

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İzzet GÜVELOĞLU

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ NAR BAHÇELERİNDE
HASTALIKLARA SEBEP OLAN VİRÜS VE FİTOPLAZMA
ETMENLERİNİN SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ NAR BAHÇELERİNDE HASTALIKLARA
SEBEP OLAN VİRÜS VE FİTOPLAZMA ETMENLERİNİN
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İzzet GÜVELOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 10/02/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Doç. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR

Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Doç. Dr. Gökmen KOÇ

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ NAR BAHÇELERİNDE HASTALIKLARA SEBEP OLAN VİRÜS VE FİTOPLAZMA ETMENLERİNİN SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU

İzzet GÜVELOĞLU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR
Yıl: 2022, Sayfa: 46
Jüri : Doç. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR
: Prof. Dr. M. Ertuğrul Güldür
: Doç. Dr. Gökmen KOÇ

Bu araştırma meyve türleri içerisinde önemli bir yeri olan ve Dünyada ve ülkemizde üretim alanları her geçen gün artan Nar (*Punica granatum*) bitkisinde hastalıklara neden olan virüs ve fitoplazma etmenlerinin saptanması ve karakterizasyonu amacıyla 2020-2021 yıllarında yürütülmüştür. Adana ve Mersin illeri ve ilçelerinde nar bahçelerinde yapılan surveyler sonucu bitkilerde geriye doğru ölümler, yapraklarda deformasyon, sararma, kızarmalar ve kloroz belirtileri gözlenmiştir. Söz konusu belirtilerin sebepleri virüsler ve fitoplazmalar açısından araştırılmıştır. Total Nükleik Asit (tNA) izolasyonu yapılan örneklerden elde edilen tNA' larda nar çeşitlerinde enfeksiyona neden olabileceği düşünülen muhtemel ApMV, PNRSV, SLRV, ArMV, ASGV, CLRV, RpRSV, ToRSV, CMV, GLRaV, AMV virüsleri ve fitoplazma etmenlerinin varlığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla laboratuvar testleri sırasında şüpheli bitki materyallerine ait tNA' ler virüslere ve fitoplazmaya spesifik primer çiftleri kullanılarak RT-PCR, PCR yöntemleri ile testlenmiştir. Universal primer çifti kullanılarak önce direct PCR, daha sonra nested primer çifti kullanılarak nested PCR ile fitoplazma etmenlerine karşı testlenmiştir. Sonuç olarak örnekleme yapılan nar bahçelerinde testlemeler sonucunda örneklerin söz konusu virüsler ve fitoplazma açısından sağlıklı olduğu saptanmıştır. Buna sebep olarak vejetatif yöntemlerle klonal olarak üretim yapılan kaynakların testlenen etmenlerden ari olabilme ihtimalinin yanı sıra, yoğun olarak kullanılan pestisitlerin potansiyel vektörleri sınırlandırması, nar bitkisi bünyesinde bulunan fenolik yada antioksidan içerikteki bileşenler gibi nedenler sıralanabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nar, Virüs, Fitoplazma, RT-PCR, Nested PCR

ABSTRACT

MSc. THESIS

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF VIRUS AND PHOTOPLASMA AGENTS CAUSING DISEASES IN POMEGRANATE ORCHARDS IN THE EASTERN MEDITERRANEAN REGION

İzzet GÜVELOĞLU

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR
Year: 2022, Page: 46
Jury : Assoc. Prof. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR
: Prof. Dr. M. Ertuğrul Güldür
: Assoc. Prof. Dr. Gökmen KOÇ

