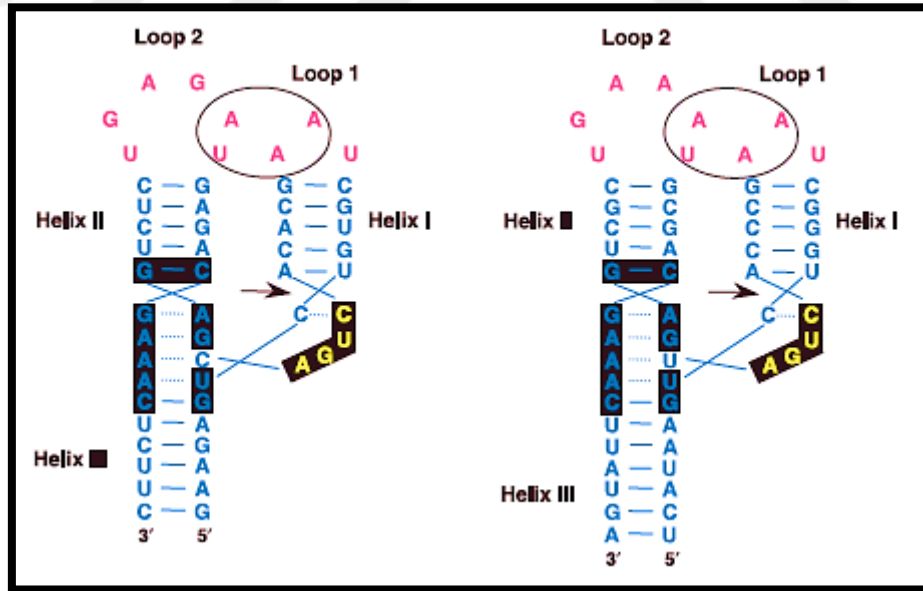
PLMVd etmeninin taşınması ile ilgili bazı çalışmalar viroid olarak tanımlanmadan önce rapor edilmiştir. Uzun mesafelere taşınma bir ağacın bir dalına inoküle edilerek uygun koşullar altında yapılmış ve enfeksiyonun zamanla nasıl geliştiği takip edilmiştir (Desvignes, 1981). PLMVd bitki sürgününün tepe noktasına kadar taşınabilmektedir. Enfekteli bir ağaçta, PLMVd'nin titresi diğer çoğu viroid ile kıyaslandığında nispeten düşük olmasına rağmen; sürgünlere, yapraklara, gövdeye, köklere ve meyvelere çok iyi bir şekilde yayılabilmektedir (Flores vd., 1992). Genç ve yeterli büyüklüğe erişen meyveler, PLMVd yönünden zengin preparat elde etmek için en iyi kaynaklardır (Delgado vd., 2015).

PLMVd etmeni aşı ile kolayca taşınmakta ancak tohumla taşınmamaktadır (Desvignes, 1986). Aynı zamanda PLMVd, şeftali yaprak biti (*Myzus persicae*) (Desvignes vd., 1992; Flores vd., 1992) ve viroidle bulaşık otsu bitkilerle de taşınabilmektedir (Flores vd., 1990; Hadidi vd., 1997). Elma, badem, kayısı, şeftali, kiraz, erik, ayva, kültür armudu ve yabani armut gibi Rosaceae familyasına ait ağaç türleri PLMVd'nin konukçuları olarak düşünülmektedir (Karagahi ve Hajizadeh, 2020). Asma ve mango gibi Rosaceae familyasının dışındaki bitki türlerinin de PLMVd'nin konukçusu olduğu doku baskı hibridizasyon yöntemiyle rapor edilmiştir (El-DougDoug vd., 2012).

PLMVd etmeni özellikle şeftalide farklı yaprak belirtileri oluşturmaktadır. PLMVd varyantlarının çoğu latenttir ve enfekteli ağaçlar yıllarca belirtiler göstermezler ve daha sonraları mozaik, kloroz, leke, damar bantlaşması, "Peach calico" olarak bilinen şiddetli kloroz veya albinizm gibi farklı yaprak belirtileri

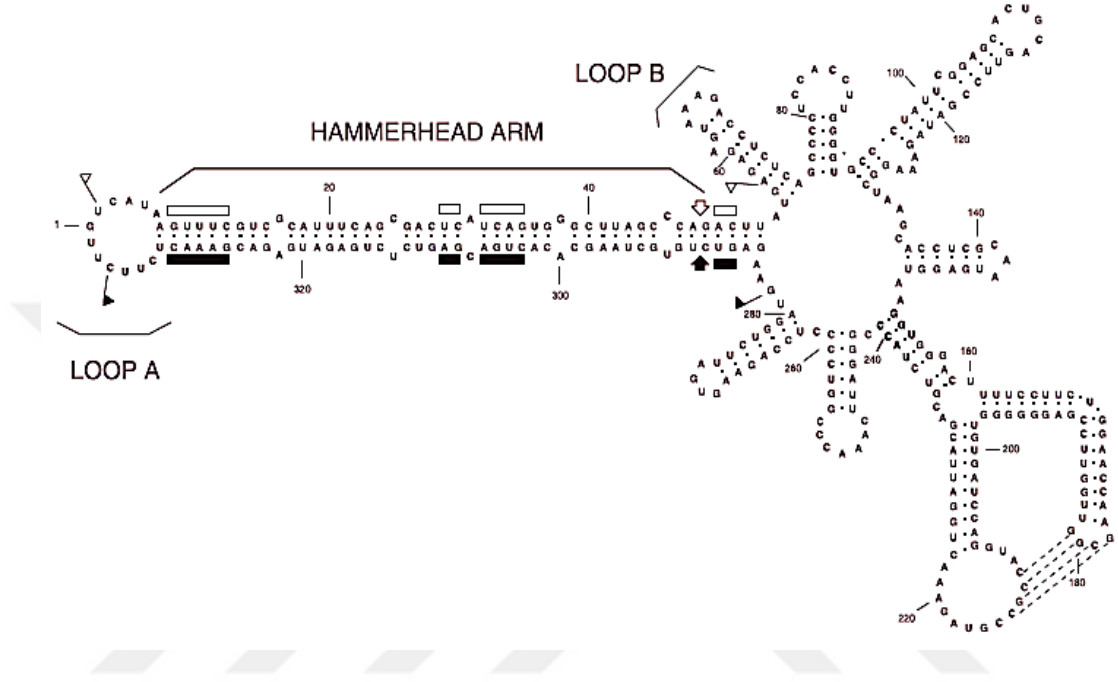
gelişmektedir. Tomurcuklarda nekrozlar görülürken, sürgünlerin gelişimi engellenir ve dallarda nekrotik lekelenmeler ile geriye doğru ölüm, meyve kabuğunda küçük dairesel renk değiştirmiş alanlar meydana gelmektedir (Albanese vd. 1992; Desvignes, 1986). Bunların yanısıra çiçeklerde çizgilenme, yaprakların açmasında, çiçeklenmede ve meyvelerin olgunlaşmasında gecikmeler, meyvelerde deformasyon ve renksizleşme görülen diğer belirtiler arasındadır (Desvignes, 1986). Uygun sera koşulları altında, PLMVd izolatlarının şeftali anacı *Prunus persica* GF-305'in çöğürlerinde yaprak semptomuna neden olup olmamasına göre şiddetli ya da latent ırk olduğu düşünülmektedir (Desvignes, 1980). PLMVd, ağaçların yaşam süresini kısaltmakta ve biyotik-abiyotik stres faktörlerine karşı ağacın dayanıklılığının azalmasına neden olmaktadır (Flores vd., 2006).

PLMVd Avsunviroidae familyasının üyesidir (Di Serio vd., 2014). Avsunviroidae familyasında yer alan viroidlerin genomları dairesel tek iplikli RNA'dan oluşmakta ve (+) ve (-) polariteli strainler çoğalmada yer alan çekiçbaşı yapıları oluşturabilmektedir. PLMVd'nin çekiçbaşı termodinamik olarak stabildir (Şekil 1.10) (Di Serio vd., 2020).



Şekil 1.10. PLMVd + (sol) ve - (sağ) çekiçbaşı ribozimlerinin şematik görünümü (Flores vd. 2006)

PLMVd; 11 gövde (P1-P11), 11 loop (L1-L11) ve bir ya da daha fazla pseudoknot içeren ikincil bir yapıya sahiptir (Şekil 1.11) (Bussiere vd., 2000; Pelchat vd., 2000; Fekih Hassan vd., 2007). PLMVd, replikasyon boyunca kendi kendine bölünmeyi sağlayan polarite şeritlerinde çekiçbaşı korunmuş etki alanlarına sahiptir (Flores vd., 1992).



Şekil 1.11. PLMVd'nin ikincil yapısının genel görünümü (Flores vd. 2006)

Sert kabuklu meyve türlerinden olan ceviz ve bademde viroid hastalıkları hakkında ülkemizde yapılmış çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Özellikle çalışmamızın survey alanlarını oluşturan Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinde son yıllarda ceviz ve badem üretimi artış göstermesine rağmen, viroid hastalıkları ile ilgili yeterince veri bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile Malatya, Elazığ ve Adıyaman illeri badem ve ceviz üretim alanlarında PLMVd'nin varlığının RT-PCR yöntemi ile araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen izolatların farklı biyoinformatik programları kullanarak dünyadaki diğer izolatlar ile olan genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya konmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)’nin varlığını tespit etmeye yönelik çalışmalar oldukça az sayıda olup, PLMVd ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu yurtdışı kaynaklıdır. Türkiye’de PLMVd ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle *Prunus* spp.’de PLMVd etmeninin varlığını belirlemeye yöneliktir.

Sipahioğlu vd., (2006), Doğu Anadolu bölgesinde 2003-2004 yıllarında viroid, fitoplazma ve fungal hastalıklarının oranını belirlemek için sert çekirdekli meyve ağaçlarında survey yapmışlardır. PLMVd ve *Hop stunt viroid* (HSVd)’nin varlığını araştırmak için moleküler hibridizasyon yöntemi kullanmışlardır. Test edilen 491 ağacın 16’sında viroid bulduklarını, PLMVd’yi şeftali ağaçlarında %3 oranında, HSVd’yi ise kayısı ağaçlarında %0.1 oranında tespit ettiklerini ve ortalama viroid enfeksiyon oranının %3.2 olduğunu bildirmişlerdir. HSVd’nin Doğu Anadolu Bölgesinde ilk kez tespit edildiğini ve PLMVd enfeksiyonuna ise kayısı yetiştiriciliği yapılan yerlerde (Malatya, Elazığ) rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca kayısıda *Ca. P. prunorum*’un varlığını tespit etmek için yapılan PCR analizinin negatif çıktığını da belirtmişlerdir. Bölgeden toplanan simptom gösteren örneklerden *Armillaria mellea*, *Cytospora* spp., *Monilinia laxa*, *Stigmina carpophila*, *Chondrostereum purpureum*, *Fusarium* spp., *Rosellinia* spp., ve *Phytophthora* spp.’nin izolatlarının tanımlandığını bildirmişlerdir.

Gümüş vd., (2007), 2004–2006 yılları Haziran-Ağustos aylarında Batı Anadolu’daki sert çekirdekli meyve üretimi yapılan bölgelerde *Prunus* türlerini etkileyen en önemli 7 virüs ve 2 viroid etmeni üzerinde geniş kapsamlı bir çalışma yürütmüştür. 1732 farklı test bitkisinde yapılan moleküler (PCR, Tissue Printing Molecular Hybridization) test çalışmalarının sonucunda; *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apricot latent virus* (ApLV), *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV), PLMVd ve HSVd’in toplam bulaşma seviyesi %30 olarak bulunmuştur. Sonuçlar göstermiştir ki; aşı yolu ile taşınan bu etmenlerin Batı Anadolu bölgesinde ortaya çıkmasının ve yayılmasının önlenmesi için sertifikasyon programlarına veya hastalıktan ari materyal sağlama programlarına gereksinim duyulmaktadır.

Gazel vd., (2008), 2004 ve 2005 yıllarında Doğu Akdeniz bölgesinin şeftali yetiştiriciliği yapılan farklı alanlarından 51 şeftali ve 5 nektarin ağacından örnekler toplayarak PLMVd'nin varlığını tespit etmek için RT-PCR yöntemi ile analiz etmişlerdir. Toplanan örneklerin çoğu gen kaynaklarından alınmış ve PLMVd'ye özgü spesifik bir semptom göstermemiştir. PLMVd'nin varlığı 3 nektarin ve 8 şeftali ağacında tespit edilmiş, toplam 11 PLMVd izolatının nükleotid dizisi belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda tespit edilen PLMVd izolatları gibi, bu çalışmadan elde edilen izolatlar da 336-340 nt uzunluğunda değişmiştir. Yapılan nükleotid çoklu dizi analizi ve filogenetik analizler sonucunda, 11 izolatın PLMVd Grup 3'de kümelendiğini göstermiştir. Tespit edilen izolatlar arasında '99' nolu izolatın bu çalışmada karakterize edilen izolatlar ve daha önceden karakterize edilen izolatlar arasında en büyük değişkenliği gösterdiğini ve yaptıkları mFold analizleri sonucunda da ikincil yapısındaki değişkenliklerin çoğunun pseudoknot içeren gövdeden kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

Tuncel vd., (2020), cevizde PLMVd etmenini dünyada ilk kez rapor etmişlerdir. Malatya ili Battalgazi ilçesinde yer alan ceviz gen kaynağı parselinde semptomsuz ceviz ağaçlarından 12 yaprak örneği toplamışlardır. Genomik RNA'ları ticari RNA izolasyon kiti kullanılarak çıkarılmış ve tüm viroid genomu RT-PCR yöntemi ile PLMVd'ye özgü primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Beklenen büyüklükteki PCR ampliconları pGEM-T Easy vektörde klonlanmış ve *Escherichia coli* JM109 suşuna aktarılmıştır. Purifiye edilen plazmidler çift taraflı olarak dizilenmiştir. 2018 yılı yaz ortası ve 2019 yılının sonbaharında toplanan 12 ceviz örneği RT-PCR yöntemi ile test edilmiş ve sadece 4 örnekte PLMVd tespit edilmiştir. İki ceviz izolatının (Erişim numarası: MN857143-MN857144) nükleotid sekans analizi PLMVd'nin varlığını doğrulamış ve dünyadaki diğer şeftali, nektarin ve kiraz izolatları ile %96.6-98.8 (MN857143) ve %97-98.8 (MN857144) oranlarında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Malatya'da tespit edilen PLMVd ceviz izolatlarının moleküler özelliklerinin de rapor edildiğini belirtmişlerdir.

2.2. Dünyada Yapılan Çalışmalar

Hadidi vd., (1997), Asya, Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'da şeftali bahçelerinde PLMVd'nin oldukça yaygın olduğunu ve şeftalinin yanısıra kiraz bahçelerinde de PLMVd tespit ettiklerini belirtmişlerdir. PLMVd'nin bulaşık otsu

bitkilerden sağlıklı bitkiler aynı zamanda bulaşık budama aletleri ile taşınabildiğini bildirmişlerdir.

Loreti vd., (1999), PLMVd'nin şeftali üretim materyali olan GF-305 anaç üretim kaynaklarından alınan örnekler ile etmenin elimine edilerek temiz üretim materyali temini için çalışmalar yapılması gerektiği üzerinde durmuşlardır. Bu amaç doğrultusunda çalışmalarında kullandıkları metotların; hassas, güvenilir ve kısa zamanda yapılıyor olmasına dikkat etmişlerdir. Yapılan çalışmada biyolojik indikatörler kullanılmış ve elde edilen sonuçlar moleküler teknikler (spot-blot ve tissue-blot hibridizasyon, non-radyoaktif prob kullanımı ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon yöntemleri) ile karşılaştırılmıştır. Bitkilerin çeşitli aksamlarından (yaprak, tomurcuk ve kabuk) alınan numuneler üzerinde iki ayrı nükleik asit ekstraksiyon metodu denenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, tomurcuklardan alınan örneklerin Tissue-Blot Hibridizasyon yöntemi ve cRNA digoksinin-işaretli prob kullanımı ile PLMVd'nin belirlenmesinin daha güvenilir olabileceğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda bu metodun şeftalide sertifikalı ve temiz üretim materyali eldesinde kullanılabilmesi üzerinde durmuşlardır.

Bussiere vd., (2000), PLMVd'nin ikincil yapısının ve dallanmış viroid yapısı tanımının ilk kez bu çalışma ile araştırıldığını ve PLMVd'nin kompleks ve dallanmış bir ikincil yapıya sahip olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada araştırdıkları ikincil yapının biyoinformatik bilgisayar programları ile yapıldığını, daha önceki çalışmalarda rapor edilen ikincil yapılar ile benzer olduğunu ve pseudoknot içerdiğini belirtmişlerdir. Bu pseudoknotun aynı zamanda *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)'inde bulunduğunu ve bunun PLMVd alt grubu viroid üyelerinin eşsiz bir özelliği olduğunu rapor etmişlerdir.

Flores vd., (2000), viroidlerin taksonomik olarak Pospiviroidae ve Avsunviroidae olmak üzere iki farklı familyaya ayrıldığını ve yaklaşık 30 viroid türünün bilindiğini rapor etmişlerdir.

Pelchat vd., (2000), 9 farklı şeftali çeşidinden 34 adet yeni PLMVd izolatını dizilediklerini ve yapılan bu çalışmanın bugüne kadar rapor edilen en geniş kapsamlı çalışma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile Kuzey Amerika izolatlarının moleküler karakterizasyonları da rapor edilmiştir. Yaptıkları analiz sonucu

PLMVd'nin ikincil yapısının kompleks dallanmış bir yapıya sahip olduğunu ve 3 yeni pseudoknot içerdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuç neticesinde de çoğu diğer viroidlerde bulunan çubuk şeklindeki ikincil yapılarının aksine küre şeklinde ikincil yapılar ihtiva ettiklerini rapor etmişlerdir.

Al Rwahnih vd., (2001), Ürdün'de sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki virüs ve viroidleri araştırmak için yapılan çalışmada; ticari bahçelerde, damızlık parsellerde ve çeşitli koleksiyonlarda surveyler yapılmış ve bahçelerdeki hastalıkların ELISA ve moleküler hibridizasyon yöntemleri ile belirlenmesini amaçlamışlardır. Toplamda 1312 örneğe ELISA testi yapılmış ve genel hastalık enfeksiyon oranı %14 olarak bulunmuştur. Farklı meyve ağaçlarındaki enfeksiyon oranı şeftalide %18, kirazda %15, bademde %14, kayısıda %11 ve erikte %10 olarak bulunmuştur. Tespit edilen virüs ve viroidler; PPV, PNRSV, PDV, ApMV, ACLSV, HSVd ve PLMVd olarak rapor edilmiştir. ApMV, ACLSV, PLMVd ve HSVd etmenlerinin ise Ürdün için ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

Crescenzi vd., (2002), Güney İtalya'daki kiraz ağaçlarında PLMVd etmeninin varlığını araştırmışlardır. Birkaç kiraz çeşidinin birlikte bulunduğu ticari bahçelerdeki ağaçlardan tomurcuk ve yaprak örnekleri toplamışlardır. Aşı kalemleri *Prunus persica* GF-305 anaçları üzerine aşılanmış ve aşılama yapılan indikatör bitkiler birkaç ay boyunca gözlemlenmiş ve simptom göstermediklerini bildirmişlerdir. Total nükleik asit ekstraksiyonlarını, kiraz veya GF-305 anacının yapraklarından yaklaşık 250 mg yaprak örneği olarak ekstrakte ettiklerini ve dot-blot hibridizasyon yöntemi ile analiz ettiklerini belirtmişlerdir. Hibridizasyon yöntemi sonucunda, 15 kiraz ağacından 5'inin doğal olarak PLMVd ile etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Shamloul vd., (2002), viroidlerin tanı ve tespiti için hızlı ve hassas olan multipleks RT-PCR-ELISA yöntemini kullandıklarını ve bu yöntemin *Potato Spindle Tuber Viroid* (Pospiviroid), *Peach latent mosaic viroid* (Pelamoviroid), *Apple scar skin viroid* (Apscaviroid), *Apple dimple fruit viroid* (Apscaviroid), *Pear blister canker viroid* (Apscaviroid) ve *Hop stunt viroid* (Hostuviroid) etmenlerinin tanı ve tespiti için başarılı bir şekilde uygulandığını bildirmişlerdir. Total DNA ekstraksiyonları Qiagen RNA easy kit yardımıyla yapılmış ve viroide özgü primerler kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Altı viroidin amplikonunu ayırt etmek ve

tanımlamak için, amplifikasyon işlemi boyunca her viroidin amplikonu DIG etiketi ile tutulmuş ve daha sonra her viroide özgü cDNA probu kullanılarak tespit edilmiştir. Böylece 6 viroidin aynı anda multipleks RT-PCR-ELISA ile tespit edilebileceğini belirlemişlerdir. Multipleks RT-PCR-ELISA yönteminde 6 viroidin cDNA'sının tek tüpte eş zamanlı olarak sentezlenebildiğini ve bu bulguların konukçu-viroid ilişkileri, viroid hastalıklarının kontrolü ve viroid hastalıklarının tanı ve tespiti için önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Malfitano vd., (2003), şeftali bitkisinin yapraklarında yoğun kloroza neden olan ve kaliko (peach calico) olarak bilinen belirtinin PLMVd ile alakalı olduğunu ancak bununla ilgili hiçbir kanıtın olmadığını bildirmişlerdir. Onaltı adet PC izolatının çoklu nükleotid dizilemesi, PLMVd izolatlarını 2 gruba ayırmıştır. Bu 16 izolattan 9'unun 336-338 nt uzunluğunda ve asemptomatik PLMVd izolatları ile benzer olduğunu, 7'sinin ise 12-13 nükleotit (nt) eklenmesi ile 348-351 nt uzunluğunda olduğunu ve bu eklemenin her zaman hairpin loop'unda bulunduğunu belirtmişlerdir. PC belirtilerinin sadece nükleotid eklemesi içeren hairpin loop'undaki RNA tarafından üretildiğini rapor etmişlerdir. Elde edilen bu verilerin yapraklarda yoğun kloroza neden olan PC belirtisinin PLMVd etmeninden kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Ragozzino vd., (2003), Güney İtalya'nın Campania bölgesindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında PLMVd ve HSVd'yi eşzamanlı olarak tespit edebilmek için multipleks RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışma PLMVd ve HSVd etmenlerine özgü olan primerlerin karışımı kullanılarak dot-blot hibridizasyon yöntemi ile yapılmıştır. Bitkisel gen kaynağı koleksiyonundaki 129 ağaçtan örnekler alınarak enfeksiyon seviyelerini değerlendirilmiş ve korelasyon yapılarak belirtilerin varlığı veya yokluğu ile ilişkilendirilmiştir. Her iki viroidin de geniş ölçüde varlığı tespit edilmiştir. Tüm örneklerin %17'sinde PLMVd, %42.6'sında HSVd ve 10 şeftali örneğinde her iki viroidin karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir. HSVd, "Vitulo" kayısı çeşidinde meyve yüzey deformasyonu ve çekirdeklerinde çukurlaşma şeklinde belirtiler, "Barracca" kayısı çeşidinin meyvelerinde yeşil beneklenmeler ve "Pellecchiella" kayısı çeşidinin meyvelerinde ise şiddetli yüzey deformasyonu ve çekirdeklerinde çukurlaşma şeklinde belirtilere neden olduğu

sergileyen tespit edilmiştir. Tüm kayısı örneklerinin %54.5'inin HSVd ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Pallás vd., (2003), sert çekirdekli meyvelerde viroid hastalıklarını tespit etmek için bir çalışma yürütmüşlerdir. İki viroidin sert çekirdekli meyveleri enfekte ettiğini ve bu etmenlerin HSVd ve PLMVd olduğunu belirtmişlerdir. PLMVd'nin Avrupa ve Asya ülkelerinde en çok şeftali, bazen de erik, kayısı ve kiraz ağaçlarını infekte ettiğini, HSVd'nin ise Akdeniz ülkelerinde birkaç sert çekirdekli meyve türünde (kayısı, şeftali, erik, badem) sıklıkla tespit edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca sert çekirdekli meyvelerde HSVd ve PLMVd etmenlerinin tespitinde doku baskı hibridizasyonu yönteminin başarılı bir şekilde uygulanacağını da belirtmişlerdir.