This research was carried out in the years 2020-2021 in order to determine and characterize the viruses and phytoplasma agents that cause diseases in the pomegranate (*Punica granatum*) plant, which has an important place among the fruit species and whose production areas are increasing day by day in the world and in our country. As a result of the surveys carried out in the pomegranate orchards in Adana and Mersin provinces and districts, backward death of the plants, deformation of the leaves, yellowing, redness and signs of chlorosis were observed. The causes of these symptoms were investigated in terms of viruses and phytoplasmas. The presence of ApMV, PNRSV, SLRV, ArMV, ASGV, CLRV, RpRSV, ToRSV, CMV, GLRaV, AMV viruses and phytoplasma agents, which are thought to cause infection in pomegranate cultivars, were checked in the tNAs obtained from the samples isolated from Total Nucleic Acid (tNA). For these purposes, tNAs of suspected plant materials were tested by RT-PCR and PCR methods using primer pairs specific to viruses and phytoplasma agents during laboratory tests. It was tested against phytoplasma agents first by direct-PCR using a universal primer pair and then by nested-PCR using a nested primer pair. As a result, as a result of the tests in the pomegranate orchards, the samples were found to be healthy in terms of the viral and phytoplasma. The reason for this can be listed as the possibility that the sources produced clonally by vegetative methods may be free from the tested factors, as well as the limitation of the potential vectors of the pesticides used extensively, the phenolic or antioxidant components in the pomegranate plant.

Key words: Pomegranate, Virus, Phytoplasma, RT-PCR, Nested PCR

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu araştırma meyve türleri içerisinde önemli bir yeri olan ve son yıllarda dünyada ve ülkemizde üretim alanları artan Narda (*Punica granatum*) özellikle bölgemiz için virus ve fitoplazma hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu amacıyla yürütülmüştür. Araştırma da Adana, Mersin illerinin içinde yer aldığı Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki nar bahçeleri çalışmanın esas materyallerini oluşturmuştur. Bölgede ticari anlam da nar yetiştiriciliği yapılmakta olup, söz konusu narlardan çalışma amacına uygun olarak yaprak, sürgün örnekleri alınmıştır. Nar ağaçlarında yapılan gözlemlerde geriye doğru ölümler, yapraklarda değişik tipte deformasyon ve sararma ya da kızarmalar ve ağaç genelinde deformasyonlar görülmüştür. Önemsenmediği takdirde muhtemelen eğer viral bir etmen ise hem çoğaltma materyalleri ve hem de hasat ya da budama faaliyetleri ile bu belirtiler giderek yayılmaya devam edecektir. Bu nedenle Doğu Akdeniz Bölgesi Nar popülasyonunda belirti gösteren ağaçlardan bitki örnekleri alınıp moleküler yöntemlerle testlenmiştir.

Total Nükleik Asit İzolasyonu, RT-PCR ve Agaroz jel çalışmalarında kullanılan materyaller moleküler çalışmalarda özellikle nükleik asit izolasyonun da kullanılan ekstraksiyon buffer için gerekli olan Glycine-NaOH, NaCl, EDTA, Sodium dodecyl sulfate, Sodium diethyldithiocarbamate [DİECA-Na], Sodyum asetat $CH_3COONa(3M)$, Potasyum asetat, Etil Alkol gibi kimyasallar firmalardan temin edilmiştir. Total RNA ekstraksiyon çalışmalarında virüs ile infekteli, bitkilerin genç yapraklarından elde edilen bitki özsu kullanılmıştır.

Çalışmada ve ticari kitler ile Elma Mozaik Virüsü, Erik Halkalı Leke Virüsü, Çilek Latent Ringspot Virüsü, Asma Mozaik Virüs, Elma Gövde Yivleşme Virüsü, Kiraz Halkalı Leke Virüsü, Raspberry Halkalı Leke Virüsü, Domates Halkalı Leke Virüsü, Hıyar Mozaik Virüsü, Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü, Yonca Mozaik Virüsü araştırılmıştır.

PCR çalışması sırasında hedef nükleik asitlerin çoğaltılması için RT-PCR çalışmalarında kullanılan 200 µl'lik PCR eppendorf tüpleri, izolatlara ait NA'lerin komplementer DNA (cDNA)'e dönüştürülmesi için gerekli olan Reverse Transcriptase

enzimi (M-MLV, 200u/μl), RT buffer (M-MLV buffer 5X), RNAse inhibitörü (40/μl), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100mM)), RNA'in hedef bölgesine spesifik tek iplikli oligonükleotid primer çiftleri, (Tablo 5) Taq polimeraz (5u/μl), PCR buffer (10X) kullanılmıştır.