Randles., (2003), dünya çapında yaygın bir şekilde bulunan viroidlerin önemli ekonomik kayıplara neden olduklarını ve bu bitkilerden bazılarının armut, asma, avokado, domates, elma, hindistan cevizi, krizantem, patates, patlıcan, şeftali, şerbetçi otu ve turunçgil olduğunu belirtmişlerdir.

Fekih Hassen vd., (2004), viroidlerin bitkisel ürünlerde ekonomik kayıplara neden olabilen bitki patojenleri olduğunu belirtmişlerdir. Tunus'un kuzeyi ve Sahel bölgesindeki meyve bahçelerinden topladıkları örneklerde; armutta PBCVd (*Pear blister canker viroid*), şeftalide PLMVd ve farklı 3 bitki çeşidinde HSVd'nin varlığını test etmek için RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Test edilen 37 şeftali ağacından 12'sinin PLMVd ile bulaşık olduğunu, 72 armut ağacından 7'sinin, 37 şeftali ağacından 1'nin ve 11 badem ağacından 2'sinin ise HSVd ile bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca PLMVd'nin 330 bp büyüklüğünde DNA bantı verdiğini belirtmişlerdir.

Hassen vd., (2004), Çek Cumhuriyeti'nde PLMVd ve HSVd'nin varlığını tespit edebilmek için çeşitli meyve bahçelerinden yaprak, çiçek ve kabuk örnekleri toplayarak RT-PCR yöntemi ile testlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada farklı RNA ekstraksiyon metotları ve farklı zamanlarda alınan çeşitli bitki materyalleri kullanılmıştır. Viroidlerin tanı ve teşhisi için, RNA ekstraksiyonlarında kullanılacak yaprak örneklerinin en iyi alınma zamanının geç ilkbahar ve erken yaz olduğunu tespit etmişlerdir. Hem PLMVd hem de HSVd teşhisini kabuk doku örneklerinden

tespit edebilmenin ise kış boyunca mümkün olabileceğini fakat sonuçların her zaman güven verici olmadığını belirtmişlerdir.

Ragozzino vd., (2004), 8 farklı bitki türünü enfekte eden 7 viroidin (*Apple scar skin viroid*, *Apple dimple fruit viroid*, *Pear blister canker viroid*, *Hop stunt viroid*, *Chrysanthemum stunt viroid*, *Citrus exocortis viroid* ve *Peach latent mosaic viroid*) tespiti için tek tüplü RT-PCR yöntemi geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bu yöntemin etkinliğini artırmak için *Moloney-murine leukemia virus* (M-MLV) reverse transkriptaz ve HotStarTaq DNA polimeraz enzimleri kullanılmıştır. Bu yöntem ile viroid infekteli 56 bitki değerlendirilmiştir. Multipleks RT-PCR yöntemi, standart multipleks yöntemine göre daha az zaman gerektirmektedir. Çünkü bu yöntemde bütün adımların aynı tüp içerisinde eş zamanlı olarak gerçekleştiğini, dışarıdan bulaşma riskini ortadan kaldırdığını ve viroid tespiti için karantina ve sertifikasyon programlarında rutin olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir.

Fekih Hassen vd., (2005), Tunus'taki badem ağaçlarında PLMVd'nin varlığını RT-PCR yöntemi ile test etmişlerdir. Bu yöntem ile yaptıkları çalışmada 17 ağacın 2'sinde 337 bp büyüklüğünde PLMVd etmeni tespit ettiklerini ve elde ettikleri badem PLMVd izolatlarının diğer izolatlarla %94-98 benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hassen vd., (2005), Tunus'ta armut ve şeftali bahçelerindeki PLMVd'nin tanı ve tespitini hassas ve hızlı bir şekilde yaparak PLMVd etmenini tespit etmişlerdir. Çalışmada elde edilen izolat daha önce tespit edilen diğer izolatlar ile karşılaştırılmış ve analizleri yapılmıştır. Ayrıca yapılan bu çalışmada bitki özsuyunun seyreltilerek kullanılmasının etmenin tanınmasını daha da kolaylaştırdığını bildirmişlerdir.

Fekih Hassen vd., (2006), Tunus'ta farklı meyve ağaçlarında (şeftali, armut, badem ve elma) HSVd, ASSVd (*Apple skar scin viroid*), PBCVd (*Pear blister canker viroid*) ve PLMVd'nin varlığını RT-PCR yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Sahel ve Tunus'un kuzeyindeki meyve ağaçlarından odunsu doku veya yaprak örneklerini toplayarak RNA izolasyonunu yapmışlardır. Armut ağaçlarında PBCVd, HSVd ve PLMVd; badem ağaçlarında HSVd; şeftali ağaçlarında ise hem HSVd hem PLMVd tespit etmişlerdir. Ayrıca armut ağaçlarında tespit ettikleri viroidlerin karışık enfeksiyonlarının olduğunu da bildirmişlerdir.

Barba vd., (2007), şeftalide PLMVd etmeninin polenle taşınması hakkında bir çalışma yürütmüşlerdir. PLMVd'nin mekanik yolla, budama araçları ile, bazen de afidler tarafından taşınabildiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmayı da, PLMVd'nin yayılmasında polen, tohum ve köklerin rolünü araştırmak için yaptıklarını ifade etmişlerdir. İnfekteli ağaçların polenleri ile tozlanan 18 bitkinin 5'inin PLMVd ile infekteli olduğunu, PLMVd ile infekteli ağaçların tohumlarının da pozitif çıktığını ancak fidanların köklerinde hiçbir belirti göstermediğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre PLMVd'nin polen ile taşınabildiğini ancak infekteli şeftali ağaçlarının kökleri ve tohumları ile taşınamayacağını belirtmişlerdir.

Fekih Hassen vd., (2007), Tunus'un kuzeyindeki şeftali bahçelerinde 2 yıl boyunca yürüttükleri çalışmada PLMVd'nin varlığını araştırmışlardır. Yirmi iki farklı bahçeden (8 çeşit) rastgele 228 örnek toplamışlar ve PLMVd'nin varlığı için test etmişlerdir. Çalışmanın sonunda Tunus'un kuzeyindeki 4 bölgede PLMVd etmeninin olduğunu rapor etmişlerdir.

Maghraby vd., (2007), Mısır'daki sert çekirdekli meyve ağaçlarında virüs ve viroid etmenlerini belirlemek için survey çalışmaları yapmışlardır. PNRSV, PPV, PDV, ACLSV ve ApMV etmenleri için 716 örnek toplamış ve ELISA testi ile testlemişlerdir. En yoğun görülen virüsün PNRSV (%57) ve PPV (%41) olduğunu, PDV ve ACLSV'nin %3 oranında bulunduğunu, ApMV'nin ise bulunmadığını belirtmişlerdir. Doku baskı hibridizasyonu yöntemi ile test edilen 693 örneğin 101'inin ise (%15) ya PLMVd ya da HSVd ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Pallás vd., (2007), viroidlerin temiz üretim materyali kullanımı ve sanitasyon önlemleri dışında bir mücadelesinin olmamasının bu patojenler ile olan mücadeleyi zor kıldığını bildirmişlerdir.

Mandic vd., (2008), doku baskı hibridizasyon yöntemi ile HSVd ve PLMVd'nin varlığını tespit etmek için geniş çaplı bir çalışma yapmışlardır. Sırbistan'da yaptıkları survey çalışmasında 871 adet sert çekirdekli meyve ağacından örnek toplamış ve doku baskı hibridizasyonu ile test etmişlerdir. 185 şeftali ağacında PLMVd, 2 kayısı ağacında ise HSVd tespit ettiklerini bildirmişlerdir. HSVd'nin varlığının Sırbistan için yeni kayıt olduğunu ve erik, kiraz, vişne ve yabani *Prunus* spp.'de ise viroid bulunmadığını ifade etmişlerdir. 9 PLMVd ve 2 HSVd izolatlarının

sekans analizlerini yaptıklarını ve PLMVd izolatlarının daha önce rapor edilen izolatların bulunduğu grup 3’de kümелendiğini bildirmişlerdir.

Rouag vd., (2008), Cezayir’in doğusundaki sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki virüs ve viroid etmenlerini belirlemek için survey çalışmaları yapmışlardır. Virüs etmenleri için; şeftali, kayısı, badem, kiraz, vişne, erik ağaçlarından ve myrobalan anacından toplamda 454 örnek toplayarak ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile PNRSV, PDV, ApMV, ACLSV, *Apricot latent virus* (ApLV), *Cherry virüs A* (CVA), *Cherry green ring mottle virüs* (CGRMV) ve *Plum bark necrosis stem pitting-associated virüs* (PBNPaV) etmenleri için test etmişlerdir. Ortalama infeksiyon oranının %10.4 olarak tespit edildiğini ve en sık görülen virüsün PNRSV (%56.8) olduğunu, bunu %27.2 ile PDV, %22.7 ile ApMV’nin izlediğini bildirmişlerdir. Virüs ile en infekteli meyve türünün %21.9 ile kiraz ve en az infekteli meyve türünün ise %4.4 ile badem olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca ACLSV, ApLV, CVA, CGRMV ve PBNPaV etmenlerinin tespit edilmediğini de belirtmişlerdir. Viroid etmenlerini tespit etmek için ise 531 örnek toplanarak doku baskı hibridizasyon yöntemi ile test edilmiştir. 531 örneğin 28’inin (%5.2) viroidlerle infekteli olduğunu ve bunun da 15’inin PLMVd ile, 13’ünün ise HSVd ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmanın Cezayir’deki virüs ve viroid hastalıklarının araştırılması açısından ilk geniş kapsamlı bir çalışma olduğunu ve HSVd’nin ülke için ilk kayıt olduğunu belirtmişlerdir.

Dube vd., (2010), PLMVd’nin (+) ve (-) polaritelerindeki RNA iplikçiklerinin oluşturdukları farklı yapıları inceledikleri çalışmada, PLMVd’nin her iki polaritesindeki iplikçiklerin benzer ikincil yapılar oluşturduklarını bildirmişlerdir. Bu hipotezi doğrulamak için 3 biyofiziksel deneme ile her iki polaritedeki iplikçiğin davranışlarını gözlemlemişlerdir. (+) ve (-) polariteye sahip PLMVd transkriptlerinin, değişken termal denatürasyon profillerine sahip olduğu, lityum klorürün varlığında farklı bir şekilde çökelediğini ve doğal koşullar altında farklı elektroforetik hareketlilik özellikleri sergilediği ifade etmişlerdir. Daha sonra (-) polariteye sahip PLMVd transkriptinin yapısı biyokimyasal metotlarla değerlendirilmiş böylece (+) polaritenin bilinen yapısı ile kıyaslama yapılmıştır. (-) polaritenin ikincil yapısını çözmek için, enzimatik probing, elektroforetik hareketlilik denemeleri ve ribonükleaz H hidrolizi gibi uygulamalar yapılmıştır. Her iki

polaritenin iplikçiklerinin sol etki alanlarının benzer olduğu görünürken, sağ etki alanlarında birkaç farklılık gözlenmiştir. (+) iplikçikte oluşan P8 pseudoknotunun (-) polaritedeki iplikçikte oluşmadığı görülmüştür. İki polarite arasındaki yapısal farklılıkların PLMVd'nin yaşam döngüsünün farklı aşamalarında önemli etkileri olabileceğini belirtmişlerdir.

Dube vd., (2011), PLMVd'nin yapısal özelliklerini araştırdıkları çalışmada; bir viroid yapısının bilinmesinin oldukça önemli olduğunu ve viroidin yaşam döngüsündeki aşamalarda çeşitli RNA motiflerinin rol oynadığını belirtmişlerdir. Yeni bir yöntem olan SHAPE (RNA-selective 2'-hydroxyl acylation analysed by primer extension)'in çeşitli RNA moleküllerinin çalışmasında hızlı, güvenilir ve uygulanabilir olduğunu ve sonuç olarak bu yöntemin PLMVd'nin prob sekans varyantlarında kullanıldığını bildirmişlerdir.

Rubio vd., (2013), kayısı 'viruela' hastalığı ile virüs ve viroidlerin ilişkisini araştırdıkları çalışmada, 'viruela' semptomu gösteren ve İspanya çeşidi olan 'Bulida'nın dikildiği 34 kayısı bahçesinde 2 yıl boyunca çalışma yapmışlardır. Viruela semptomu gösteren ya da göstermeyen her bahçede 4 ağaçtan meyve ve yaprak örnekleri toplamış ve multiplaks RT-PCR ile analiz etmişlerdir. Buna ek olarak HSVd ve PLMVd etmenlerinin tespiti için moleküler hibridizasyon yöntemlerini uygulamışlardır. Tüm viruela semptomu gösteren meyvelerin HSVd ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Jevremovic ve Paunovic (2014), Sırbistan'ın 9 farklı bölgesindeki şeftali gen kaynaklarında PLMVd'nin varlığını araştırmak için survey çalışmaları yapmış ve 43 damızlıktan toplam 315 örnek toplayarak RT-PCR yöntemi ile test etmişlerdir. PLMVd'nin 7 farklı çeşit ve 1 anaca ait 13 örnekte tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. İnfekteli örneklerin 3 bölgeden 7 damızlıkta bulunduğunu ve şeftali damızlıklarının PLMVd etmeni ile düşük oranda bulaşık bulunduğunu belirtmişlerdir.

Jo vd., (2015), PLMVd'nin *Avsunviroidae* familyası *Pelamoviroid* cinsinin üyesi olduğunu ve şeftali ağaçlarını infekte ettiğini ifade etmişlerdir. Sanger sekanslaması ile 20 PLMVd genomunun sekans analizi yapıldıktan sonra, tek bir şeftali çeşidinde 18 izolat tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Fiore vd., (2016), Şili'deki sert çekirdekli meyve bahçelerinde önemli virüs ve viroid etmenlerini araştırmak için yaprak örnekleri toplayarak test etmişlerdir. Moleküler nonradyoaktif hibridizasyon testi sonucunda %25.7 PLMVd, %1.2 HSVd, %31.5 PNRSV, %31.3 PDV, %3.1 *Tomato ringspot virus* (ToRSV), %1.8 PPV, %1.1 ApMV, %0.9 ACLSV tespit ettiklerini ve genel infeksiyon oranının %29.6 olduğunu bildirmişlerdir. ApMV ve HSVd etmenlerinin ise sadece şeftali ve nektarinde yeni kayıt olduğunu belirtmişlerdir.

Lee vd., (2020), izotermal nükleik asit çoğaltma ve tespit etme metodu olan RT-RPA, şeftali yapraklarında ve polenlerinde PLMVd etmenini tespit etmek için geliştirilmiştir. RT-RPA metodunun 42 °C'de ve yaklaşık olarak 5 dk'da tamamlandığını ve diğer yaygın şeftali virüs etmenleri ile çapraz reaksiyon göstermediğini ortaya koymuştur. Yapılan bu çalışma RT-RPA'nın RT-PCR'dan 1000 kat daha hassas olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu metodun bahçeden toplanan örnekleri test etmek için de başarılı bir şekilde uygulandığı ifade edilmiştir. Şeftali polen ve yapraklarında PLMVd'nin tespiti için yeni geliştirilen RT-RPA yönteminin hızlı, hassas ve güvenilir bir metot olduğunu, karantina ve sertifikasyon programlarında etkili bir yöntem olarak faydalanılabileceğini bildirmişlerdir.

Karagahi ve Hajizadeh (2020), İran'ın batısında PLMVd'nin varlığını ve moleküler özelliklerini belirleyebilmek için 2016-2017 yılları yaz aylarında badem, kayısı, nektarin, şeftali, erik, vişne ve kiraz bahçelerinden toplamda 132 yaprak örneği toplamışlardır. RT-PCR yöntemi ile testledikleri 34 örnek 350 bp büyüklüğünde DNA bantı vermiştir. Klonlanan 17 izolatın tüm genom dizileri belirlenmiştir. Tespit edilen 17 izolatın tüm genom dizileri birbirleri ile %94.3-100 arasında nükleotid benzerlik gösterirken, daha önce rapor edilen PLMVd izolatları ile %79.2-100 arasında nükleotid benzerlik göstermiştir. Filogenetik analiz yapılarak bu çalışmadan elde edilen izolatlar ve daha önce rapor edilen 32 izolat farklı 2 grupta kümelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen tüm izolatlar grup 2 içerisinde yer almıştır. İran izolatlarının ikincil yapısı incelendiğinde, önceden rapor edilen izolatlar ile karşılaştırıldığında oldukça benzersiz bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile PLMVd'nin İran'da kayısı, kiraz, vişne ve nektarinde ilk kayıt olduğu belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Survey çalışmaları

Malatya, Elazığ ve Adıyaman ili ve ilçeleri badem ve ceviz üretim alanları çalışmanın survey alanını oluşturmuştur.

3.1.2. Bitkisel materyal

Survey çalışmalarının yapıldığı Malatya, Elazığ ve Adıyaman ili ve ilçelerinden toplanan badem yaprak örnekleri ve ceviz yaprak örnekleri çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur.

3.1.3. Laboratuvar materyali

Çalışmanın laboratuvar materyalini; RNA ekstraksiyon kiti, cDNA kiti, moleküler klonlama kiti, PCR amplifikasyon kiti, QIAprep Spin Minikrep Kiti, eppendorf tüpleri, PCR tüpleri, kuru blok ısıtıcı, santrifüj, vorteks, sarf malzemeler, thermocycler, homojenizatör, elektroforez tankı ve güç kaynağı, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, derin dondurucu, mikrodalga fırın ve kimyasal malzemeler oluşturmuştur.

3.1.4. RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyon çalışmalarında, Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinden toplanan badem ve ceviz yaprakları kullanılmıştır. Toplanan örnekler ekstraksiyon yapılıncaya kadar -86 °C'de saklanmıştır. Ekstraksiyondan sonra elde edilen RNA'lar ise -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.1.5. Tamamlayıcı (komplementer) DNA (cDNA) sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (Promega, Madison, WI, USA) firmasının cDNA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.6. RT-PCR çalışmaları

PCR için gerekli bileşenler Promega (Madison, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Nükleik asitlerin çoğaltılmasında Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler (Waltham, MA, USA) marka PCR cihazı kullanılmıştır.

3.1.7. PLMVd'ye spesifik primerler

Viroid etmeninin teşhisi için PLMVd'ye spesifik primer dizileri kullanılmış olup, çeşitli araştırmacıların kullandığı primerler baz alınmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. PLMVd'nin RT-PCR yöntemleri ile teşhisinde kullanılan primerler

Viroid	Primer	Primer dizisi	Baz uzunluğu (bp)	Referans
PLMVd	F-5'-3'	AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC	339	Loreti ve ark. (1999)
	R-5'-3'	CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG		

3.1.8. Elektroforez çalışmaları

Elde edilen PCR ürünü DNA molekülleri, Bio-Rad firmasına ait midi elektroforez aletinin kullanıldığı agaroz jel elektroforez çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.9. PCR ürünü DNA'nın görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünü DNA molekülleri boyama işleminden sonra Quantum Vilber Lourmat marka jel görüntüleme ve analiz siteminde görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.1.10. Moleküler klonlama

Moleküler klonlama çalışmalarında TA klonlama sistemine sahip, bünyesinde *Escherichia coli*'nin JM 109 suşunu barındıran pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Carlsbad, CA) kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA'ları agaroz jelden temizlemek için Thermo Scientific firmasının saflaştırma kiti (GeneJET Gel Extraction Kit) kullanılmıştır.

Transformasyon işlemi Mikropulser cihazı (BioRad, California, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Cihaza ait alüminyum plakalı 1 ml hacimli spesifik küvetler kullanılmıştır. Transformasyon sonrası plazmid aktarılan bakteriler FINEPCR marka (Finepcr, Korea) inkübatörlü sallayıcı platformda çoğaltılmıştır.

Rekombinant plazmidlerin bakteriden saflaştırılması işlemi Bio Basic firmasının Plasmid DNA Minipreps Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) yardımı ile yapılmıştır.