Total NA ekstraksiyonu sonucunda elde edilmiş olan virüs izolatlarına ait total NA'ler, RT-PCR çalışmaları ile çoğaltılan RT-PCR ürünlerinin kontrolünde kullanılan agaroz ve DNA marker firmalardan satın alınmıştır. Çalışmalar viroloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Survey çalışmalarında Adana ve Mersin İllerindeki kapama nar bahçeleri veya münferit ev bahçelerinde virüs ve fitoplazma ya da tanımlanamayan anormallikler gösteren ağaçlardan geç sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Örneklemeye çalışmaları 2020 yılı Eylül ve 2021 yılı Mayıs tarihleri arasında yapılmış, Adana ve Mersin İllerinden 137 örnek toplanmıştır. Örneklerin 99 tanesi Adana, 38 tanesi Mersin illerinden alınmış olup sayılar bahçe ve bahçelerde belirti gösteren ağaç sayılarına bağlı olarak belirlenmiştir. Alınan her bir örnek kodlanmış, resimleri çekilip etiketlenmiştir. Alınan örnekler ayrı ayrı torbalanıp buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiş ve buzdolabında muhafaza edilmiştir. Örnekler alındıktan sonra 12 saat içerisinde analize başlanmıştır.

Bitki örnekleri moleküler çalışmalardan önce + 4 °C'de, çalışmalardan sonra - 20°C'de muhafaza edilmiştir. İn-vitro testleme işlemleri Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Survey çalışmalarında şüpheli nar bitkilerinin simptomlu yapraklarından total NA ekstraksiyonu yapılmıştır. Total NA izolasyonu Astruc ve ark., (1996)'nın önerdiği yönteme göre yapılmıştır.

Çalışmada toplanan örneklerde mevcut virüs ve fitoplazma hastalıklarının saptanması ve tanınması amacıyla, RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) çalışmaları yapılmıştır. RT-PCR yöntemi, öncelikle ticari olarak ELISA kiti temin edilemeyen ve dolayısıyla serolojik olarak saptanamayan virüsler ve kontrol amacıyla diğer virüsler için uygulanmıştır.

Bu amaçla yapılmış çalışmalarda, bulaşık bitkilerin dokularından elde edilmiş total nükleik asitler kullanılmış ve Astruct ve ark., (1996) göre çalışma yürütülmüştür.

PCR yöntemi, saptanan virüslerin moleküler karakterizasyonu için gerekli olan PCR ürünlerinin elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

DNA yapısındaki virüsler için direkt olarak PCR aşaması uygulanırken, RNA yapısındaki virüsler için RT aşaması yapıldıktan sonra PCR işlemine geçilmiştir. Birinci aşama olan RT (Reverse transcription) aşamasında cDNA'lar elde edilmiş ve ikinci aşamada ise, bu cDNA'lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır.

I. RT aşamasında; her PCR tüpüne, 1 µl total NA 1 µl reverse primer ve 13 µlH₂O konularak 95 °C'de 3 dakika bekletilmiş, daha sonra tüpler buz üzerine alınmıştır. Bu PCR tüplerine, 5,9 µl saf su, 2,5 µl RT buffer, 1 µl dNTP (2 mM), 0.3 µl RNase inh ve 0.3 µl RT enzimi ilave edilerek, 42 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

II. PCR aşamasında, 1 µl cDNA, 5 µl, PCR (10X) buffer, 1µl dNTPs (10 mM), 1 µl PrR, 1 µl PrF, 0,250 µl Taq, 40,75 µlH₂O ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler çizelge 1'deki gibi olmuş şekilde ayarlanarak thermocycler' a yerleştirilmiş ve böylece PCR işlemi tamamlanmıştır.

Diğer yandan söz konusu örnekler üniversal ve nested primer çiftleri kullanılarak Direct ve Nested PCR ile fitoplazma etmenine karşı testlenmiştir.

Agarose Gel Elektroforez çalışmalarında viral etmenlere karşı yapılan RT-PCR ürünleri ve Nested-PCR ürünleri kontrol edilmiş ve sonuçlar Ultraviole (UV) transilluminatör de görüntülenmiştir.