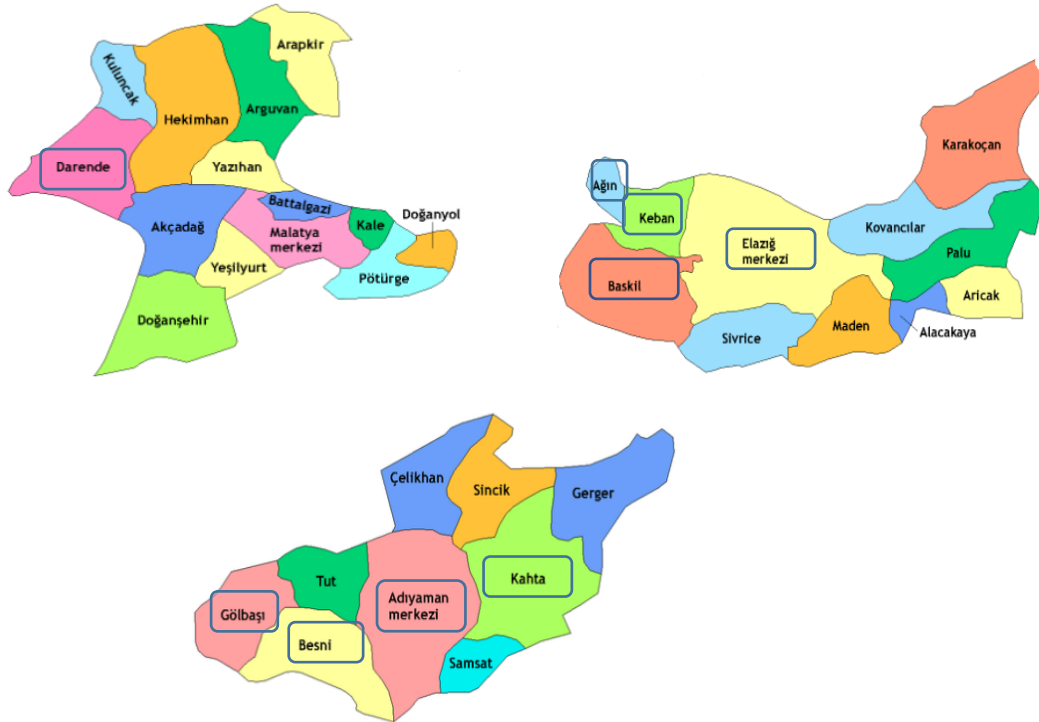
3.1.11. Moleküler karakterizasyon

Moleküler klonlama sonrası elde edilen viroid taşıyan rekombinant plazmidler üniversal T7 ve SP6 primerleri ile çift yönlü DNA dizilemeleri için BM Labosis (Ankara) firmasına gönderilmiştir. Dizileri tespit edilen izolatların moleküler karakterizasyonları CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler klonlama sonrası nükleotid dizileri belirlenen izolatların gen bankasına kayıtları (NCBI) yapılmıştır.

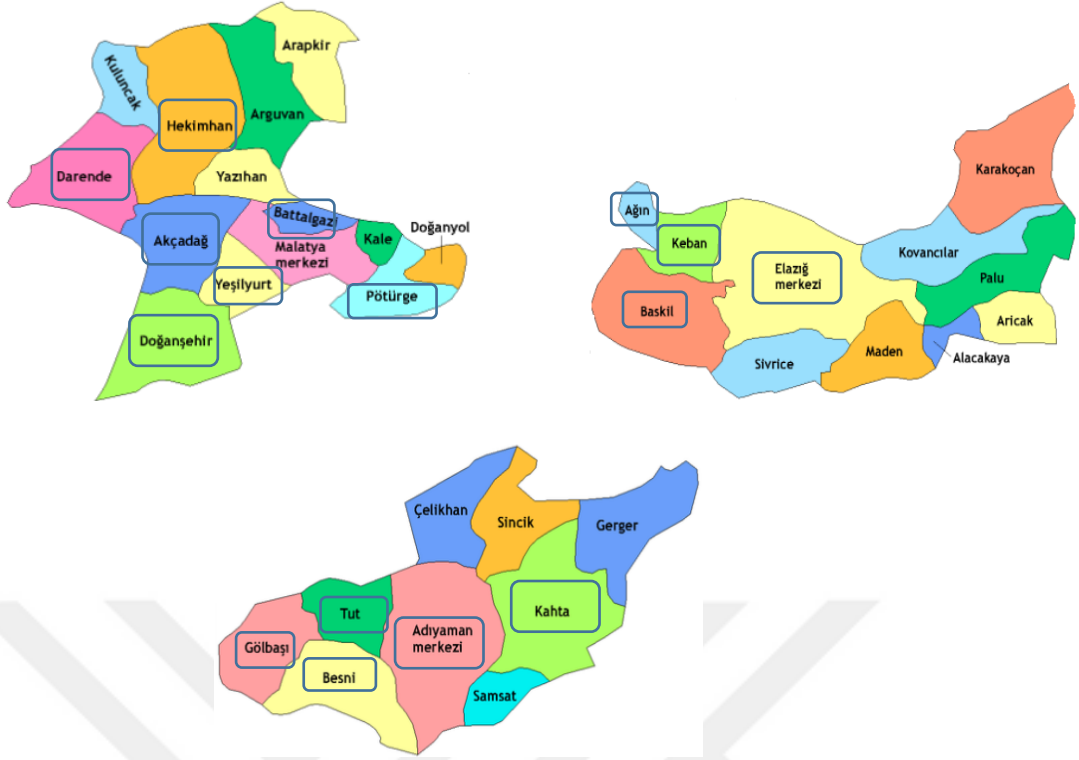
3.2. Metot

3.2.1. Survey çalışmaları

Survey çalışmaları ve örnekleme 2019 ve 2020 yılları Mayıs ve Haziran aylarında Malatya, Elazığ ve Adıyaman il ve ilçelerindeki ceviz ve badem bahçelerinde yürütülmüştür (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.1. Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinde badem survey çalışmalarının yapıldığı ilçeler



Şekil 3.2. Malatya, Elazığ ve Adıyaman illerinde ceviz survey çalışmalarının yapıldığı ilçeler

Surveyin gerçekleştirildiği il ve ilçelerdeki bahçelerde yetiştirilen çeşitlerin yanısıra doğada kendiliğinden yetişen ve doğal yayılış gösteren yabancı badem ve cevizden de örnekler alınmıştır (Şekil 3.3, Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Survey gerçekleştirilen badem bahçeleri ve örnekleme yapılan badem ağaçlarından bazı görüntüler



Şekil 3.3. (devam)



Şekil 3.4. Survey gerçekleştirilen ceviz bahçeleri ve örnekleme yapılan ceviz ağaçlarından bazı görüntüler



Şekil 3.4. (devam)

Örnekleme survey alanında yer alan toplam 530 bitkiden bulunduğu bahçeyi temsil edecek biçimde simptom gösteren ve göstermeyen ağaçlardan yaprak örneği alınarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2). Ağaçlardan alınan yaprak örnekleri ayrı ayrı polietilen torbalara konularak numaralandırılmış ve soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Total RNA ekstraksiyonları yapıncaya kadar $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Malatya, Elazığ ve Adıyaman ili ve ilçelerinden alınan örnek sayısı

İl	İlçe	Alınan Örnek Sayıları	
		Badem	Ceviz
Malatya	Darende	10	10
	Doğanşehir	0	10
	Yeşilyurt	0	10
	Battalgazi	0	10
	Akçadağ	0	10
	Hekimhan	0	10
	Pütürge	0	20
Elazığ	Merkez	10	40
	Baskil	10	25
	Ağın	15	10
	Keban	15	25
Adıyaman	Merkez	30	10
	Besni	50	20
	Gölbaşı	30	40
	Kahta	80	20
	Tut	0	10
TOPLAM		250	280

3.2.2. Moleküler çalışmalar

3.2.2.1. RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu ticari bir kit (GeneJet Plant RNA Purification Kit, Thermo Scientific) yardımı ile yürütülerek firmanın bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre;

- Polietilen poşet içerisine 100 mg bitki dokusu üzerine 500 µl lysis buffer eklenerek homojenize edilmiş ve homojenat eppendorf tüpe alınmıştır.
- Tüpler 3 dk 56 °C'de inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- Üstte kalan sıvı alınarak yeni eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Üzerlerine 250 µl %96'lık etanol eklenmiş ve pipetleyerek karıştırılmıştır.
- Hazırlanan karışım kitle verilen saflaştırma kolonuna transfer edilmiştir. 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmış ve alttaki sıvı atılmıştır.
- Saflaştırma kolonuna 700 µl yıkama çözeltisi 1 eklenerek 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek ilk yıkama yapılmıştır. Alttaki sıvı toplama tüpü ile birlikte atılmıştır. Saflaştırma kolonu 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- İkinci yıkama için saflaştırma kolonuna 500 µl yıkama çözeltisi 2 eklenerek 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Alttaki sıvı atılmıştır.
- Kolonda kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için bir önceki adım tekrarlanarak 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Sıvı içeren toplama tüpleri atılmış ve saflaştırma kolonundaki filtreli parça 1.5 ml'lik RNase-free toplama tüpüne transfer edilmiştir.
- RNA'yı sulandırmak için 50 µl nükleaz-free su eklenmiş ve 11.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Saflaştırılmış RNA kullanılıncaya kadar -20 C'de saklanmıştır.

3.2.2.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

RNA ekstraksiyonundan sonra, RNA genomuna sahip PLMVd'nin tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya dönüştürülmesi için steril bir mikrosantrifuj tüp içerisine aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

- 1 µl 20 pmol/ml random primer,
- 2 µl total RNA,
- 1 µl 10mM dNTP,
- 8 µl RNase free su

Karışım vortekslenmiş ve tüpün kenarlarındaki damlaları tüpün dibine indirmek için 4000–5000 rpm'de kısa bir dönü yapılarak, 5 dakika 65 °C'de PCR cihazında inkübe edildikten sonra buza daldırılarak hızla soğutulmuştur. Daha sonra buz üzerinde aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

- 4 µl 5X RT Reaksiyon çözeltisi,
- 2 µl 0.1M DTT,
- 1 µl reverse transcriptase enzimi

Ardından tüpler vortekslenmiş ve PCR cihazında 42 °C'de 50 dakika inkübe edilerek transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için inkübasyon sonrası tüpler, PCR cihazında 70 °C'de 15 dakika tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır. Kullanıma hazır olan cDNA'lar PCR işlemi yapılınca kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.3. RT-PCR çalışmaları

PLMVd'nin teşhisi için kullanılan primerler farklı araştırmacıların önceki çalışmalarında kullanılmış ve yayınlanmış primerlerden seçilmiştir (Çizelge 3.5). Viroidin spesifik teşhisinin daha güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için, PLMVd'ye özgü primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR yöntemi ile PLMVd'in teşhisinin yapılması için; steril bir PCR tüpü içerisine aşağıdaki bileşenler konulmuştur.

- 36.6 µl RNase free su,
- 5 µl 10X PCR buffer,
- 3 µl 25mM MgCl₂,

- 1 µl 10mM dNTP,
- 1 µl 20mM F-primer,
- 1 µl 20mM R-primer,
- 0.4 µl Taq DNA polimeraz enzimi (5U/ml)

Karışım üzerine kalıp DNA olarak 2 µl cDNA konularak toplam hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler vorteks cihazında çok kısa bir süre ile karıştırıldıktan sonra santrifüjde hafif bir dönü yapılarak damlacıkların tüplerin dibine inmesi sağlanmıştır. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve PLMVd için aşağıdaki döngü ve sıcaklık aralıkları uygulanarak tüm genomunun çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. PLMVd'nin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmasında uygulanan sıcaklık aralıkları, süre ve döngü sayıları

Viroid	Uygulanan Sıcaklık Aralıkları-Süreleri-Döngü sayıları		
PLMVd	<u>1 döngü</u> 94 °C 2 dk	<u>35 döngü</u> 94 °C 1 dk 58 °C 2 dk 72 °C 1 dk	<u>1 döngü</u> 72 °C 10 dk

3.2.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi, DNA'yı boyama ve görüntüleme

RT-PCR sonucu elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Buna göre 2 gr agaroz (Prona Biomax), 100 ml 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde mikrodalga fırında çözündürülmüş ve jel tepsisine dökülerek yaklaşık 30 dk jelin katılaşması için beklenilmiştir. Katılaştıran jel elektroforez tankına konularak jelin çukurlarına DNA marker, PCR ürünleri, pozitif kontrol ve su kontrol yüklenmiş ve 85 Volt'luk elektrik akımında 50 dk süreyle koşulmuştur. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.2.2.5. Viroid izolatlarının moleküler karakterizasyonu

Survey çalışmalarının yapıldığı Malatya, Elazığ ve Adıyaman il ve ilçelerinden toplanan badem ve ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR sonucu tespit edilen Keban (K1) ve Hekimhan (H1, H2 ve H3) izolatlarının tüm genomları pGEM-T Easy vektörde klonlanmıştır. Klonlamanın ardından purifiye edilen DNA'lar çift yönlü DNA dizilemesi için BM Labosis firmasına gönderilmiştir. Dizileri tespit edilen izolatların moleküler karakterizasyonları ve gen bankasına kayıtları (NCBI) yapılmıştır.

3.2.2.5.1. Moleküler klonlama

İzolatların tüm genom karakterizasyonu için Keban K1 izolatı ile Hekimhan ilçesinde tespit edilen izolatlar rastgele seçilmiş ve H1, H2 ve H3 olarak isimlendirilmişlerdir. Tüm genomu çoğaltan spesifik primerler kullanarak RT-PCR yöntemi ile tüm genom çoğaltılmış ve pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmıştır.

3.2.2.5.1.1. Katı LB ve sıvı LB ortamların hazırlanması

Katı LB ortamı (500 ml)

- 5 g Bacto tryptone
- 2.5 g Bacto yeast extract
- 2.5 g NaCl (sodyum chloride)
- 7.5 g agar

Yukarıdaki bileşenler şişeye konularak üzerine 500 ml saf su eklenmiştir ve otoklava konularak sterilize edilmiştir.

Sıvı LB ortamı (500 ml)

- 5 g Bacto tryptone
- 2.5 g Bacto yeast extract

Yukarıdaki bileşenler 250 ml'lik iki ayrı şişeye konularak üzerine 250 ml saf su eklenmiştir (toplamda 500 ml) otoklava konularak sterilize edilmiştir. Otoklav bittikten sonra katı LB ortamı için steril kabinde toplamda 16 adet petriye yaklaşık 20 ml döküm yapılarak petriyer hazırlanmıştır. Petriyerin alt tarafına tarih, LB, Ampicillin, X-GAL, IPTG varlığı gibi bilgiler yazılmıştır. Sadece katı LB' nin

olduğu petrilere LB+tarif, içinde antibiyotik olan petrilere LB+tarif+Amp.+X-GAL+IPTG yazılmıştır.

İlk olarak sadece katı LB olacak petrilere (LB+tarif) yüzeyi kaplayacak şekilde (yaklaşık 20 ml) dökülmüştür (Şekil 3.5). Daha sonra geri kalan katı LB' ye ampisilin, X-GAL ve IPTG eklenmiş ve LB+tarif+Amp.+X-GAL+IPTG yazılı olan petrilere dökülmüştür. Katılaşması için ertesi güne kadar steril kabinde bekletilmiş ve petrilere katılan LB ortamları ters çevrilerek buzdolabında 1 ay süre ile saklanmıştır (Şekil 3.5).

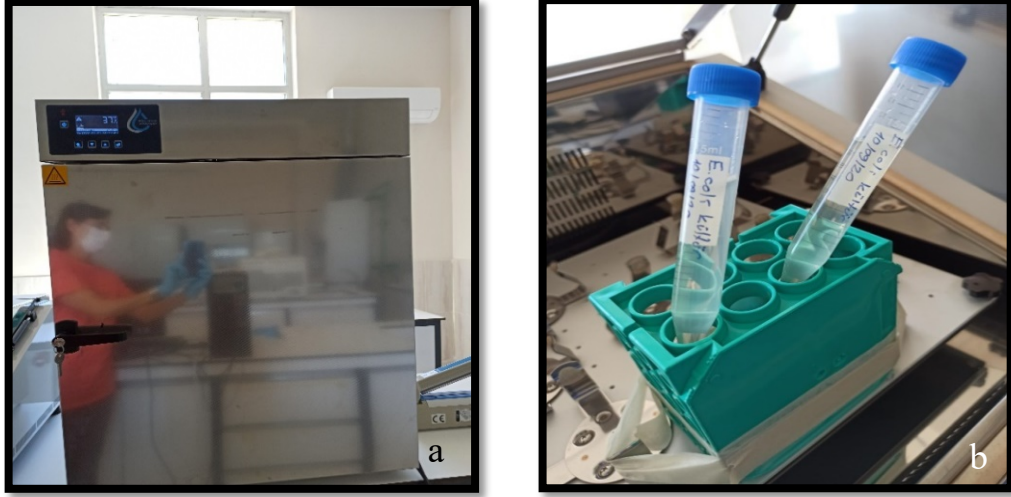


Şekil 3.5. Katı LB ortamının petrilere dökülmesi (a) ve katılaşmaya bırakılması (b)

3.2.2.5.1.2. Bakterinin çoğaltılması

Bir gün önceden katılaşması için steril kabinde beklettiğimiz petrilere -80 °C'de bulunan *Escherichia coli* JM 109 suşu alınarak sadece katı LB (LB+tarif) olan petrilere drigaski çubuğu yardımı ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere ters çevrilerek 37 °C'de inkübatöre yerleştirilerek bir gece bekletilmiştir.

İnkübatörden çıkarılan petrilereki bakteriden tek koloni alınarak 10 ml'lik sıvı LB ortamına ekilmiş ve 250 rpm'de 37 °C'de bir gece sallayıcı platforma konularak çoğalmaya bırakılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İnkübatör (a) ve bakterinin çoğalması için sallayıcı platforma (b) konulan falcon tüpleri

3.2.2.5.1.3. Bakterilerin purifikasyonu

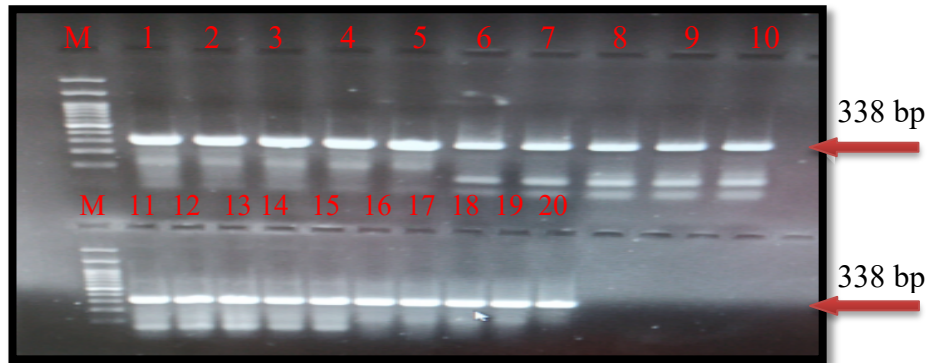
250 rpm'de 37 °C'de bir gece sallayıcıya konularak çoğalmaya bırakılan bakteri kültürü, sallayıcıdan alınarak çoğalmanın durması için buz üzerine konulmuştur. Bakteri kültürü büyük falcon tüplere konulmuş ve üzerlerine 40 ml'ye kadar sıvı LB eklenerek dengelenmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplerdeki supernatant atılmış ve buzda bekletilen soğuk steril saf sudan yaklaşık 10 ml eklenerek vorteklenmiştir. Tekrar dengeleme yapıldıktan sonra 6000 rpm'de 15 dk tekrar santrifüj yapılmış ve supernatant atılmıştır (Şekil 3.7). Daha sonra tüplere 3 ml %10'luk gliserol eklenerek vortekslenmiştir. Elde edilen süspansiyon 100 µl olacak şekilde yaklaşık 30 tane eppendorf tüpüne aktarılmış ve -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.7. Santrifüj (a) ve bakteri pelletleri (b)

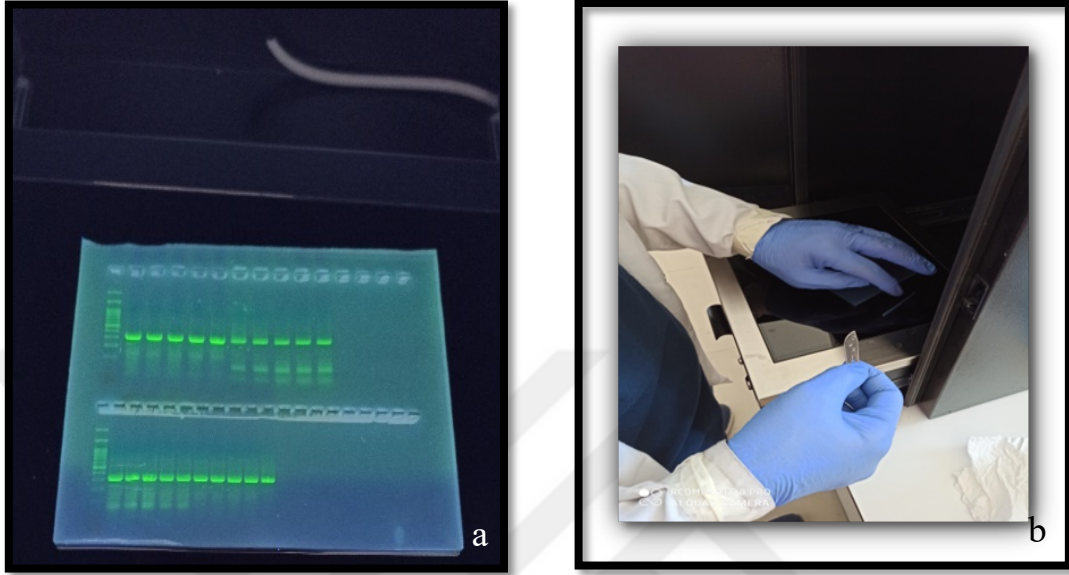
3.2.2.5.1.4. Plazmidde aktarılabak (insert) DNA'nın hazırlanması

Plazmidde aktarılabak DNA, PCR yöntemi ile 50 µl toplam hacimde çoğaltılarak %2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Buna göre 2 gr agaroz, 100 ml 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde mikrodalga fırında çözüldürülmüş ve jel tepsisine dökülerek yaklaşık 30 dk jelin katılaşması için beklenilmiştir. Katılaşan jelin çukurlarına DNA marker ve PCR ürünlerinin [(Keban 2-K1), (Hekimhan 1-H1), (Hekimhan 2-H2), (Hekimhan 3-H3)] tamamı kullanılacak şekilde yan yana jele yüklenmiş (Şekil 3.8) ve 85 Volt'luk elektrik akımında 50 dakika süreyle koşulmuştur.



Şekil 3.8. Elektroforeze yüklenen PCR ürünlerinin görüntüsü (M: Marker (100-10000 bp), 1-5: K1 izolatının PCR ürünü, 6-10: H1 izolatının PCR ürünü, 11-15: H2 izolatının PCR ürünü, 16-20: H3 izolatının PCR ürünü)

PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş (Şekil 3.8) ve UV altında steril bir bistüri yardımıyla kesilerek eppendorf tüplere konulmuştur (Şekil 3.9). Purifiye edilinceye kadar -20 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.9. UV altında jel görüntüleme (a) ve DNA'nın kesilmesi (b)

3.2.2.5.1.5. DNA'nın agaroz jelden saflaştırılması

Purifikasyon işlemi ticari kit (Thermo Scientific-GeneJET Gel Extraction Kit) yardımı ile kitin önerdiği protokole göre yapılmıştır. Buna göre;

- Daha önceden UV altında bistüri yardımıyla kesilerek eppendorf tüplerine konulan jellere (K1, H1, H2, H3) 1:1 hacminde binding buffer eklenmiştir.
- Tüplerdeki jel tamamen çözülene kadar 50-60 °C’de 10 dk kuru blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Çözünmenin yavaş olduğu durumda inkübasyon süresi uzatılmıştır.
- Jel tamamen çözüldükten sonra her bir tüpten 800 µl alınarak purifikasyon kolonuna aktarılmış ve 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüjden sonra alttaki sıvı atılmış ve kolonlara 700 µl yıkama çözeltisi eklenerek santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüjden sonra tekrar alttaki sıvı atılmış ve yıkama çözeltisi içerisindeki ethanolün tamamen uzaklaşması için boş olarak 1 dk santrifüj yapılmıştır.

- Kolondaki filtreli kısım 1.5 ml'lik temiz eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Filtreli kısma 50 µl elution buffer eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Saflaştırılan DNA kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

A Tailing (Adenin kuyruklaması)

Purifikasyondan sonra PCR ürünlerinin uç kısımlarına dATP eklemesi yapılmıştır. Bu amaçla steril bir PCR tüpü içerisine:

- 25 µl PCR ürünü,
- 3 µl dATP,
- 6 µl 5X buffer,
- 1.5 µl MgCl₂,
- 0.5 µl Taq DNA polimeraz enzimi ilave edilmiştir.

Yukarıdaki bileşenler 70 °C'de 1 saat ve işlem sonrası karışımı soğutması için 4 °C'de sonsuz olacak şekilde programlanarak PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR işleminden sonra PCR Purification Kiti (Jena Bioscience) ile firmanın önerdiği protokole göre saflaştırma işlemi yapılmıştır. Buna göre;

- Örnek sayımız (K1, H1, H2, H3) kadar eppendorf tüpüne 100 µl activation buffer ekleyerek 10.000 g'de 30 sn santrifüj yapılmıştır.
- Daha sonra her bir eppendorf tüpüne 3 hacim (108 µl) binding buffer ve 2 hacim (72 µl) isopropanol ve PCR ürünü (36 µl) eklenmiştir.
- Karışım kitle sağlanan kolonlara transfer edilerek 10.000 g'de 30 sn santrifüj yapılmış ve alttaki sıvı atılmıştır.
- Kolona 700 µl yıkama çözeltisi eklenmiş ve 10.000 g'de 30 sn santrifüj yapılmıştır.
- Alttaki toplama tüpü atılarak filtreli kısım 1.5 ml'lik temiz eppendorf tüpüne transfer edilmiştir.
- Filtreli kısma 30 µl elution buffer eklenerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- DNA elution buffer içerisinde tüpe geçmesini sağlamak için 10.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

3.2.2.5.1.6. DNA'nın plazmide yerleştirilmesi (ligasyon)

DNA ligase enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işleminde Promega firmasının pGEM-T Easy vector sistemi kullanılmıştır. Buna göre steril bir PCR tüpü içerisine;

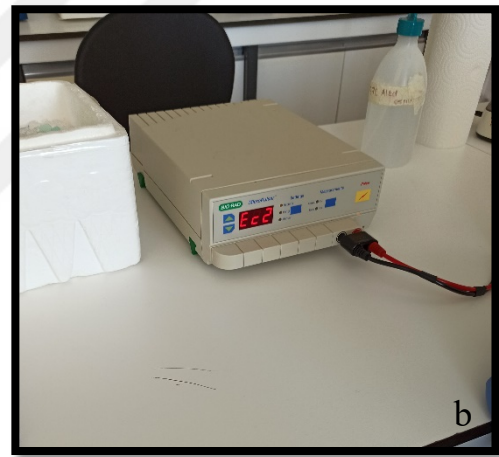
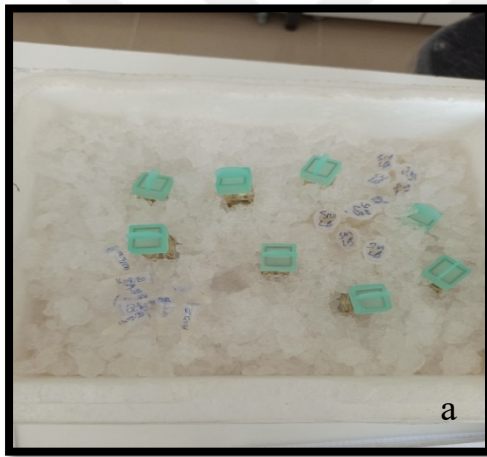
- 5 µl Rapid ligation buffer,
- 1 µl pGEM-T Easy vector,
- 2 µl purifiye DNA,
- 1 µl T4 DNA ligase enzimi,
- 1 µl RNase free su konularak son hacim 10 µl olacak şekilde 1 gece 4 °C'de inkübasyona bırakılmış ve rekombinant plazmidlerin oluşması sağlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.5.1.7. Plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon)

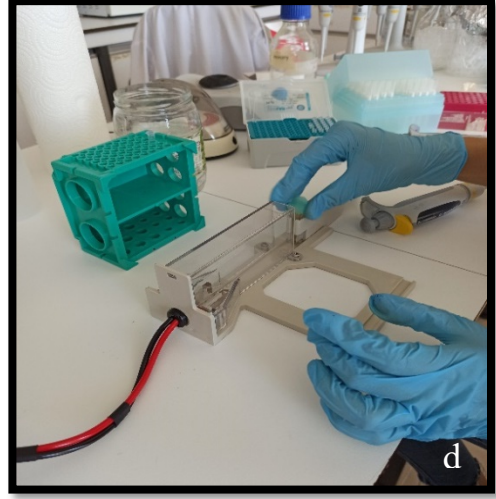
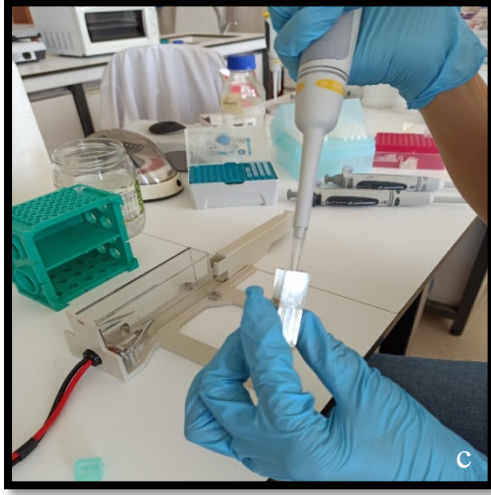
Rekombinant plazmidler, kitle sağlanan bakteri hücrelerine (kompetan hücreler) (*Escherichia coli* JM109 suşu) elektroşok uygulaması ile transfer edilmiştir. Elektrik akımı uygulaması Micropulser cihazı (BioRad) EC2 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spesifik kuvvetler kullanılmadan önce steril saf su ile yıkanmıştır. Bu amaçla;

- Daha önce hazırlanan ampicillin, X-GAL ve IPTG içeren katı LB ortamlı petriyelerden her izolat için 2 petri (toplamda 8 petri) alınmış ve ısınmaları için 37 °C'de inkübatöre konulmuştur.
- Toplam örnek sayısı (8 adet) kadar eppendorf tüpüne 900 µl sıvı LB (SOC solüsyonu) konulmuştur.
- Bir gece bekletilen rekombinant plazmidlerden 5 µl alınarak *E. coli* JM109 bakterilerinin olduğu PCR tüpüne konulmuştur. Bu karışım pipetlenmiş ve 110 µl alınarak spesifik kuvete konularak micropulser cihazı ile EC2 programı ile bakterilere 1-2 sn süre ile elektrik akımı uygulanmıştır.
- Şok işleminden sonra 900 µl sıvı LB (SOC solüsyonu) kuvetin içine boşaltılmış ve pipetle köpürtülmeden karıştırılmıştır.

- Daha sonra bu karışım küçük falcon tüplere yerleştirilmiş ve 1 saat 37 °C'de yaklaşık 250 rpm'de inkübe edilmiştir. Böylece rekombinant plazmid aktarılmış bakterilerin yaşamaları sağlanmıştır.
- İnkübatörden alınan bakteri süspansiyonu yeni eppendorf tüplerine transfer edilmiş ve 6000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı atılmıştır. Dipte kalan pellet vorteklenmiş ve steril kabine geçilmiştir.
- İnkübatörden çıkardığımız antibiyotik içeren katı LB'lere 40 µl bakteri süspansiyonundan ekilerek drigaski çubuğu ile petri yüzeyini kaplayacak şekilde yayılmıştır.
- Ekimden sonra katı LB petrileri ters çevrilerek inkübatöre konulmuş ve 37 °C'de 1 gece bekletilmiştir.



Şekil 3.10. Plazmidin bakteriye aktarılması (transformasyon) (a) rekombinant plazmid, spesifik küvetler ve SOC solüsyonlarının buzda tutulması, (b) mikropulser cihazı, (c) rekombinant plazmid ve bakterilerin olduğu karışımın spesifik küvete aktarılması, (d) şok verme işlemi, (e) SOC solüsyonunun spesifik küvete aktarılması pipetlenmesi, (f) karışımın falcon tüpe aktarılması



Şekil 3.10. (devam)

3.2.2.5.1.8. Plazmid aktarılmış bakterilerden kültür oluşturma

Bu çalışma kontaminasyonu önlemek bakımından steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Steril tek kullanımlık 15 ml'lik tüplere (K1, H1, H2, H3) antibiyotik içeren sıvı LB ortamı konulmuş ve steril bir pipet ucu yardımı ile beyaz koloniler seçilerek bu tüplerin içerisine bırakılarak ekim yapılmıştır. Ekimden sonra tüplerin kapakları kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış sallayıcı platform üzerinde 1 gece inkübe edilmiştir.

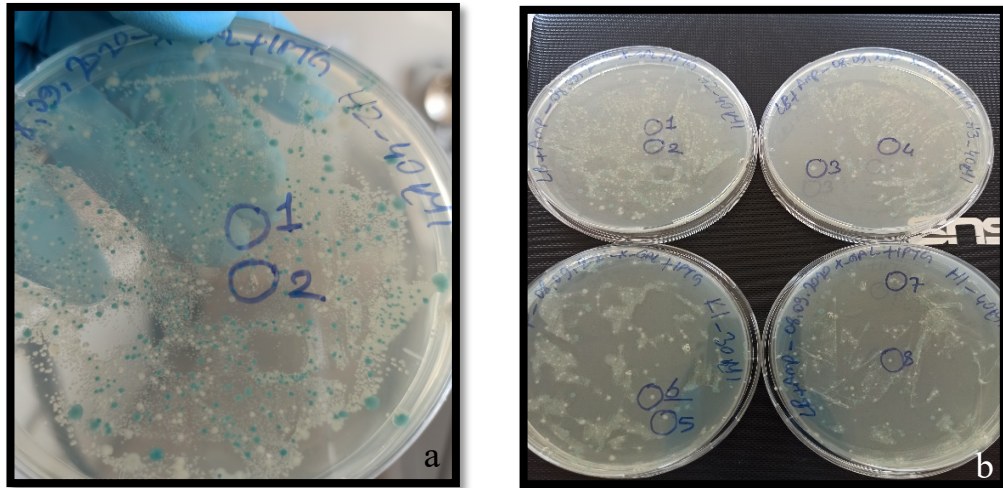
Transforme olmuş bakterinin bünyesinde ampisiline dayanıklılık geni bulunmadığından, transformasyon işleminden sonra, ampisilin içeren besi ortamına

ekilen bakterilerden sadece bünyesine plazmid alanlar canlılığını koruyacaklardır. Bunun nedeni ampisiline dayanıklılık geninin sadece pGEM-T Easy vektör plazmidini üzerinde bulunmasıdır.

Bu koşullarda ampisilin içeren katı besi ortamında “plazmid+PCR ürünü DNA içeren bakteriler” ve bünyesine sadece “sirküle olmuş plazmid alan bakteriler” olmak üzere farklı iki bakteri gelişecektir. Bunlardan “plazmid+PCR ürünü DNA içeren bakteriler” beyaz renkli koloni, “sirküle olmuş plazmid alan bakteriler” ise mavi renkli koloni oluşturmaktadır.

3.2.2.5.1.9. Plazmidin DNA fragmenti taşıyıp taşımadığının koloni PCR ile kontrol edilmesi

Amp.+X-GAL+IPTG içeren katı LB petriplerde gelişen beyaz renkli kolonilerin rekombinant plazmidleri içerip içermediği koloni PCR yapılarak belirlenmiştir. Bunun için inkübatörden antibiyotik içeren katı LB’ler alınarak her petriden 2 koloni olacak şekilde tek beyaz koloniler işaretlenerek numara verilmiştir (Şekil 3.11). Steril bir pipet ucu ile tek beyaz koloninin ortasına dokundurularak cDNA olarak PCR tüpü içindeki karışıma karıştırılmıştır.



Şekil 3.11. Transformasyon sonrası gelişen mavi-beyaz koloniler (a) ve beyaz kolonilerin işaretlenerek seçilmesi (b)

Koloni PCR için steril bir PCR tüpü içerisine:

- 36.6 µl RNase free su,

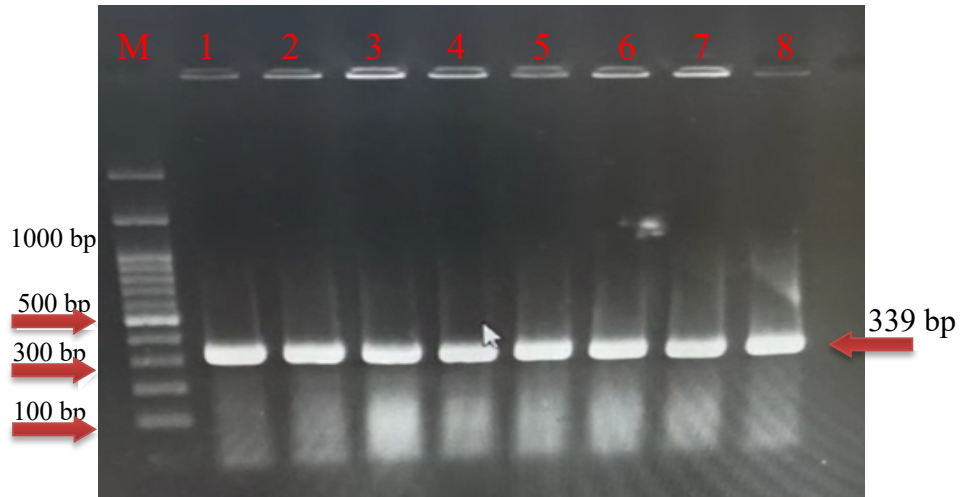
- 5 µl 10X PCR Buffer,
- 3 µl 25mM MgCl²,
- 1 µl 10mM dNTP,
- 1 µl 20mM F-primer,
- 1 µl 20mM R-primer,
- 0.4 µl Taq DNA polimeraz enzimi konulmuştur.

PCR tüpleri vortekslenip kısa bir dönü yapıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırılmıştır.

94 °C 2 dk
 94 °C 1 dk
 58 °C 2 dk
 72 °C 1 dk
 72 °C 10 dk

35 döngü

Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elektroforez yapılarak, PCR ürünleri (K1, H1, H2, H3) jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Elektroforez sonucunda, beklenen büyüklükte (yaklaşık 339 bp) amplifikasyon ürünü olduğundan klonlama işlemi gerçekleşmiş sayılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Koloni PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünü, M: Marker (100-10000 bp), 1-2: K1 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 3-4:H1 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 5-6: H2 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü, 7-8: H3 izolatını taşıyan bakteri kolonilerine yapılan PCR ürünü

3.2.2.5.1.10. Rekombinant plazmidlerin saflaştırılması

Rekombinant plazmidlerin saflaştırılması ticari kit ile (Bio Basic-Plasmid DNA Minipreps Kit) kitin satın alındığı firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. Buna göre;

- 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine bir gece bekletilerek çoğaltılan bakteriler süspansiyonundan konularak 12000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Böylece bakterilerin çökmesi sağlanmıştır.
- Pellete 100 µl Solution I eklenerek vortekslenmiştir.
- Daha sonra karışımın üzerine 1 µl visually lyse eklenmiştir.
- Karışıma 200 µl Solution II eklenmiş ve 4-6 kez ters yüz edilmiştir (bu aşamada solüsyonun rengi maviye dönmüştür). Oda sıcaklığında 1 dk tutulmuştur.
- Tüplere 350 µl Solution III eklenmiş ve ters yüz edilerek karıştırılmıştır (bu aşamada solüsyonun rengi tekrar beyaza dönmüştür). Oda sıcaklığında 1 dk tutulmuştur.
- Tüpler 12000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüjden sonra tüplerin üstündeki sıvı kitle sağlanan kolona transfer edilerek 10000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Altta kalan sıvı atılmış ve kolona 750 µl yıkama çözültisi eklenmiş ve yıkama gerçekleştirilmiştir. 10000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Bir üstteki adım tekrarlanarak alttaki sıvı tekrar atılmış ve 750 µl yıkama çözültisi tekrar eklenerek ikinci bir yıkama gerçekleştirilmiştir. Tekrar 10000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Toplama tüpündeki sıvı atılmış ve yıkama çözültisi içerisindeki etanolü tamamen uzaklaştırmak için tekrar 10000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Kolonlardaki filtreli kısım temiz 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine transfer edilerek filtreli kısmın ortasına 50 µl Elution buffer eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Purifiye edilen rekombinant plazmid DNA'sı universal primerler yardımı ile DNA dizilemesi için ilgili firmaya gönderilmiştir.

3.2.2.5.2. Moleküler klonlama sonrası purifiye edilen DNA'ların dizi analizi ve filogenetik analiz

Klonlama sonrası elde edilen rekombinant plazmidler çift yönlü DNA dizilemesi için BM Labosis firmasına gönderilmiştir. 50 µl plazmid DNA'sının bir kısmı DNA dizileme için gönderilmiş ve geriye kalan kısmı ise sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Gönderilen her izolat promoter bölgelerine spesifik universal primeriyle (T7 ve SP6) çift yönlü dizileme yaptırılmıştır. DNA dizilemelerindeki okuma hatalarını en aza indirmek için çift yönlü dizileme yaptırılmıştır.

Dizi analizi sonrası elde edilen viroid izolatlarına ait genom bilgileri CLC Main Workbench programı ile analiz edilmiştir. CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile cevizde tespit edilen PLMVd nükleotid dizileri ile dünya ve ülkemizde tespit edilen PLMVd'ye ait nükleotid dizileri karşılaştırılarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve çoklu dizi karşılaştırmaları yapılmıştır. Nükleotid dizi karşılaştırmaları sonucu PLMVd ceviz izolatları ile diğer dünya izolatları arasındaki benzerlikler ve farklılıklar belirlenmiştir. PLMVd ceviz izolatlarının ikincil yapıları, tüm genom dizileri kullanılarak CLC Main Workbench 20.0.4 programının mfold structure prediction package (CLC bio, Denmark) özelliği kullanılarak belirlenmiştir. Filogenetik analizlerin yapılması ve DNA dizilemesi sonrasında klonlanan bölgenin Gen Bankasında araştırılması BLAST programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.5.3. DNA dizilerinin gen bankasına girilmesi [National Center for Biotechnology Information (NCBI)]

Ceviz bitkisinde tespit edilen PLMVd izolatlarının (K1, H1, H2, H3) tüm genomuna ait nükleotid dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na kaydedilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Badem survey çalışmaları Malatya (Darende), Elazığ (Merkez, Baskil, Ağın, Keban) ve Adıyaman (Merkez, Kahta, Besni, Gölbaşı) il ve ilçelerinde, ceviz survey çalışmaları Malatya (Yeşilyurt, Battalgazi, Darende, Pütürge, Akçadağ, Hekimhan, Yazıhan), Elazığ (Merkez, Baskil, Ağın, Keban) ve Adıyaman (Merkez, Kahta, Besni, Gölbaşı, Tut) il ve ilçelerinde 2019 ve 2020 yılları Mayıs-Haziran aylarında yapılmış olup, badem ve ceviz alanlarında PLMVd'nin varlığının tespit edilmesi amacıyla simptom gösteren ve göstermeyen 530 bitkiden rastgele yaprak örneği toplanmıştır. Hassen vd. (2004) yaptıkları çalışmada, viroidlerin tanı ve teşhisi için, RNA ekstraksiyonlarında kullanılacak yaprak örneklerinin en iyi alınma zamanının geç ilkbahar ve erken yaz olduğunu bildirmişlerdir. Salem vd. (2003) bademde sağlıklı ve hastalıklı bitkiyi ayırt etmek için en güvenilir organların genç yapraklar olduğunu belirtmişlerdir.

Survey çalışmamızı oluşturan illere baktığımızda badem yetiştiriciliğinin daha çok eğimli, toprak yapısı taşlı ve kireçli olan alanlarda yapıldığı görülürken, ceviz yetiştiriciliğinin ise hemen hemen her koşulda yetiştiği görülmektedir. Bölgede daha çok tarla kenarlarında sınır ya da çit bitkisi olarak yetiştirilen ve dağınık halde olan badem ve ceviz yetiştiriciliği kültürü yaygın olup, ev bahçelerinde tek ağaç olarak bulunduğu da görülmektedir. Özellikle son yıllarda orman vasfını yitirmiş alanlarda Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından organize edilen kapama bahçeler oluşturulmaya başlanmıştır. Modern tesislerle kurulan bu kapama bahçeleri bademde özellikle çöğür üzerine aşılı olup, bunun büyük çoğunluğunu “Ferragnes”, “Ferraduel” çeşitleri oluştururken; az sayıdaki bazı bahçelerde ise “Teksas” ve “Nonpareil” çeşitleri oluşturmaktadır. Kapama ceviz bahçelerinde ise en çok “Chandler” çeşidi ve dölleyicisi “Franquette” oluştururken; az sayıda da “Fernette” çeşidi ve dölleyicisi “Fenor” oluşturmaktadır.

Survey çalışmaları sırasında hem badem ağaçlarında hem de ceviz ağaçlarında makroskobik gözlemler yapılmış ve PLMVd'nin belirtileri gözlenmeye çalışılmıştır. Yaprak örneği alınan bahçelerdeki badem ve ceviz ağaçlarında mozaik, kloroz, leke, damar bantlaşması gibi farklı yaprak simptomları ile sürgün gelişimi geriliği, dallarda nekrotik lekelenmeler, şekil bozuklukları gibi belirtiler incelenmiştir.