Araştırma kapsamında surveyler süresince toplanan nar bitkilerinde herhangi bir infeksiyon saptanmamış ve bütün bitkisel örnekler testlenen virüs ve fitoplazma etmenleri açısından sağlıklı bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince benden hiçbir yardımını esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR' a,

Bütün çalışmalarımı yakından takip edip yol gösteren ve çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan sayın, Prof. Dr. Saadettin BALOĞU, Doç. Dr. Gökmen KOÇ, Zir. Yük. Müh. Dilan KONUR, Zir. Yük. Müh. Ali GÜNEŞ ve tüm Subtropik Meyveler Araştırma Merkezi çalışanlarına,

İhtiyaç duyduğum her an değerli bilgilerini benimle paylaşan tüm Bitki Koruma Bölümü hocalarıma,

Beni bugünlere getiren maddi/manevi desteğini esirgemeyen ve hep arkamda olan sevgili aileme, meslektaşlarım; eşim Aysel GÜVELOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller	17
3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller	20
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Survey Çalışmaları ve Örneklerin Toplanması	24
3.2.2. Moleküler Çalışmalar.....	24
3.2.2.1. Nar Bitkisi Örneklerinin PCR Testleri için Hazırlanması.....	25
3.2.3.2. Total Nükleik asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	25
3.2.3.3 DNA izolasyonu.....	26
3.2.3.3. RT- PCR (Reverse Transcriptase Polimeraz Chain Reaction) Çalışmaları.....	27
3.2.3.4. Fitoplazmalar için Direct ve Nested PCR Çalışmaları.....	28
3.2.3.5. Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	31
4.1. Simptomolojik Gözlemler.....	31
4.2. Moleküler Çalışmalar.....	31

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	41
EKLER.....	43



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Narın sistematikteki yeri	3
Çizelge 1.2	Türkiye’deki son 10 yılda nar üretim alanları, ağaç sayıları, verim miktarları ve üretim alanları istatistikleri.	5
Çizelge 1.3.	Araştırmanın yapıldığı illerin, bölge ve Türkiye Nar üretim verilerinin karşılaştırılması tablosu.	6
Çizelge 1.4.	Türkiye’deki son 10 yılda üretici bazında meyve fiyatları tablosu.	7
Çizelge 3.1.	İl ve İlçelere göre alınan örnek sayıları	18
Çizelge 3.2.	Çalışmada araştırılmış virüs hastalıkları	21
Çizelge 3.3.	Çalışmada patojenlere ait kullanılmış primer çiftleri	23
Çizelge 4.1.	Çalışmada testlenen virüs ve fitoplazmalar ve PCR sonuçları	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Ülkemizde bölgelere göre 2018 yılı nar üretim oranları.....	4
Şekil 1.2	Türkiye'deki son 10 yılda kapama nar bahçeleri alanları ve üretim miktarları grafiği.....	6
Şekil 1.3	Türkiye'deki son 10 yılda nar ihracat miktarı grafiği.....	8
Şekil 3.1.	Survey çalışmalarında Adana İli Sarıçam İlçesi Çiçekli Mahallesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri	18
Şekil 3.2.	Survey çalışmalarında Adana İli Sarıçam İlçesi Çaylı Mahallesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri	19
Şekil 3.3.	Survey çalışmalarında Adana İli Ceyhan İlçesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri.....	19
Şekil 3.4.	Survey çalışmalarında Mersin İli Tarsus İlçesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri.....	20
Şekil 4.1.	Survey çalışmalarında tespit edilen simptomlu örnek fotoğrafları	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

ApMV	: Apple Mosaic Virüs
ArMV	: Arabis Mosaic Virüs
ASGV	: Apple Stem Pittin Virus
AMV	: Alfalfa Mosaic Virus
CLRV	: Cherry Leaf Roll Virus
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleikacid
CMV	: Cucumber Mosaic Virus
CP	: Coat Protein (Kılıf protein)
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzim-Linked Immunosorbent Assay
GLRaV	: Grapevine Leaf Roll Ass. Virus
Hc-pro	: Yardımcı komponent proteinaz
HSVd	: Hop Stunt Viroid
ORF	: Okunabilir açık alanlar
PAGE	: Polyacrylamide Gel Elektroforezi
PBS	: Potasyum fosfat-tuz tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRNSV	: Prunus Necrotik Virüs
Pmol	: Pikomol
PVP	: Polyvinylpyrolidone
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAsein	: RNase inhibitörü
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RpRSV	: Raspberry Ring Spot Virus
RT	: Reverse Transcriptase
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