Badem ağaçlarında kloroz, nekroz, yapraklarda renk açılmaları ve saçma deliği şeklinde belirtiler gözlenmiştir. Ancak yaptığımız moleküler çalışmalar neticesinde badem örneklerinde PLMVd etmeni bulunmamıştır. Bu nedenle surveyler sırasında gözlemlediğimiz belirtilerin viroid kaynaklı olmayıp, bazı biyotik ve abiyotik kaynaklı başka hastalık ve zararlılardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kloroz, nekroz, saçma deliği şeklinde simptomlar özellikle sert çekirdekli meyve ağaçlarında yaygın olarak görülen ‘yaprakdelen (çil)’ olarak bilinen fungal hastalık belirtileri ile benzerlik göstermesinden dolayı birbiri ile karıştırılmaktadır. Virüs ve viroid hastalıkları badem yapraklarında renk açılmalarına da neden olmaktadır. Fakat çalışmamız sonucunda bademde PLMVd tespit edilmemiş olması, yapraklardaki renk açılmasının da bitki besin elementi eksikliğinden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Ceviz ağaçlarının yapraklarında ise şekil bozuklukları, kıvrılmalar, kloroz ve nekroz şeklinde simptomlar gözlenmiştir. Ancak bu belirtilerin viroid kaynaklı olup olmadığı bilinmemekle beraber, ‘yaprak bitleri’, ‘ceviz yaprakuyuzu’ ve ‘ceviz gal akarı’ gibi zararlıların yaprakta beslenmesi sonucu oluşmuş olabileceği değerlendirilmiştir. Kloroz ve nekroz şeklinde görülen belirtilerin ise penetrasyon çevresindeki renk açılmalarının zamanla koyu renkli grimsi ve kahverengi lekelere dönüştüğü ‘ceviz antraknozu’ olarak bilinen fungal hastalıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

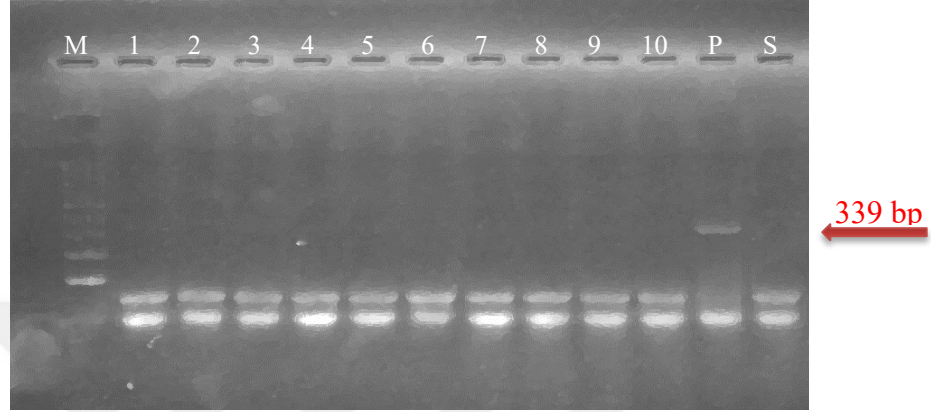
Yapılan survey çalışmasında badem ve ceviz ağaçlarında çoğunlukla virüs ve virüs benzeri etmenlere rastlanmamış olup, daha sonra yapılan moleküler çalışmalar sonucunda cevizde PLMVd’nin tespit edilmiş olması etmenin ceviz bitkisinde latent olarak bulunduğunu göstermiştir. Gözlemlerimize paralel olarak Tuncel vd. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, cevizde PLMVd etmenini dünyada ilk kez tespit ettiklerini, ancak ceviz bitkisinde herhangi bir belirti görülmediğini ve latent olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Malatya ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

PLMVd’nin varlığını tespit etmek amacı ile Malatya (Darende) ili badem alanlarından toplanan örneklere RT-PCR yapılmış ve PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Malatya iline ait test edilen badem örneklerinin

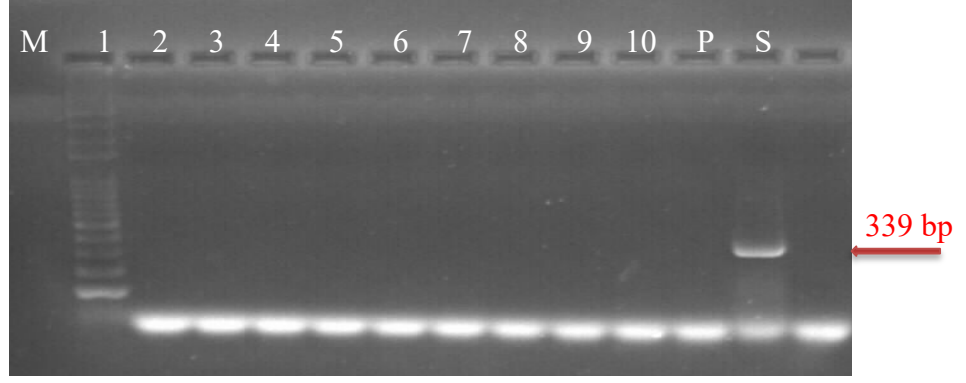
hiçbirinde PLMVd'ye rastlanılmamıştır. Yürütülen tüm RT-PCR testlerinde Tuncel vd. 2020 yılında yaptıkları çalışmada tespit edilen PLMVd'ye ait pozitif kontrol numuneleri kullanılmış ve 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluşturmuştur, su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Malatya (Darende) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol

4.2.2. Elazığ ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

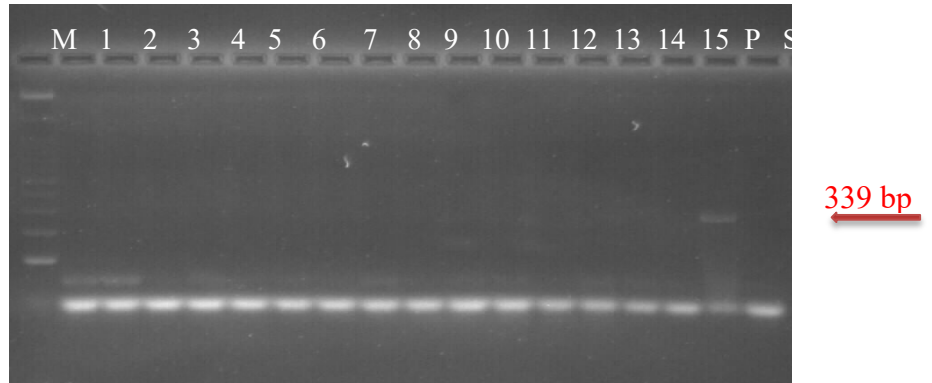
PLMVd'nin varlığını tespit etmek amacı ile Elazığ ili ve ilçeleri (Merkez, Baskil, Ağın, Keban) badem alanlarından toplanan örneklere RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve test edilen örneklerin hiçbirinde PLMVd'ye rastlanılmamıştır. Yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Elazığ (Merkez) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol

4.2.3. Adıyaman ili badem örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

PLMVd'nin varlığını tespit etmek amacı ile Adıyaman ili ve ilçeleri (Merkez, Gölbaşı, Besni, Kahta) badem alanlarından toplanan örneklere RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve test edilen örneklerin hiçbirinde PLMVd'ye rastlanılmamıştır. Yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.3).



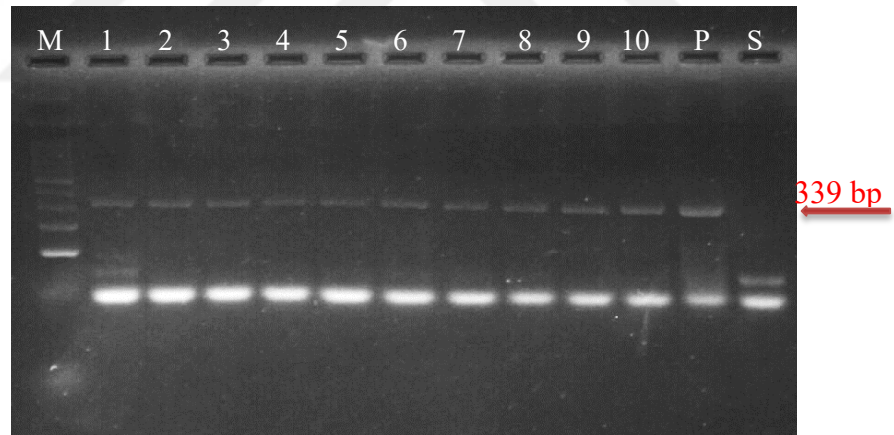
Şekil 4.3. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Adıyaman (Kahta) ilinden alınan badem örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol

PLMVd'nin varlığının tespit edilmesine yönelik yapılan bir çalışmada Fekih Hassen vd. 2005 yılında Tunus'taki badem ağaçlarında bu etmenin varlığını RT-PCR

yöntemi ile test ettiklerini ve 17 ağacın 2'sinde 337 bp büyüklüğünde PLMVd tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ancak yaptığımız bu çalışma ile Malatya, Elazığ ve Adıyaman illeri badem alanlarında yaptığımız moleküler testlemelerin hiçbirinde PLMVd tespit edilememiştir.

4.2.4. Malatya ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

PLMVd'nin varlığını tespit etmek amacı ile Malatya ili ceviz alanlarından toplanan örnekler RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve test edilen örneklerden sadece Hekimhan'a ait 10 örnek (1-10 arası) pozitif bulunurken, diğer ilçelerde pozitif bulunmamıştır. Bu örneklerden '3' ve '4' numaralı örnekler yabani ceviz ağaçlarından toplanmıştır. Yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.4).

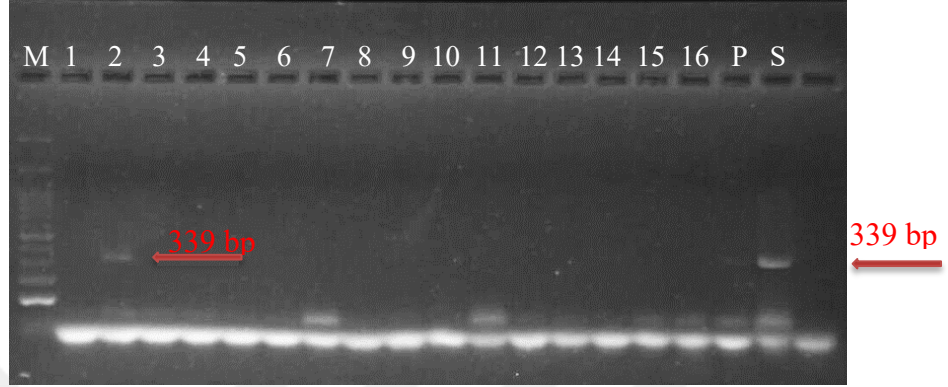


Şekil 4.4. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Malatya (Hekimhan) ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol

4.2.5. Elazığ ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

PLMVd'nin varlığını tespit etmek amacı ile Elazığ ili ve ilçeleri (Merkez, Baskil, Ağın, Keban) ceviz alanlarından toplanan örnekler RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve test edilen örneklerden

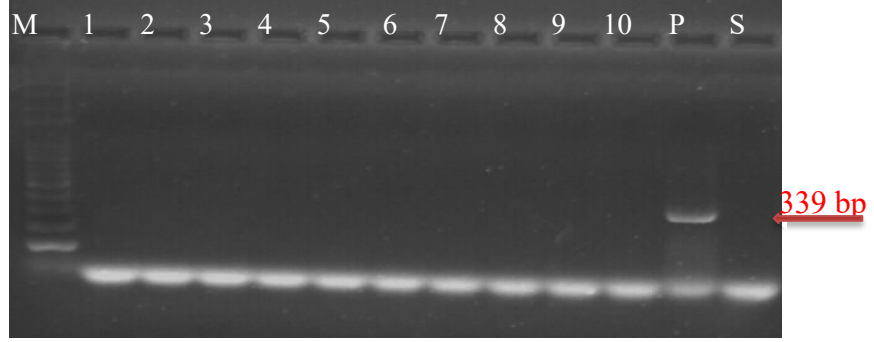
sadece Keban'a ait 1 örnek (2 numaralı örnek) pozitif bulunmuştur. Yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Elazığ (Keban) ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol

4.2.6. Adıyaman ili ceviz örneklerinin PLMVd ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

PLMVd'nin varlığını tespit etmek amacı ile Adıyaman ili ve ilçeleri (Merkez, Gölbaşı, Besni, Kahta, Tut) ceviz alanlarından toplanan örnekler RT-PCR yapılmıştır. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve test edilen örneklerin hiçbirinde PLMVd'ye rastlanılmamıştır. Yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol 339 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken su kontrolde ise herhangi bir bant elde edilmemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. PLMVd'nin varlığını tespit etmek için Adıyaman ilinden alınan ceviz örneklerine uygulanan RT-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-10.000 bp), 1: Adıyaman merkez 1-10 arası örnek, 2-3-4-5: Gölbaşı 1-40 arası örnek, 6-7: Kahta 1-20 arası örnek, 8-9: Besni 1-20 arası örnek,10: Tut 1-10 arası örnek

4.3. Tespit Edilen Viroid İzolatlarının Tüm Genom Dizilerinin Moleküler Karakterizasyonu

4.3.1. Dizilerin referans izolat yardımı ile edit edilmesi

Tüm genom dizileri tespit edilen PLMVd K1, H1, H2 ve H3 izolatlarına ait nükleotid dizileri, PLMVd'ye spesifik primerler (Çizelge 3.1) ve Gen Bankasında referans alınan bir PLMVd dizisi (M83545) baz alınarak edit yapılmıştır. Gerekli nükleotid düzeltmeleri yapıldıktan sonra izolatların elde edilen konsensus dizileri Blast programı (Graphic summary) ile kontrol edilmiştir. Buna göre; edit yapılmayan dizilerin grafiksel görüntüsü iki renk oluştururken, edit yapılan dizilerin grafiksel görüntüsü tek renk oluşturmuştur (Şekil 4.7).



(A) Edit yapılmayan

(B) Edit yapılan

Şekil 4.7. Blast programında düzenlenmiş ve düzenlenmemiş PLMVd izolatlarının nükleotid dizilerinin grafiksel görünümü

4.3.2. Referans dizi kullanılarak manuel nükleotid düzeltmesi

Çift yönlü okuması yapılan dizilerin düzeltme işlemi PLMVd K1 izolatı örnek alınarak Şekil 4.8’de görüldüğü gibi yapılmıştır. Ünlversal SP6 ve T7 primerleri ile okunan diziler CLC Main Workbench programının ‘assemble sequencing to reference’ fonksiyonu ile referans dizi baz alınarak üst üste çakıştırılmıştır. Bu işlem sonrası tüm diziler alt alta gruplandırıldığında program bazı nükleotid okumalarında uyuşmazlık olduğunu bildirmektedir.

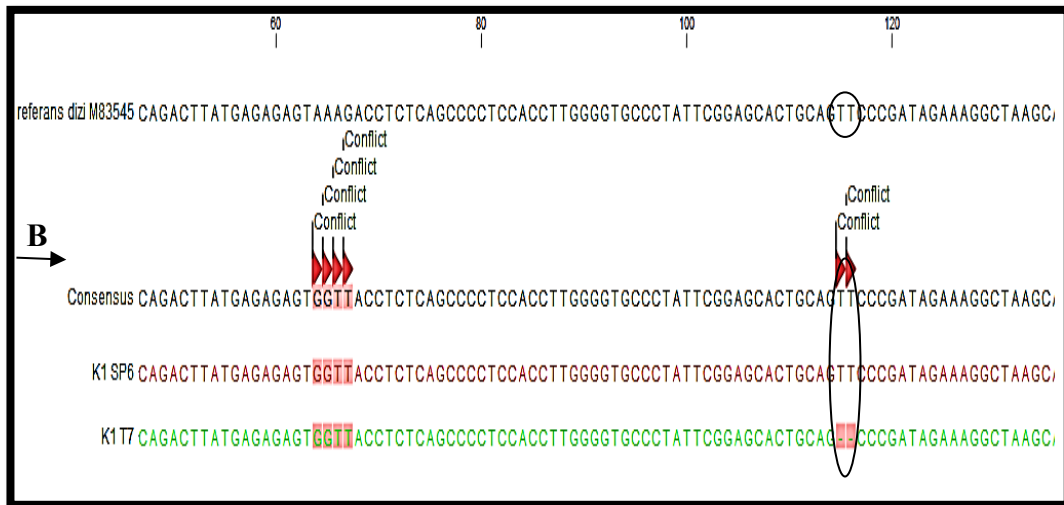
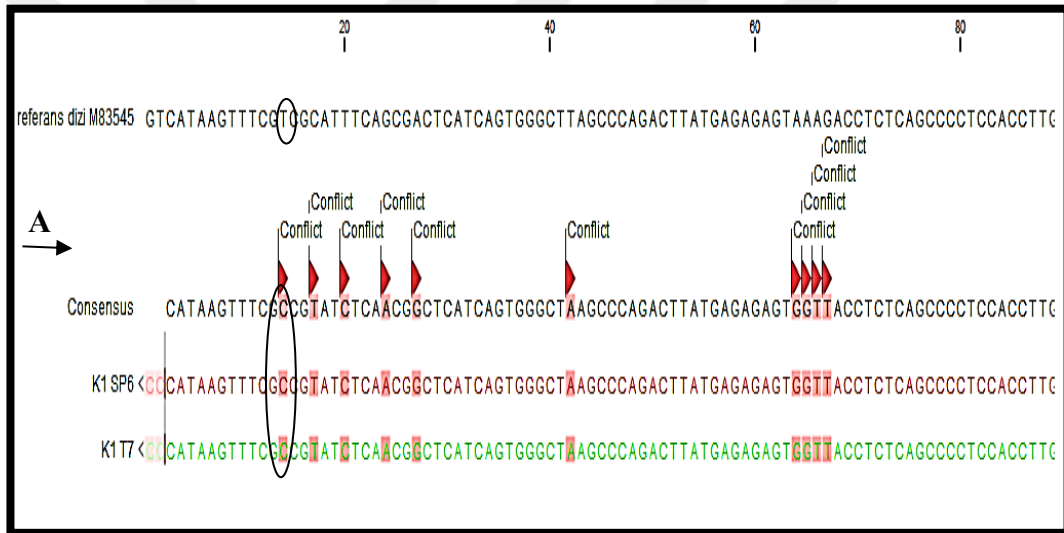
Consensus dizi oluşturmada, SP6 okumasında ‘C’ T7 okumasında ‘T’ ve referans dizide ‘C’ olması gibi bir durum söz konusu ise o okumanın yanlış olduğu kabul edilir. Çünkü SP6 ve T7 okumalarının herhangi birindeki nükleotid referans dizideki nükleotid ile örtüşüyorsa bu okuma ‘T’ kabul edilerek consensus dizisi oluşturulur.

Şekil 4.8 A’da görüldüğü üzere K1 izolatının 1. uyuşmazlık (1. conflict) bölgesinde her iki yönlü okumada ‘C’ bazı varken referans izolatında aynı bölgede ‘T’ bazı olduğu görülmektedir (1. conflict). Bu durum her ne kadar bir uyuşmazlık gibi

görünse de, gerçekte K1 izolatının referans izolattan farkını gösteren önemli ve ayırt edici bir özelliğidir. Bundan dolayı, K1 izolatının ilgili kısmındaki 'C' bazı okuması olduğu gibi bırakılmış ve konsensus dizisi de 'C' olarak tutulmuştur.

Şekil 4.8 B'de ise K1 izolatının T7 okumasında 2 nükleotidin okunmadığı görülmektedir. Ancak bu okunmayan kısım referans dizide 'TT' olarak görülmektedir. K1 izolatını referans izolat ile karşılaştırdığımız için consensus dizisine 2 adet 'TT' ilavesi yaparak consensus dizisinin oluşması sağlanmıştır.

Tespit edilen ve tüm genomları pGEM-T Easy vektörde klonlanarak moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilen diğer izolatların (Hekimhan 1-H1, Hekimhan 2-H2, Hekimhan 3-H3) consensus dizisi de aynı şekilde oluşturulmuştur.



Şekil 4.8. Referans dizi referans alınarak consensus oluşturma

4.3.2.1. K1 izolatının moleküler karakterizasyonu

Nükleotid dizisi elde edilen PLMVd ceviz K1 izolatı, MW294170 Erişim Numarası ile NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. K1 izolatının tüm genom uzunluğunun 338 nt uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve tüm genom dizisi Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. K1 izolatının tüm genom dizisi

Baz Sırası	Nükleik Asit Baz Dizisi
1	cccataagtt tcgcccgtatc tcaacggctc atcagtgggc taagcccaga cttatgagag agtggttacc
71	tctcagcccc tccacctgg ggtgcctat tcggagcact gcagttccc atagaaaggc taagcacctc
141	gcaatgaggt aaggtgggac tttccttcg ggagcctagc ggtaggctcc gaggggggtg
201	tgatccaggt accgccgtag aaactggatt acgacgtcta cccgggattc aaaccggctc
261	ccctccagaa gtgattctgg aagaagagtc tgtgcttagc acactgatga gtctctgaaa tgagacgaaa
331	ctcttctt

4.3.2.2. H1 izolatının moleküler karakterizasyonu

Nükleotid dizisi elde edilen PLMVd ceviz H1 izolatı, MW294171 Erişim Numarası ile NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. H1 izolatının tüm genom uzunluğunun 338 nt uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve tüm genom dizisi Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. H1 izolatının tüm genom dizisi

Baz Sırası	Nükleik Asit Baz Dizisi
1	cccataagtt tcgcccgtatc tcaacggctc atcagtgggc taagcccaga cttatgagag agtggttacc
71	tctcagcccc tccacctgg ggtgcctat tcggagcact gcagttccc atagaaaggc taagcacctc
141	gcaatgaggt aaggtgggac tttccttcg ggagcctagc ggtaggctcc gaggggggtg
201	tgatccaggt accgccgtag aaactggatt acgacgtcta cccgggattc aaaccggctc
261	ccctccagaa gtgattctgg aagaagagtc tgtgcttagc acactgatga gtctctgaaa tgagacgaaa
331	ctcttcta

4.3.2.3. H2 izolatının moleküler karakterizasyonu

Nükleotid dizisi elde edilen PLMVd ceviz H2 izolatı, MW294172 Erişim Numarası ile NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. H2 izolatının tüm genom uzunluğunun 338 nt uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve tüm genom dizisi Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. H2 izolatının tüm genom dizisi

Baz Sırası	Nükleik Asit Baz Dizisi
1	cccataagtt tcgccgtatc tcaacggctc atcagtgggct aagcccagac ttatgagaga gtggttacct
71	ctcagccct ccaccttga gtcacctatt cggagcactg cagtcccga tagaaagc taagcacctc
141	gcaatgaggt aaggtgggac tttccttcg ggagcctagc ggtaggctcc gaggggggtg
201	tgatccaggt accgccgtag aaactggatt acgacgtcta cccgggatc aaaccggtc
261	ccctccagaa gtgattctgg aagaagagtc tgtgcttagc acactgatga gtctctgaaa tgagacgaaa
331	ctcttcta

4.3.2.4. H3 izolatının moleküler karakterizasyonu

Nükleotid dizisi elde edilen PLMVd ceviz H3 izolatı, MW294173 Erişim Numarası ile NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. H3 izolatının tüm genom uzunluğunun 338 nt uzunluğunda olduğu belirlenmiş ve tüm genom dizisi Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. H3 izolatının tüm genom dizisi

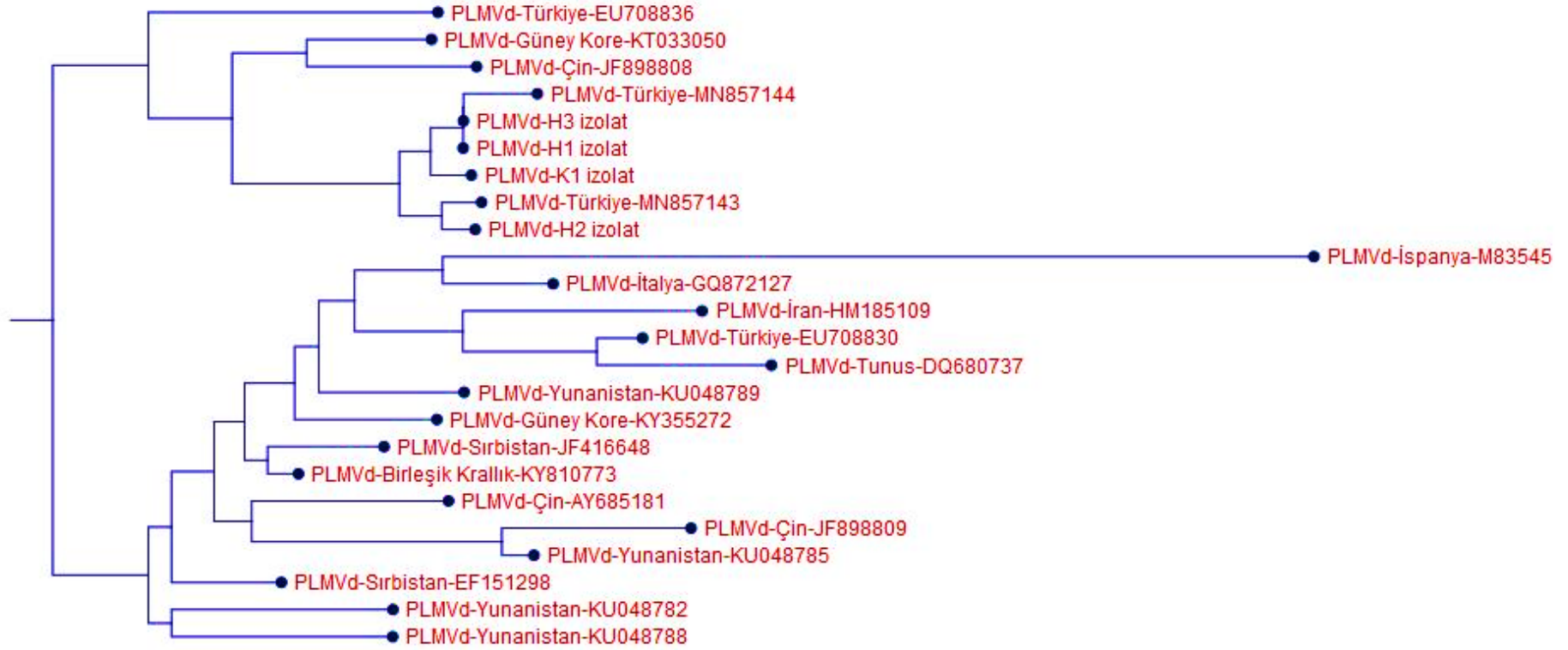
Baz Sırası	Nükleik Asit Baz Dizisi
1	cccataagtt tcgccgtatc tcaacggctc atcagtgggc taagcccaga cttatgagag agtgggtacc
71	tctcagccc tccaccttgg ggtgccctat tcggagcact gcagtcccga atagaaagc taagcacctc
141	gcaatgaggt aaggtgggac tttccttcg ggagcctagc ggtaggctcc gaggggggtg
201	tgatccaggt accgccgtag aaactggatt acgacgtcta cccgggatc aaaccggtc
261	ccctccagaa gtgattctgg aagaagagtc tgtgcttagc acactgatga gtctctgaaa tgagacgaaa
331	ctcttcta

4.3.3. Filogenetik ağaç

Cevizde tespit edilen PLMVd (K1, H1, H2, H3)'ye ait 4 izolatın genom dizileri karakterize edilmiştir. Filogenetik ağaç CLC Main Workbench 20.0.4 programı yardımı ile yapılmış olup, izolatlar arasındaki nükleotid benzerlik ve farklılıklar ağaçta dallanmalara neden olmuştur (Şekil 4.9).

PLMVd izolatlarına (K1, H1, H2, H3) ait genom dizileri, şimdiye kadar gen bankasına kaydedilmiş diğer izolatlar ile karşılaştırıldığında farklı oranlarda benzerlikler gösterdiği görülmüştür.





Şekil 4.9. PLMVd izolatlarının (K1, H1, H2, H3) dünyada tespit edilmiş diğer PLMVd izolatları ile CLC Main Workbench 20.0.4 programı aracılığıyla 1000 tekerrürlü olarak oluşturulmuş filogenetik ağacı

PLMVd ceviz izolatlarının diğer dünya izolatları ile olan genetik benzerlik ve farklılıklarını belirleyebilmek için 1000 tekerrürlü olarak nükleotid dizileri karşılaştırılmış ve filogenetik ağaç elde edilmiştir (Şekil 4.9). Çoklu nükleotid dizi karşılaştırması sonucunda, PLMVd izolatlarının dünyadaki diğer izolatlar ile %96.7-99.1 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Tuncel vd. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, PLMVd'nin çoklu nükleotid dizi karşılaştırılmasında tespit ettikleri izolatların dünyadaki diğer şeftali, nektarin ve kiraz izolatları ile %96.6-98.8 arasında değişen bir benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

PLMVd'ye ait K1, H1 ve H3 izolatları aynı olup %99.1 benzerlik oranı ile JF898808 erişim numaralı Çin izolatı ile gruplanmıştır. H2 izolatı ise %99.1 benzerlik oranı ile KT033050 erişim numaralı Güney Kore izolatı ile gruplanmıştır.

Nükleotid dizilerinin karşılaştırılması için gen bankasından 20 farklı izolat seçilmiştir. Nükleotid karşılaştırmasında kullanılan izolatlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Nükleotid karşılaştırmasında kullanılan Gen Bankasında (NCBI) kayıtlı PLMVd izolatlarına ait orijin, konukçu, nükleotid uzunluğu, erişim numarası ve referans bilgileri

Orijin	Konukçu	Nükleotid Uzunluğu (bp)	Erişim Numarası	Referans
Çin	Şeftali	339	JF898808	Fan et al. 2012
Güney Kore	Şeftali	339	KT033050	Jo et al. 2015
Yunanistan	Vişne	339	KU048782	Boubourakas and Kyriakopoulou. 2016
Yunanistan	Armut	339	KU048789	Boubourakas and Kyriakopoulou. 2016

Çizelge 4.5. (devam)

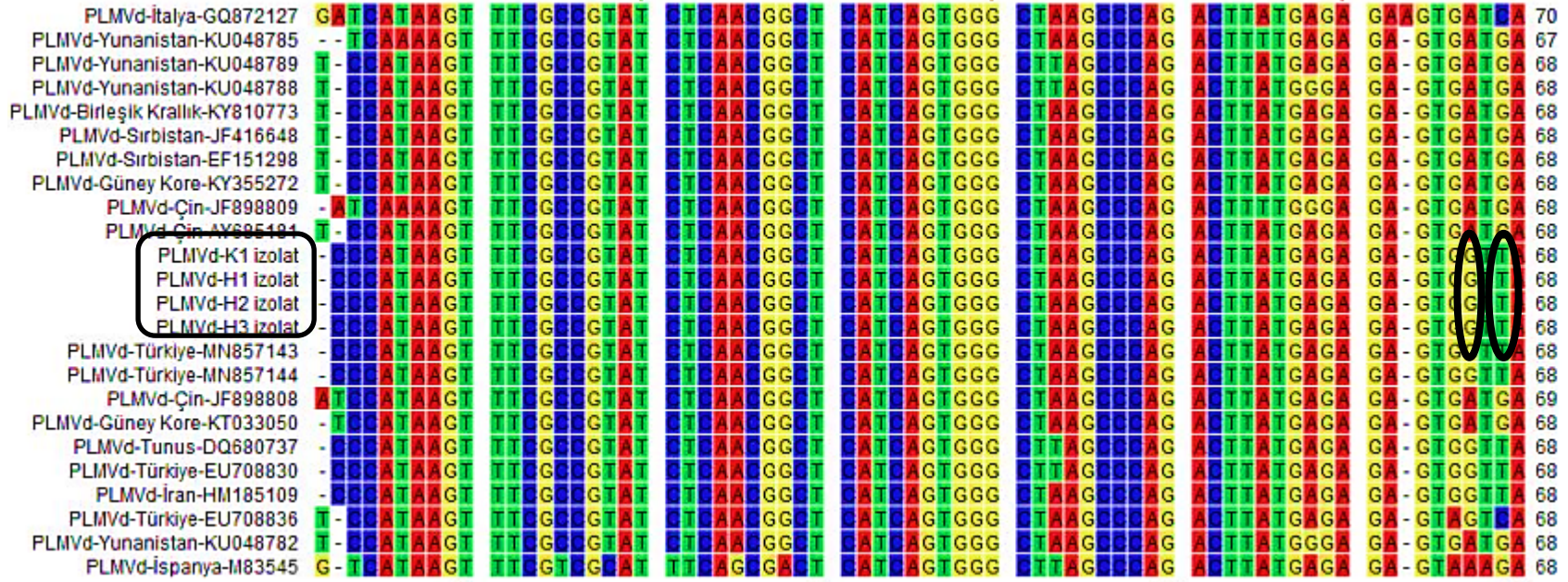
İtalya	Şeftali	339	GQ872127	Luigi et al. 2009
Çin	Şeftali	338	JF898809	Fan et al. 2012
Sırbistan	Şeftali	339	JF416648	Jeuremovic and Paunovic 2011
Türkiye	Şeftali	339	EU708836	Gazel ve ark. 2008
Yunanistan	Vişne	338	KU048785	Boubourakas and Kyriakopoulou. 2016
Güney Kore	Şeftali	339	KY355272	Jo et al. 2018
İran	Şeftali	337	HM185109	Yazarlou et al. 2012
Sırbistan	Şeftali	337	EF151298	Mandic et al. 2009
Yunanistan	Armut	339	KU048788	Boubourakas and Kyriakopoulou. 2016
Türkiye	Nektarin	338	EU708830	Gazel ve ark. 2008
Birleşik Krallık	Şeftali	337	KY810773	Pecmen et al. 2017
Tunus	Şeftali	339	DQ680737	Fekih Hassen et al. 2007
Türkiye	Ceviz	339	MN857143	Tuncel ve ark. 2020
Türkiye	Ceviz	339	MN857144	Tuncel ve ark. 2020
Çin	Şeftali	339	AY685181	Xu et al. 2007
İspanya	Şeftali	337	M83545	Hernandez and Flores 1992

4.3.4. Çoklu nükleotid dizi karşılaştırması

PLMVd'ye ait K1, H1, H2 ve H3 izolatlarının tüm genom nükleotidlerinin dünyadaki 20 PLMVd izolatı ile karşılaştırılması sonucu; tüm genom üzerindeki 338 nükleotid içerisinde toplamda 33 bazda yer değiştirme varyasyonu tespit edilmiş olup, K1, H1 ve H3 izolatlarında 8 nükleotidde yer değiştirme varyasyonu, H2 izolatında ise 9 nükleotidde yer değiştirme varyasyonu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).

Gazel vd. 2008 yılında yaptıkları çalışmada, şeftalide tespit ettikleri PLMVd izolatlarının nükleotid çoklu dizilemesi ve filogenetik analizlerinde, diğer izolatlar ile arasında büyük bir değişkenlik olduğunu ve bu değişkenliğin de pseudoknot içeren gövdede olduğunu belirtmişlerdir.

Dünyada bulunan 20 izolat ile PLMVd viroidine ait 4 izolatın tüm genom nükleotidlerinin karşılaştırılması ile PLMVd K1, H1 ve H3 izolatlarında 68'nci nükleotidde 2 adet yer değiştirme, 208'nci nükleotidde 4 adet yer değiştirme, 338'nci nükleotidde 2 adet yer değiştirme varyasyonu olduğu gözlenmiştir. PLMVd H2 izolatında ise 68'nci nükleotidde 2 adet yer değiştirme, 138'nci nükleotidde 1 adet yer değiştirme, 208'nci nükleotidde 4 adet yer değiştirme, 338'nci nükleotidde 2 adet yer değiştirme varyasyonu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. PLMVd (K1, H1, H2, H3 izolatları) tüm genomunun CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile yapılmış çoklu nükleotid dizi karşılaştırması



PLMVd-İtalya-GQ872127	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	140
PLMVd-Yunanistan-KU048785	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	137
PLMVd-Yunanistan-KU048789	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Yunanistan-KU048788	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Birleşik Krallık-KY810773	GGGGTGGGTT	ATTGGA - AA	DTGAGTTCC	-GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	136
PLMVd-Sırbistan-JF416648	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Sırbistan-EF151298	GGGGTGGGTT	ATTGGA - AA	DTGAGTTCC	-GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	136
PLMVd-Güney Kore-KY355272	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Çin-JF898809	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Çin-AY895191	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-K1 izolat	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-H1 izolat	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-H2 izolat	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-H3 izolat	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Türkiye-MN857143	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Türkiye-MN857144	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Çin-JF898808	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	139
PLMVd-Güney Kore-KT033050	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Tunus-DQ680737	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Türkiye-EU708830	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-İran-HM185109	GGGGTGGGTT	AGTGGAA - AA	DTGAGTTCC	-GATGGAAAAG	GTTAAGAAC	136
PLMVd-Türkiye-EU708836	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-Yunanistan-KU048782	GGAGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138
PLMVd-İspanya-M83545	GGGGTGGGTT	ATTGGAGAA	DTGAGTTCC	GATAGAAAAG	GTTAAGAAC	138

Şekil 4.10. (devam)



PLMVd-İtalya-GQ872127	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	T	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	210
PLMVd-Yunanistan-KU048785	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	207	
PLMVd-Yunanistan-KU048789	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Yunanistan-KU048788	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Birleşik Krallık-KY810773	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	206	
PLMVd-Sırbistan-JF416648	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Sırbistan-EF151298	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	206	
PLMVd-Güney Kore-KY355272	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Çin-JF898809	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Çin-AY695191	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-K1 izolat	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-H1 izolat	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-H2 izolat	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-H3 izolat	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Türkiye-MN857143	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Türkiye-MN857144	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Çin-JF898808	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	209	
PLMVd-Güney Kore-KT033050	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Tunus-DQ680737	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Türkiye-EU708830	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-İran-HM185109	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	206	
PLMVd-Türkiye-EU708836	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-Yunanistan-KU048782	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	
PLMVd-İspanya-İ83545	T	G	A	A	T	G	A	G	G	T	A	A	G	G	T	G	G	A	C	T	T	T	T	C	T	T	G	G	G	A	A	C	C	A	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	A	T	C	C	A	208	

Şekil 4.10. (devam)



PLMVd-İtalya-GQ872127	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	280
PLMVd-Yunanistan-KU048785	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	277
PLMVd-Yunanistan-KU048789	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Yunanistan-KU048788	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Birleşik Krallık-KY810773	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	276
PLMVd-Sırbistan-JF416648	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Sırbistan-EF151298	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	276
PLMVd-Güney Kore-KY355272	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Çin-JF898809	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Çin-AY695191	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-K1 izolat	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-H1 izolat	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-H2 izolat	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-H3 izolat	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Türkiye-MN857143	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Türkiye-MN857144	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Çin-JF898808	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	279
PLMVd-Güney Kore-KT033050	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Tunus-DQ680737	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Türkiye-EU708830	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-İran-HM185109	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	276
PLMVd-Türkiye-EU708836	G T G C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-Yunanistan-KU048782	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G G	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	278
PLMVd-İspanya-M83545	G T A C C G C C G T	A G A A A C T G G A	T T A C G A C G T C	T A C C C G G G A T	T C A A A C C C G -	T C C C C T C C A G	A A G T G A T T C T	277

Şekil 4.10. (devam)

PLMVd-İtalya-GQ872127	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	339
PLMVd-Yunanistan-KU048785	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	338
PLMVd-Yunanistan-KU048789	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Yunanistan-KU048788	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Birleşik Krallık-KY810773	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	337
PLMVd-Sırbistan-JF416648	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Sırbistan-EF151298	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	337
PLMVd-Güney Kore-KY355272	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Çin-JF898809	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	338
PLMVd-Çin-AY685181	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-K1 izolat	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	338
PLMVd-H1 izolat	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	338
PLMVd-H2 izolat	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	338
PLMVd-H3 izolat	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	338
PLMVd-Türkiye-MN857143	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Türkiye-MN857144	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Çin-JF898808	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	339
PLMVd-Güney Kore-KT033050	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Tunus-DQ680737	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Türkiye-EU708830	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	338
PLMVd-İran-HM185109	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	337
PLMVd-Türkiye-EU708836	GGAAAGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-Yunanistan-KU048782	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	A	339
PLMVd-İspanya-M83545	GGATGAAAGAG	TTTGTGTTA	GACAACTGAT	GAGTCTTGA	AATGAGAGA	AACTCTTTT	-	337

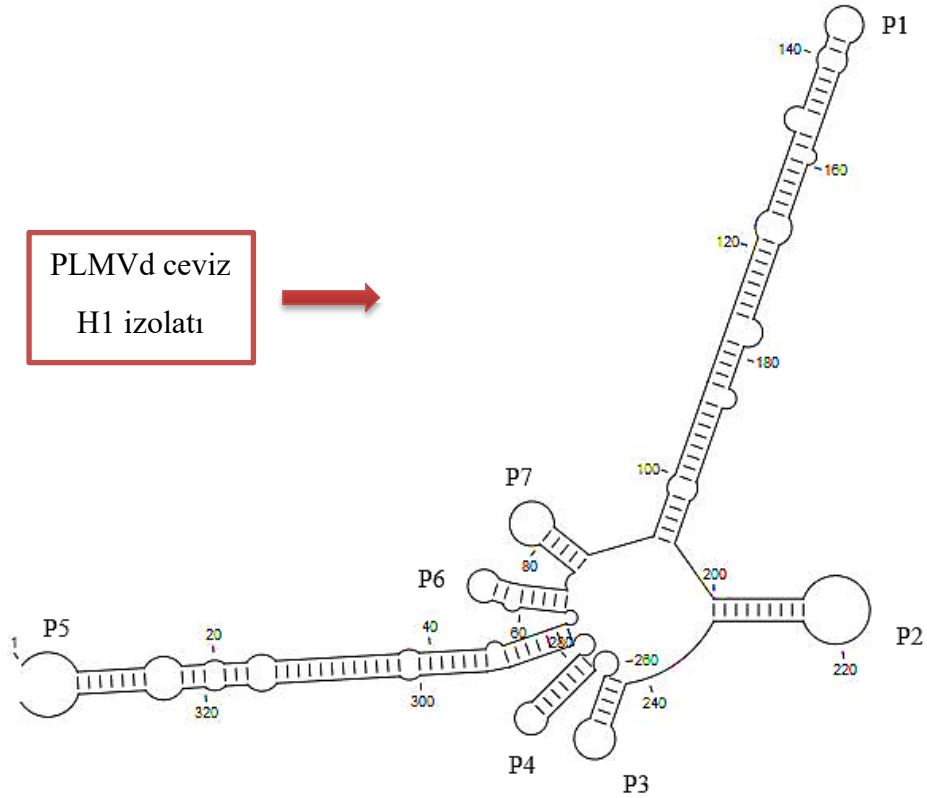
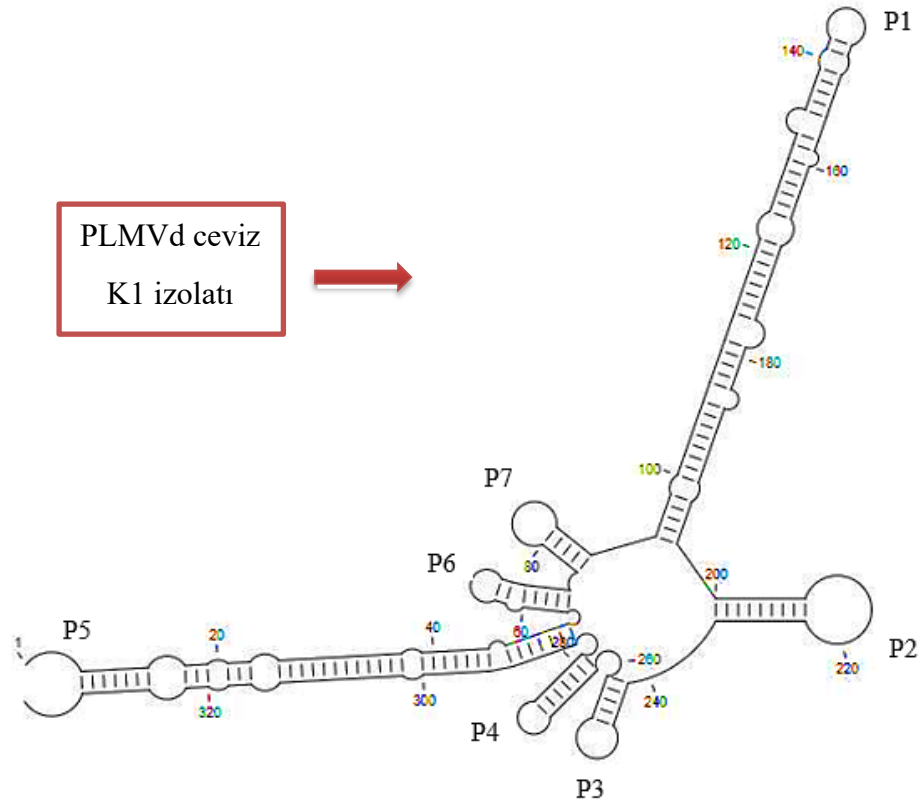
Şekil 4.10. (devam)