SLRV	: Strawberry Latent Ringspot Virus
ssRNA	: Single Stranded RNA
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
Tm	: Thermal melting
tNA	: total Nükleik Asit
ToRSV	: Tomato Ring Spot Virus
tRNA	: Transfer RNA
VLP	: Virüs benzeri partikül

1. GİRİŞ

İlk kültüre alınan bitkilerden biri olan nara insanlar tarih boyunca farklı değerler yüklemiştir. Bütün kutsal kitaplarda bahsedilen nar bitkisi bazen ülkeleri temsil eden sembol olmuş, bazen medeniyetlerin en önemli yapılarında gravür ve tablolarında görülmüştür. Nar önemli bir besin olmasının dışında kabukları ve çiçeği kumaş ve yün boyamada, süslemede kullanılmaktadır. Günümüzde teknolojik gelişmeler ve insanların doğala ve organik ürünlere ilgisinin artmasıyla beraber nar meyvesi takviye edici gıdalarda, makyaj malzemeleri üretiminde de söz sahibi olmuştur (Kurt ve Şahin, 2013).

Türkçe kökenli bir kelime olan “Nar” mitolojik bir meyvedir. İnsanoğlu yüzyıllar boyunca denemeleri sonucunda birçok hastalığa şifa kaynağı olarak nar bitkisini kullanmıştır. Kültürün günlük yaşamın her ögesinde narla karşılaşılır; türküler, ninniler, destanlar, bilmece sadece bir kaçındır. Nar, cennetin meyvesi bolluğun sembolüdür. Kırmızı rengi ve yuvarlak şekliyle mitolojide ve tasvirlerde güneşe eş tutulmuştur. Verimli olması, meyve ve danelerinin çok olması nedeniyle evliliği, yeniden doğuşu, bolluğu, ölümsüzlüğü dile getirmektedir. Atalarımızdan miras kalan kültürü yaşatmak, birlik ve beraberliğin gücünü gösterip kültürel değerlerimizi ölümsüz kılmayı nar temsil etmektedir (Şenocak, 2016).

Narın anavatanının hazar gölünün çevresindeki coğrafi alanlar ve Kuzey Hindistan olduğu tahmin edilmektedir. Yüzlerce yıldır Asya ve Avrupa'nın uygun iklimsel değerlere sahip her ülkesinde tarımı yapılan nar bitkisi günümüzde Afrika kıtası, Amerika Kıtası, Avustralya'ya kadar elverişli koşullara sahip dünyanın her yerinde tarımı yapılmaktadır (Kurt ve Şahin, 2013).

İlkçağlardan bugüne şifa kaynağı olarak görülen nar bitkisi geçmişten bu yana ateş düşürücü olarak kullanılmakta iken son yıllarda gıda teknolojisi ve tıptaki bilimsel çalışmalar sonucu antioksidanlar, vitaminler, polifenolik maddelerce zengin olduğu belirlenmiştir. İçeriğindeki bu maddeler nedeniyle birçok kanser türünü, kalp ve damar hastalıklarını, önlemede etkin

olduğu tansiyon hastalarında yüksek kan basıncını düşürdüğü belirlenmiştir. Ekşi nar meyvelerinden sirke ve sitrik asit üretiminde kullanılmakla beraber nar ekşisi gibi özel soslarda yapılmaktadır. Özellikle tıp alanında yapılan bilimsel çalışmalar ve yayım faaliyetleri sonucu basın yayın organlarında ve internet ortamında nar meyvesinin öneminin geniş kitlelerce anlaşılıp kabul görmesi sonucu tüketimi son 20 yılda çok hızlı artmış hatta nar daneleri meyve salataları, pasta, tatlı gibi ürünlerin üzerinde direk kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde meyve suyu sanayiinde nar suyunun önemli bir yeri vardır. Meyve suyu üretiminin artmasıyla birlikte yan sanayi ürünleri olan nar meyvesinin kabukları ve çekirdeği tıbbi ilaç sanayi ve takviye gıda ürünleri üretiminde de önemli bir hammadde haline gelmiştir. Nar çekirdeği yağı günümüzde talebi karşılanamayan yüksek katma değerli ürünlerdendir (Şahin, 2013).