4.3.5. PLMVd'ye ait izolatların ikincil yapıları

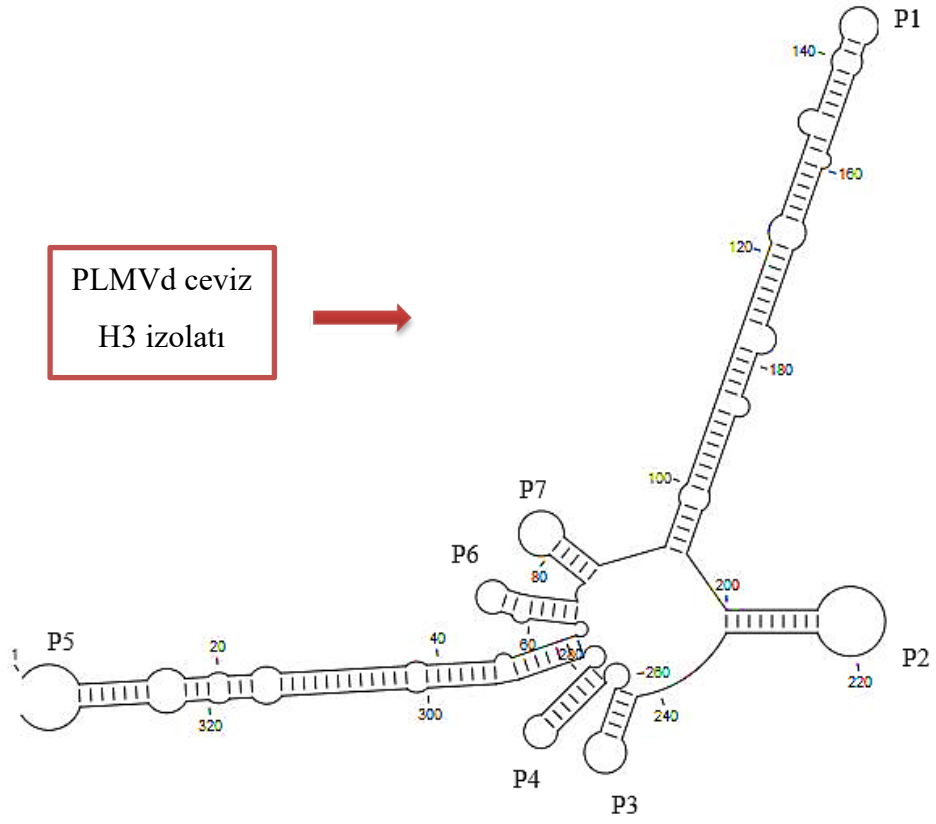
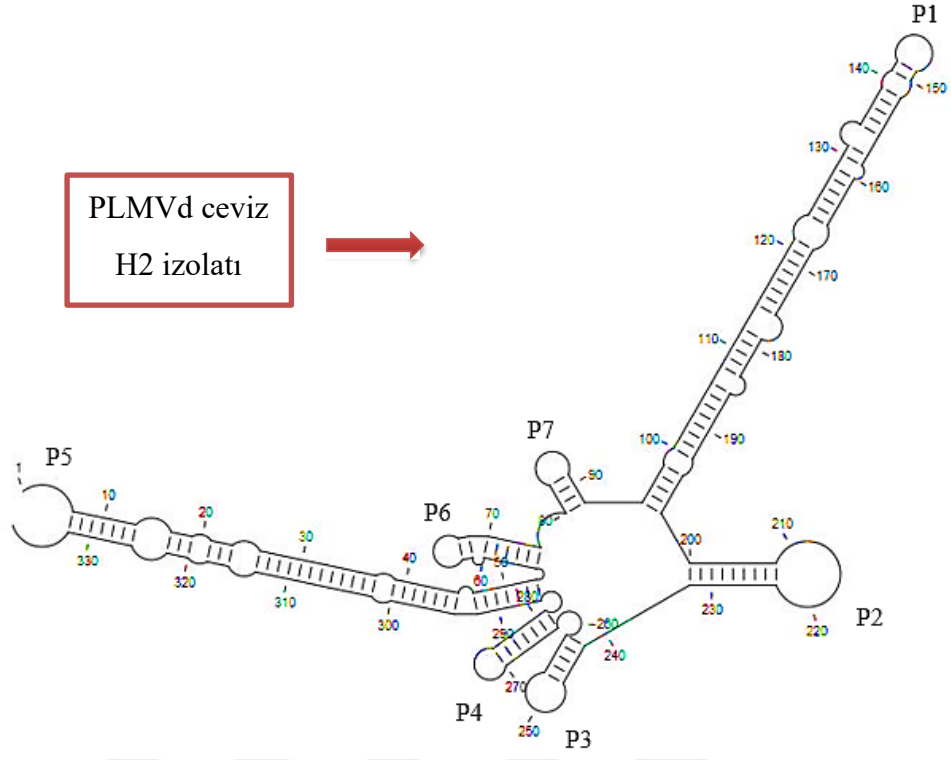
PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) ikincil yapılarının topolojik olarak dallanmış küre şeklinde oldukları ve referans dizinin (M83545) aynı programda oluşturulan ikincil yapısı ile benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.11) (Hernandez ve Flores, 1992).

K1, H1, H2 ve H3 izolatlarının ikincil yapısı 7 gövdeden oluşmakta ve ve bu gövdelerden P1 gövdesinde yer alan 'GCGG' nükleotid dizisinin P2 gövdesinde yer alan 'CGCC' nükleotid dizisi ile muhtemel bir RNA katlanması esnasında pseudoknot oluşturabileceği gözlenmiştir. Bu durum survey çalışmalarında tespit edilen tüm PLMVd ceviz izolatlarında gözlemlenmiştir (Şekil 4.12). Çalışmamızla paralel olarak, Pelchat vd. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, tespit ettikleri PLMVd izolatının 3 yeni pseudoknot içerdiğini ve kompleks dallanmış bir yapıya sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bussiere vd. 2000, PLMVd'nin kompleks ve dallanmış bir ikincil yapıya sahip olduğunu, daha önce rapor edilen ikincil yapılarla benzer olduğunu ve pseudoknot içerdiğini belirtmişlerdir. Dube vd. 2010, PLMVd'nin (+) ve (-) polaritelerindeki RNA iplikçiklerinin oluşturdukları farklı yapıları inceledikleri çalışmada, PLMVd'nin her iki polaritesindeki iplikçiklerin benzer ikincil yapılar oluşturduklarını, her iki polaritenin iplikçiklerinin sol etki alanlarının benzer olduğu görünürken, sağ etki alanlarında birkaç farklılık gözlemlendiğini, (+) iplikçikte oluşan P8 pseudoknotunun (-) polaritedeki iplikçikte oluşmadığını ve iki polarite arasındaki yapısal farklılıkların PLMVd'nin yaşam döngüsünün farklı aşamalarında önemli etkileri olabileceğini belirtmişlerdir.

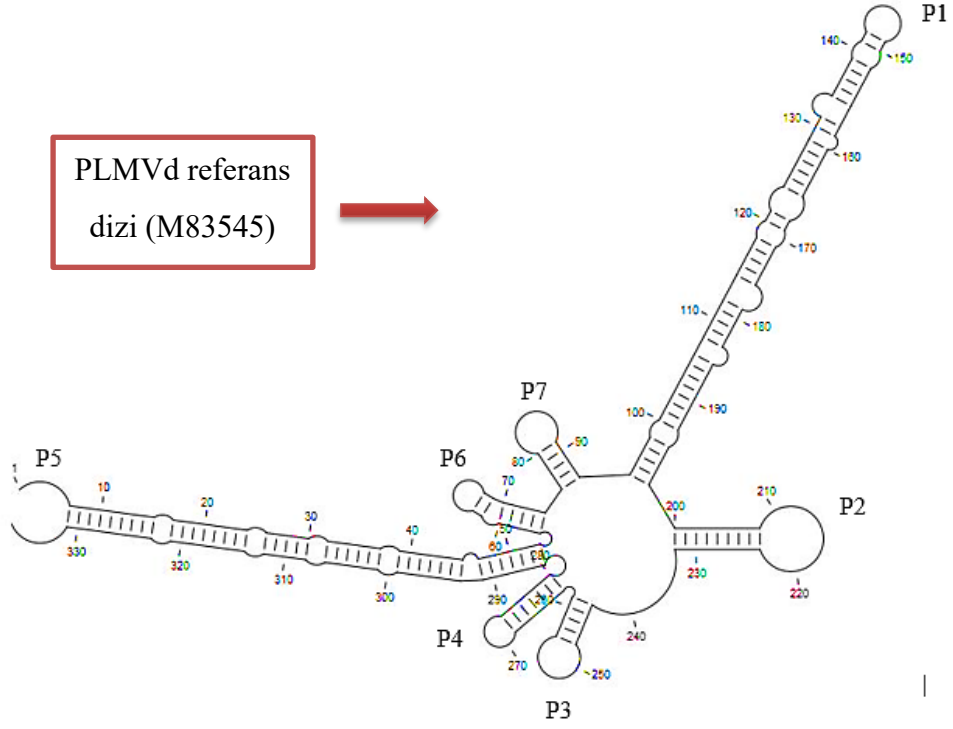
Ceviz izolatlarının ikincil yapısını oluşturan nükleotidlerin bir kısmı tek iplikli bölgede, bir kısmı ise çift sarmallı bölgede bulunmakta ve tüm izolatlar çekiçbaşı ve dallanmış bir ikincil yapı oluşturmuştur. İkincil yapıların daha anlaşılır olması için her gövde yapısına bir numara verilmiştir. Bütün PLMVd ceviz izolatları çekiç başlı bir yapı ile en düşük serbest enerjide dallanmış küre şekilli ikincil yapı sergilemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11.PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) ve PLMVd referans izolatın (M83545) CLC Main Workbench 20.0.4 programı ile oluşturulan ikincil yapılarının görüntüsü

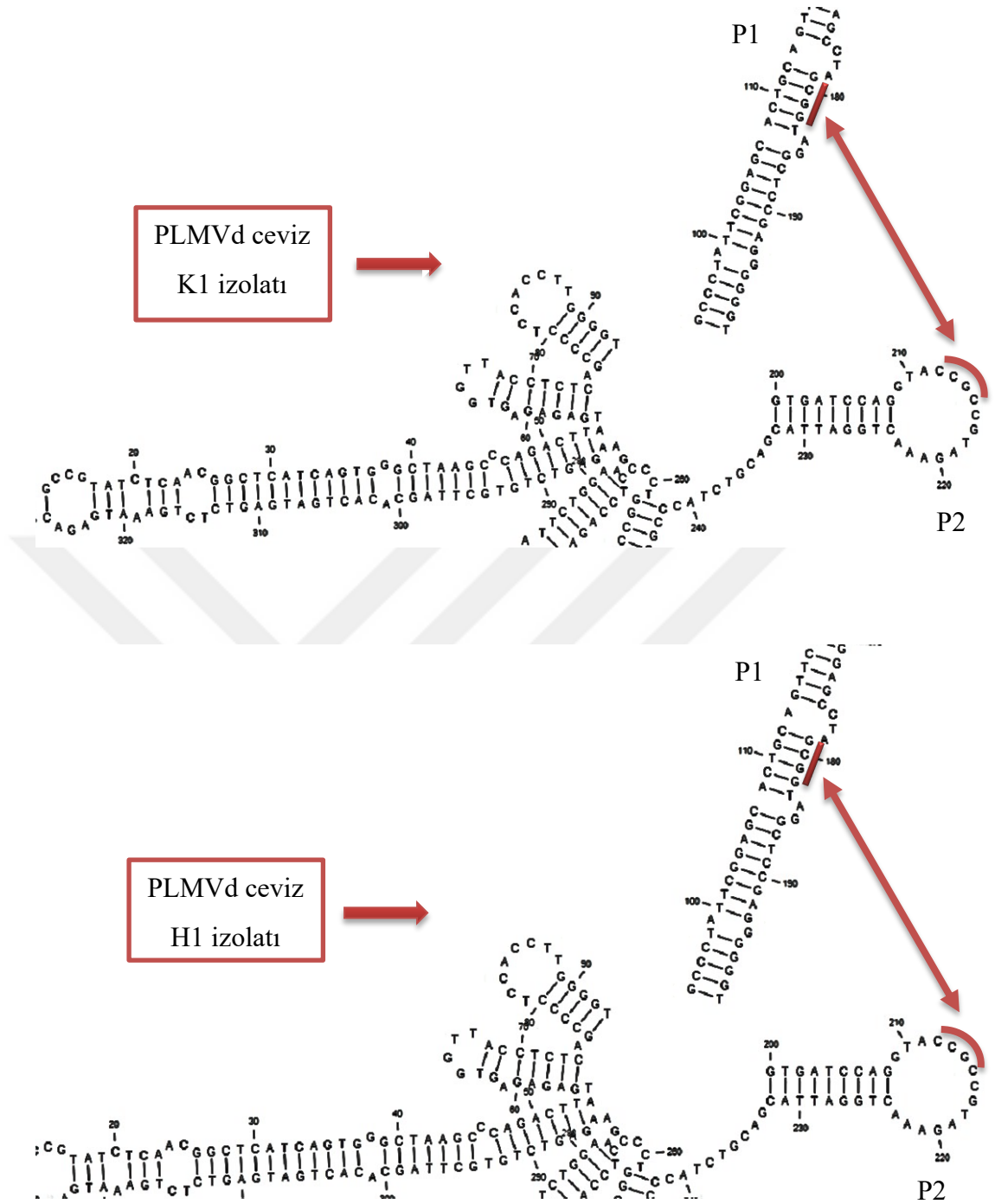


Şekil 4.11. (devam)

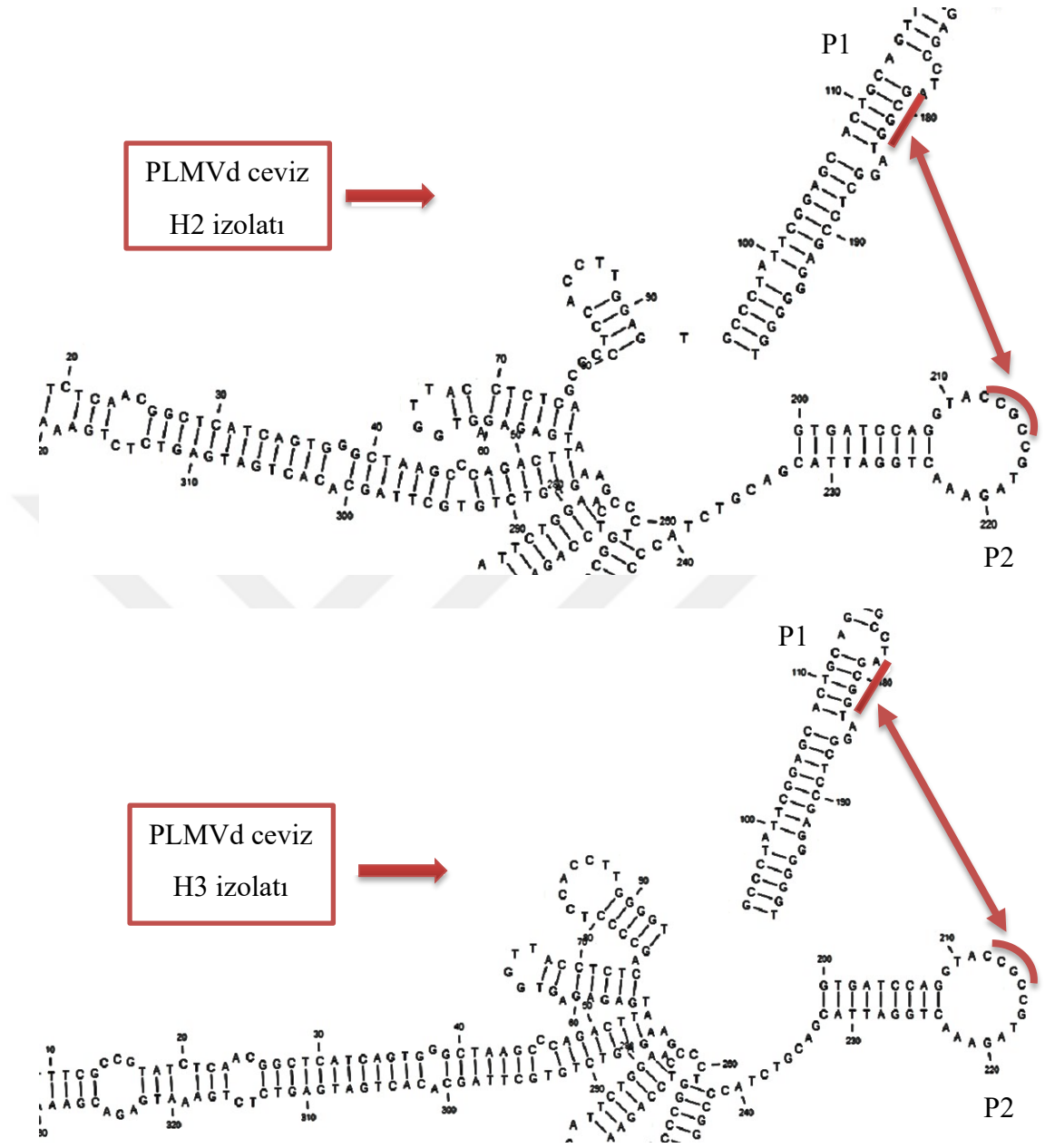


Şekil 4.11. (devam)

PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) ikincil yapılarında, 4 nükleotidin ‘GCGG’ (P1 gövdesi) ve ‘CGCC’ (P2 gövdesi) kısımlarının korunduğu görülmüştür. Korunan bu nükleotidler, P1 gövdesinin çift sarmallı bölgesinde ve P2 gövdesinin ise balon formatının merkezinde bulunmaktadır (Şekil 4.12). Bussiere vd. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, bu 4 nükleotid dizisinin bütün PLMVd varyantlarında korunduğunu belirtmiş ve PLMVd şeftali izolatında P8 pseudoknotun varlığını tanımlamıştır. Yürütülen bu çalışmada da tespit edilen tüm PLMVd ceviz izolatlarında bu nükleotid dizilerinin korunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2, H3) P1 ve P2 gövde yapısında (hairpin) bulunan ve etkileşimli olmayan korunmuş 4-bp nükleotidleri



Şekil 4.12. (devam)

PLMVd'nin ikincil yapıları ile ilgili yapılan çalışmalarda Tuncel vd. (2020)'nin yürütmüş oldukları çalışmada da tespit edilen PLMVd ceviz izolatlarının ikincil yapısının 7 gövdeden (stem) oluştuğunu bildirmişlerdir. Gazel vd. 2008 yılında yaptıkları çalışmada tespit ettikleri PLMVd izolatlarının ikincil yapısının dallanmış küre şeklinde olduğu ve pseudoknot gösterdiğini bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Malatya, Elazığ ve Adıyaman illeri badem ve ceviz üretim alanlarındaki *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)'nin araştırılmasını ve moleküler karakterizasyonunu hedefleyen bu çalışma 2019-2020 yıllarında 250 adet badem yaprağı örneği ile 280 adet ceviz yaprağı örneğine moleküler testler uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

PLMVd'nin varlığını araştırmak için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi ile testlenen 250 adet badem yaprağı örneğinde PLMVd enfeksiyonuna rastlanmazken, 280 adet ceviz yaprağı örneğinin 11'inde (Hekimhan-10 örnek, Keban-1 örnek) PLMVd enfeksiyonu tespit edilmiş olup, cevizde PLMVd enfeksiyonunun bulunma oranı %3.9 olarak belirlenmiştir. PLMVd enfeksiyonu, Malatya ili Hekimhan ilçesindeki 10 adet ceviz örneğinde tespit edilirken, Elazığ ili örnekleri içerisinde ise sadece Keban ilçesine ait ceviz örneklerinin birinde tespit edilmiştir. Bu çalışma ile survey gerçekleştirilen illerde ceviz yetiştiricilik alanlarında PLMVd'nin bulunduğu anlaşılmaktadır. PLMVd'nin cevizde tespit edilmesinden dolayı etmenin hangi yollarla taşındığının ve yayıldığına da yapılacak çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir.

Karantinaya tabi olan PLMVd etmeni daha önce EPPO A1 listesinde yer almaktayken, 2019 yılında RNQP (Regulated Non-Quarantine Pests: Annex IV) listesine alınmıştır. Türkiye'de Bitki Karantinası Yönetmeliği'nin Ek-1/A "İthale Mani Teşkil Eden Karantinaya Tabi Zararlı Organizmalar-Türkiye'de varlığı Bilinmeyen ve İthale Mani Teşkil Eden Karantinaya Tabi Zararlı Organizmalar" listesinde yer almaktadır. PLMVd *Prunus* spp.'de karantinaya tabi bir etmen iken, cevizde daha önce dünyada ve Türkiye'de tespit edilmediğinden karantinaya tabi değildir. Yürütülen bu çalışmada, cevizde PLMVd tespit edilmesinden dolayı iç ve dış karantinaya tabi etmen olarak karantina listesine eklenmelidir.

PLMVd tespit edilen Keban örneği (K1 izolatu) ile Hekimhan örneklerinden rastgele seçilen ve H1, H2 ve H3 olarak isimlendirilen 3 PLMVd ceviz izolatının tüm genomları pGEM-T Easy vektörde klonlanarak tespit edilmiştir. Daha güvenilir dizi tespiti için PLMVd izolatlarına ait çift yönlü nükleotid dizileri CLC Main Workbench 20.0.4 programı yardımı ile karşılaştırılarak consensus dizileri elde edilmiş ve bu diziler

Gen Bankasına kaydedilmiştir (PLMVd K1 izolatu Gen bankası Erişim Numarası. MW294170, PLMVd H1 izolatu Gen bankası Erişim Numarası. MW294171, PLMVd H2 izolatu Gen bankası Erişim Numarası. MW294172, PLMVd H3 izolatu Gen bankası Erişim Numarası. MW294173)

CLC Main Workbench 20.0.4 programı aracılığıyla 1000 tekerrürlü olarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. PLMVd ceviz izolatlarının (K1, H1, H2 ve H3) dünyadaki diğer 20 farklı izolatın nükleik asitleri ile %96.7-99.1 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Yine CLC Main Workbench 20.0.4 programı aracılığıyla izolatların (K1, H1, H2 ve H3) ikincil yapıları oluşturulmuş ve dallanmış topolojilerinin birbirleriyle benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca izolatların ikincil yapısı 7 hairpin (saç tokası) yapısından oluşmuş ve pseudoknot gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışma; Malatya, Elazığ ve Adıyaman illeri badem ve ceviz üretim alanlarında PLMVd'nin araştırılması ve moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi açısından oldukça geniş kapsamlı bir çalışma niteliğindedir.

Fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri diğer bitki türlerinde olduğu gibi ceviz ve bademde de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu hastalık etmenlerinin yanısıra sub-viral etmenler olarak bilinen viroidler de bitkilerde önemli ölçüde kayıplara neden olmaktadır.

Viroidler, hastalık etmeni olarak en küçük patojen grubunu oluşturmakta ve ekonomik öneme sahip olan çok sayıda hastalığa neden olmasından dolayı önem arz etmektedir. Viroidler hakkında üreticilerin yeterince bilgiye sahip olmaması, viroidlerin çeşitli yollarla taşınması ve yayılması ve viral hastalık etmenleri gibi viroid etmenlerine karşı da etkili kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması bu hastalık etmenlerinin önemini arttırmaktadır. Enfekte edecekleri konukçularda enfeksiyon oluşturduktan sonra, viroidlerin kontrolü ve mücadelesi oldukça zor olmaktadır. Viroid hastalıklarına karşı şimdiye kadar bir mücadele yöntemi geliştirilemediği için, bu patojenlere karşı alınabilecek en iyi tedbir enfeksiyonlardan korunmaktır.

Viroid etmenlerine karşı mücadelede yapılabilecek en önemli önlemlerden biri sağlıklı ve temiz üretim materyalleri kullanmak ve kullanılan materyallerin viroid etmeninden arı olduğuna dair sertifikalı olup olmadığını kontrol etmektir. Bu kapsamda özellikle fidanlıklar ve damızlık parsellerinde rutin kontroller yapılmalıdır. Bir diğer yöntem ise viroid hastalıklarına karşı dayanıklı bitki ve çeşitlerin kullanılmasıdır. Bunun için ıslah çalışmaları, dayanıklılık çalışmaları ve çapraz koruma (cross protection) ile ilgili konularda daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Viroidlerle mücadele kapsamında karantina önlemlerinin de alınması gereklidir. Özellikle gelişmekte olan bazı ülkelerde, karantina faaliyetlerinin yetersiz ve gelişmemiş olması bitkisel materyallerin ithalatı açısından büyük risk oluşturduğundan bitki materyalinin temin edilmesinde daha hassas davranılmalıdır. Bu nedenle ithal edilecek bitki materyallerinin viroid etmenleri bakımından gerekli testlerin yapılması ve sertifikalarının bulunması gerekmektedir. Bunun için de karantina ile ilgili çalışan kuruluşların, karantina listesinde olan hastalık ve zararlı etmenlerinin rutin kontrollerini yapmaları ve güncellemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Aşı ile taşınan hastalıkların yayılımını sınırlamak için de ülkesel sertifikasyon programının uygulanması önem arz etmektedir.

Viroid etmenleri farklı bitki familyalarında zarar meydana getirmektedir. Ancak bazı familyalardaki bitkilerde latent olarak bulduklarından, polikültür tarımdan kaçınılmalıdır. Ayrıca bazı viroid etmenleri mekanik olarak taşındığından gerekli kültürel önlemler alınmalıdır. Üretim yapılan alanlardan yabancı otlar temizlenmelidir.

Özellikle şeftalilerde PLMVd'nin polenle taşınması rapor edilmesine rağmen, badem ve cevizde hastalığın yayılmasında kök, tohum ve polen gibi olası taşınma yollarının etkili olup olmadığı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yürütülen bu çalışmada bademde PLMVd etmeninin tespit edilememiş olması, bademde PLMVd'nin olmayacağı anlamına gelmemektedir. Daha geniş alanlarda daha yüksek sayıdaki bitkisel numuneler ile yürütülecek survey çalışmaları ile bademde bu etmenin varlığı araştırılmalıdır.

PLMVd cevizde latent olarak bulunsa bile, şeftali, nektarin, badem ve kayısı gibi hassas ürünlere potansiyel olarak taşınmalarından kaçınmak için bu patojenin eradikasyonu ile ilgili başka çalışmalar yapılmalıdır.

Kontamine olan budama aletleri meyve bahçelerinde viroidin yayılmasında önemli rol oynayabilir. Bu nedenle kullanılan alet ve ekipmanlar %2'lik sodyum hipokloritle dezenfekte edilmelidir. PLMVd'nin afit *Myzus persicae* ile deneysel olarak düşük miktarda taşındığı rapor edilmesine rağmen, bu vektör tarafından doğal olarak taşıyıp taşınmadığı henüz çalışılmamıştır. Meyve bahçelerinde PLMVd'nin doğal yayılması polenle ya da aşılama ile olduğundan, olası konukçular daha fazla polen ve aşı için PLMVd rezervuarı olarak hizmet edebilir.

PLMVd etmeninin deneysel ve doğal konukçu aralığının belirlenmesi ve PLMVd ceviz izolatlarının enfekte ettikleri alanda olası tohum ve polen ile taşınmasının belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ceviz bahçelerinde PLMVd'nin varlığı, taşınması, yayılması, ekonomik etkisi ve böcek vektörlerini belirlemek için de ek çalışmalar gerekmektedir.

Yürütülen bu çalışma ile PLMVd'nin yeni konukçusu olan cevizdeki varlığı Malatya ve Elazığ illerindeki ceviz yetiştiricilik alanlarında ilk defa tespit edilmiş olup PLMVd'nin genom özellikleri moleküler yöntemler ile ortaya konulmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Adkar-Purushothama, C.R., Perreault, J.P., (2019). Current overview on viroid–host interactions. *WIREs RNA*. 2020; 11: e1570.
- Al Rwahnih, M., Myrta, A., Abou-Ghanem, N., Di Terlizzi, B., Savino, V., (2001). Viruses and viroids of stone fruits in Jordan. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31, 95-98.
- Albanese, G., Giunchedi, L., La Rosa, R., Poggi-Pollini, C., (1992). Peach latent mosaic viroid in Italy. *Acta Hort.* 309:331-338.
- Barba, M., Ragozzino, E., Faggioli, F., (2007). Pollen Transmission Of *Peach Latent Mosaic Viroid*. *Journal of Plant Pathology* (2007), 89 (2), 287-289.
- Barreca, D., Nabavi, S.M., Sureda, A., Rasekhian, M., Raciti, R., Silva, A.S., Annunziata, G., Arnone, A., Tenore, G.C., Süntar, İ., Mandalari, G., (2020). Almonds (*Prunus Dulcis* Mill. D. A. Webb): A Source of Nutrients and Health-Promoting Compounds. *Nutrients*, cilt.12, sa.3.
- Bayazit, S., Tefek, H., Çalışkan, O., (2016). Türkiye’de Ceviz (*Juglans regia* L.) Araştırmaları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 11 (1):169-179.
- Bitters, W.P., (1952). Exocortis disease of citrus *California Agriculture* 6:5-6.
- Bussiere, F., Ouellet, J., Coˆte’, F., Le’vesque, D. and Perreault, J. P., (2000). Mapping in Solution Shows the *Peach Latent Mosaic Viroid* to Possess a New Pseudoknot in a Complex, Branched Secondary Structure. *J. Virol.*, 74: 2647– 2654.
- Crescenzi, A., Piazzolla, P., Hadidi, A., (2002). First Report Of *Peach Latent Mosaic Viroid* In Sweet Cherry In Italy. *Pathology* (2002), 84 (2), 167-168.
- Daros, J.A., Daros, S., Elena Flores, R., (2006). Viroids an Ariadne's thread into the RNA labyrinth, *EMBO Rep.* 7 (2006), pp. 593–598.
- Delgado, S., Martínez de Alba, E., Hernández, C. and Flores, R., (2005). A short double-stranded RNA motif of peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.* 79, 12934–12943.
- Desvignes, J.C., (1980). Different symptoms of the peach latent mosaic. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 15, 183–190.
- Desvignes, J.C., (1981) Epidemiologie de la mosaïque latent du pêcher (PLMVd). 1er Colloque sur les Recherches Fruitières Bordeaux, 263–276.
- Desvignes, J.C., (1986). Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow virus diseases. *Acta Hort.* 93:51–57.
- Desvignes, J.C., Flores, R., Llacer, G., (1992). Les maladies de de’ ge’ ne’ rescence des arbres fruitiers provoque’ es par des viroi” des. *Phytoma La De’fense des ve’ge’taux* 444:70–74.

- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J. T., Li, S. F., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Vidalakis, G. and Owens, R. A., (2014). Current Status of Viroid Taxonomy. *Arch. Virol.*, 159: 3467–3478.
- Di Serio, F., Li, S., Matoušek, J., Owens, R.A., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J.Th.J., Vidalakis, G., Flores, G., (2020). Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature *Avsunviroidae* Chapter.
- Diekmann, M., Putter, C.A.J., (1996). Stone Fruits. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Publication Office IPGRI, Rome.
- Diener, T.O., Raymer, W.B., (1967). Potato Spindle Tuber Virus: A plant Virus with Properties of Nucleic Acid Science 158:378-381.
- Dubé, A., Baumstark, T., Bisailon, M., & Perreault, J. P., (2010). The RNA strands of the plus and minus polarities of peach latent mosaic viroid fold into different structures. *RNA*, 16(3), 463–473. <https://doi.org/10.1261/rna.1826710>.
- Dubé, A., Bolduc, F., Bisailon, M., Perreault, J.P., (2011). Mapping studies of the *Peach latent mosaic viroid* reveal novel structural features *Molecular Plant Pathology* (2011) 12(7), 688–701.
- Eldoğan, Ü., 2020. Dünyada ve Türkiye’de badem. *Antep Fıstığı Araştırma Dergisi*. Sayı: 8.
- El-DougDoug, K. A., Dawoud, R. A., Rezk, A. A., Sofy, A. R., (2012). Incidence of Fruit Trees Viroid Diseases by Tissue Print Hybridization in Egypt. *Int. J. Virol.*, 8: 114–120.
- Erkan, S., Sipahioğlu, H. M., Gümüş, M., (2016). Viroidler ve Bitkilerdeki Viroid Hastalıkları. *Meta Basım Matbaacılık, Bornova – İzmir*.
- Faggioli, F., Loreti, S., Barba, M., (1997). Occurrence of Peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Dis* 81:423.
- FAO, (2020a). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- FAO, (2020b). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- FAO, (2020c). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- FAO, (2020d). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- FAO, (2020e). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- FAO, (2020f). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.

- FAO, (2020g). Food and Agriculture Organization of The United Nation, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi: 18.12.2020.
- Fekih Hassen, I., Kummert, J., Marbot, S., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Juaklı, M.H., (2004). First report of Pear blister canker viroid, Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid infecting fruit trees in Tunisia. *Plant Dis* 88:1164.
- Fekih Hassen, I., Marbot, S., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Juaklı, M.H., (2005). Peach latent mosaic viroid detected for the first time on almond trees in Tunisia. *Plant Dis* 89:1244.
- Fekih Hassen, I., Roussel, S., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Juaklı, M.H., (2006). Development of a rapid RT-PCR test for the detection of Peach latent mosaic viroid, Pear blister canker viroid, Hop stunt viroid and Apple scar skin viroid in fruit trees from Tunisia. *J. Phytopathology* 154:217-223.
- Fekih Hassen, I., Massart, S., Roussel, S., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Juaklı, M.H., (2007). Distribution of *Peach latent mosaic viroid* in commercial orchards of peach in the North of Tunisia. *J. Phytopathology* 155:403-408.
- Fiore, N., Zamorano, A., Pino, A.M., González, F., Rosales, I.M., Sánchez-Navarro, J.A., Pallás, V., (2016). Survey Of Stone Fruit Viruses And Viroids In Chile. *Journal of Plant Pathology* (2016), 98 (3), 631-635.
- Flores, R., Llacer, G., (1988). Isolation of a rod-like RNA associated with peach latent mosaic disease, *Acta Hort.* 235:325–332.
- Flores, R., Hernandez, C., Desvignes, J. C., Llacer, G., (1990). Some properties of the viroid inducing peach latent mosaic disease *Res. Virol.* 141:109- 118.
- Flores, R., Hernandez C., Avinent, L., Llacer, G., Arregui, J.M., Hermoso, A., Juarez, J., Navarro, L., Desvignes, J.C., (1992). Studies of the detection transmission and distribution of Peach latent mosaic viroid (PLMVd) in peach trees. *Acta Hort* 309:325–330.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O., (2000). Subviral agents: viroids. Pages 1009-10024 in: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., De la Pena, M., (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567 (2004) 42–48.
- Flores, R., Delgado, S., Rodio, M.E., Ambrós, S., Hernández, C., Di serio, F., 2006. Peach latent mosaic viroid: not so latent. *Molecular Plant Path* 7(4): 209–221.
- Flores, R., Minoiaa, S., Carbonell, A., Gisel, A., Delgadoa, S., López-Carrascoa, A., Navarroe, B., Di Serioe, F., (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research* 209 136–145.

- Gazel, M., Ulubas Serce, C., Caglayan, K., Luigi, M., Faggioli, F., (2008). Incidence and Genetic Diversity of Peach Latent Mosaic Viroid Isolates In Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 90 (3), 495-503.
- Gülsoy, E., Kaya T., Şimşek, M. Pehlivan, M., (2016). Iğdır Yöresi Cevizlerinin (*Juglans regia* L.) Seleksiyonu. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 6(1): 25-30.
- Gümüş, M., Paylan, İ. C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioğlu, H. M., 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 (2): 265-268 JUL 2007.
- Hadidi, A., Giunchedi, L., Shamloul, A.M., Poggi-Pollini, C., Amer, M.A., (1997). Occurrence of Peach latent mosaic viroid in Stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Dis* 81:154–158.
- Hassen, M., Zouhar M., Rysanek, P., (2004). Development of a PCR method of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* detection for certification of planting material. *Acta Horticulturae* (No.657): 391-395.
- Hassen, I. F., Roussel, S., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi M., Jijakli, M. H., (2005). Detection and epidemiological characteristics of *Peach latent mosaic viroid* in Tunisia. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70 (3): 115-128.
- Hernandez, C., Flores, R., (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self cleave in vitro via hammerhead structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3711–3715.
- ICTV, (2020). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>. Erişim tarihi: 24.06.2021.
- Jevremović, D., Paunović, S., (2014). Low incidence of *Peach latent mosaic viroid* in peach mother blocks in Serbia. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade), 29(2), 109–114.
- Jo, Y., Yoo, S.H., Chu, H., Cho, J.K., Choi, H., Yoon, J.Y., Choi, S.K., Cho, W.K., (2015). Complete Genome Sequences of *Peach Latent Mosaic Viroid* from a Single Peach Cultivar. *Genome Announc* 3(5): e01098-15. doi:10.1128/genomeA.01098-15.
- Kapluhan, E., (2015). Ziraat Coğrafyası Açısından Bir İnceleme: Kaman İlçesinde (Kırşehir) Ceviz Üretim Faaliyetleri. *Marmara Coğrafya Dergisi* Sayı: 32, Temmuz- 2015, S.147-170.
- Karagahi, M., Hajzadeh, M., (2020). Molecular Characterization of *Peach Latent Mosaic Viroid* Variants Isolated From Stone Fruit Trees in Kurdistan Province, Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* Vol. 22(4): 1109-1122.
- Koç, G., (2010). Doğu Akdeniz Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde *Plum pox potyvirus* (PPV, Sharka)'ünün Durumunun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 227 S.

- Küden, A.B., Küden, A., Bayazit, S., Çömlekçioğlu, S., İmrak, B., Rehber Dikkaya, Yeşim., (2014). Badem Yetiştiriciliği. TAGEP Proje No.: 5.2.3.1.
- Kyriakopoulou, P.E., Giunchedi, L., Hadidi, A., (2001). Peach latent mosaic viroid and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region, *J. Plant Pathol.* 83:51–62.
- Lee, H.J., Kim, H.J., Lee, K., Jeong, R.D., (2020). Rapid detection of peach latent mosaic viroid by reverse transcription recombinase polymerase amplification. *Molecular and Cellular Probes* 53 101627.
- Loreti, S., Faggioli, F., Cardoni, M., Mordenti, G., Babini, A. R., Poggi Pollini C., Barba, M., (1999). Comparison of different diagnostic methods for detection of *Peach latent mosaic viroid*. *EPPO Bulletin Volume 29 Issue 4*, Pages 433 – 438.
- Maghraby, I. El., Matic, S., Fahmy, H., Myrta, A., (2007). Viruses and viroids of stone fruits in Egypt. *Journal of plant pathology*, 89 (3), 427-430.
- Malfitano, M., Di Serio, F., Covelli, L., Ragozzino, A., Herna'ndez, C., Flores, R., (2003). Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* 313 492–501.
- Mandic, S.M., Al Rwahnih, M., Myrta, A., Gomez, G., Pallas, V., (2008). Incidence and genetic diversity of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in stone fruits in Serbia, *Eur. J. Plant Pathol.* 120:167–176. *Mediterranea* 42 (1) : 79-84 2003.
- Mandic, S.M., Al Rwahnih, M., Myrta, A., Gomez, G., Pallas, V., (2008). Incidence and genetic diversity of peach latent mosaic viroid and hop stunt viroid in stone fruits in Serbia, *Eur. J. Plant Pathol.* 120:167–176.
- Mandic, S.M., Al Rwahnih, M., Myrta, A., Gomez, G., Pallas, V., (2008). Incidence and genetic diversity of peach latent mosaic viroid and hop stunt viroid in stone fruits in Serbia, *Eur. J. Plant Pathol.* 120:167–176.
- Micke, W.C., (1996). Almond Production Manual. Publication no: 3364, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, Oakland (US).
- Ogawa M. J., Zehr, I. E., Bird, W. G., Ritchie, F. D., Uriu, K., Uyemoto, K.J., (1995). *Compendium Of Stone Fruit Diseases*, Page: 69, The American Phytopathological Society Press.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2008). Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2326–2331.
- Osaki, H., Yamaguchi, Y., Sato, Y., Tomita, Y., Kawai, Y., Miyamoto, Y., Ohtsu, Y., (1999). Peach latent mosaic viroid isolated from Stone fruits Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 65:3–8.

- Pallás, V., Amari, K., Gomez, G., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Di Serio, F., (2007). Viroids Of Stone Fruits: Incidence and Diseases In The Mediterranean. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b45/03001785.pdf> (16.07.2007).
- Pallás, V., Amari, K., Gomez, G., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Di Serio, F., (2003). Viroids Of Stone Fruits: Incidence And Diseases In The Mediterranean. Bari: CIHEAM, 2003. p. 129-133 (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 45).
- Pelchat, M., Levesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Levesque, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Eastwell, K. C., Skrzeczkowski, L. J. and Perreault, J. P., (2000). Sequencing of *Peach Latent Mosaic Viroid* Variants from Nine North American Peach Cultivars Shows that This RNA Folds into a Complex Secondary Structure. *Virology*, 271: 37–45.
- Pezikoğlu, F., Öztürk M., Tosun İ., Akça Y., (2014). Türkiye’de Seçilmiş Bazı İllerde Ceviz Yetiştiriciliğinin Üretim ve Pazarlama Yapısı. XI. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi 3-5 Eylül 2014, Samsun.
- Ragozzino, E., Faggioli F., Barba, M., (2004). Development of a one tube one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. *Journal of Virological Methods* Volume 121, Issue 1, Pages 25-29.
- Ragozzino, E., Faggioli, F., Alioto D., Barba, M., (2003). Detection and differentiation of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in stone fruit trees in Italy using multiplex RT-PCR. *Phytopathologia Mediterranea* 42 (1): 79-84.
- Ragozzino, E., Faggioli, F., Barba, M., (2004). Development of an one-tube RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. *J. Virol. Methods* 121:25–29.
- Randles, J.W., (2003). Economic Impact of Viroid Diseases pp. 3-11.
- Rouag, N., Guechi, A., Matic, S., Myrta, A., (2008). Viruses and viroids of stone fruits in Algeria. *Journal of plant pathology* (2008), 90 :29, 393-395.
- Rubio, M., García-Ibarra, A., Soler, A., Martínez-Gómez, P., Dícenta, F., (2013). Relationship of viruses and viroids with apricot “viruela” disease. *Phytopathologia Mediterranea* (2013) 52, 1, 148–153.
- Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A., ve Al-Nsour, A., 2003. Seasonal variation of *Prunus necrotic ringspot virus* concentration in almond, peach and plum Cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 42, 155-160.
- Semancik, J.S., Szychowski, J.A., (1992). Relationships among the viroids derived from grapevines. *Gen. Virol.* 73:1465-1469.
- Shamloul A.M., Faggioli, F., Keith J.M., Hadidi, A., (2002). A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid*, and *Pospiviroid*. *Journal of Virological Methods* 105 (1): 115-121 AUG 2002.

- Shamloul, A.M., Hadidi, A., (1999). Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction–probe capture hybridization, J. Virol Methods 80:145–155.
- Shamloul, A.M., Minafra, A., Hadidi, A., Giunchedi, L., Waterworth, H.E., Allam, E.K., (1995). Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution, Acta Hortic. 386:522–530.
- Sipahioğlu, H. M., Demir, S., Myrta, A., Al Rwahnih, M., Polat, B., Sehena, L., Usta, M., Akköprü, A., Selçuk, M., Ippolito, A., Minafra, A., (2006). Viroid, phtoplasma and fungal diseases of Stone fruit in eastren Anatolia, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34:1-6.
- Şen, S.M. 1986. Ceviz Yetiştiriciliği. Eser Matbaası, Samsun, 229s.
- Tuncel, F., Tekkaş, N., Türk, G., Oksal, H.D., Sipahioğlu, H.M., (2020). First Detection and Molecular Characterization of *Peach latent mosaic viroid* in a New Natural Host: Walnut (*Juglans regia* L.). Alinteri J. of Agr. Sci. ISSN: 2587-2249.
- TÜİK, (2020a). Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>. Erişim tarihi: 19.08.2020.
- TÜİK, (2020b). Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>. Erişim tarihi: 19.08.2020.
- TÜİK, (2020c). Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>. Erişim tarihi: 19.08.2020.
- TÜİK, (2020d). Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>. Erişim tarihi: 19.08.2020.
- Uyemoto, J.K., Scott, SW., (1992). Important Diseases of Prunus Caused by Viruses and Other Graft-Transmissible Pathogens in California and SouthCarolina. Plant Diseases 76: 5-11.