Myrtales takımı Lythraceae familyası ve Punica cinsi içinde yer alan *Punica granatum*, yani nar bitkisi çok yıllık birkaç metre boylanabilen çalimsı yapıda veya çok dallı taçlanabilen, koltuk sürgün uçları sivri ve iğ şeklindedir. Yaprak, kenarları tüylü üst tabaka mumlu gibi bir yapı göstermektedir. Meyve şekli çeşitlere göre çok fazla değişiklik göstermektedir. Olgunlaştığında kaliks segmentleri tarafından taçlanır. Meyve genel olarak 5-14 cm genişliğinde kalın kabuklu ve bol çekirdeklidir. Kabuk rengi çeşitlere göre çok fazla değişiklik gösterir. Meyve kabuğu kırmızı, yeşil, sarı olabildiği gibi alacalı birden fazla renkte içerebilmektedir. Meyvenin kabuğu yenilmez ekşi ve acı tada sahiptir. Meyve çekirdeği ve meyve içindeki odacıkları ayıran zar yenilmez. Meyvenin iç kısmındaki daneler tüketilir. Daneler ince bir zar, pulp ve tohumdan oluşur. Dane renkleri beyazdan koyu kırmızıya kadar birçok renklenme gösterir (Anonim, 2011).

Çizelge 1.1 Narın sistematikteki yeri

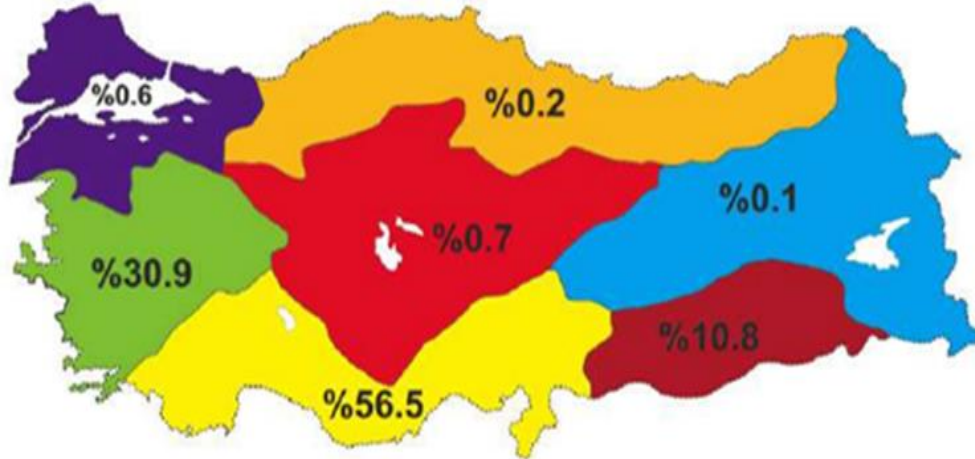
Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Myrtales
Familya	Lythraceae
Cins	Punica
Tür	<i>Punica granatum</i>

Ülkemizde yerel veya selekte edilmiş değişik nar çeşitleri yetiştirilmekte olup en yaygınlarından biri Hicaz narıdır. Yerel bir çeşit olan Hicaz narı yaygın ve başarılı bir şekilde yetiştirilen, meyveleri ortalama 350-400 gr ağırlıkta olup kabuk rengi kırmızı, daneler koyu kırmızı, tadı mayhoştur. Çekirdekler orta derecede sert olup meyve suyu üretimine ve uzun süre depolamaya (4-5 ay) uygundur. Yaygın yetiştirilen bu çeşit büyük ölçüde Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir. Kabuk rengi koyu parlak kırmızı dane rengi daha açık olan Wonderful çeşidinde meyve iriliği orta boy olup özellikle daneleme ve sanayiye uygundur. Tadı hafif mayhoş ve lezzetli olan çeşit dünya da dikimi en yoğun olan nar çeşitlerinden biridir.

Mersin civarında yetiştirilen lezzeti çok iyi eylül ekim aylarında hasat edilen çekirdeksiz nar diğer önemli bir çeşittir. Kabuk rengi açık sarı üstüne koyu kırmızı renkte olan kalın kabuklu ve çekirdekleri orta sert olan deve dişi narı da yerel yetiştirilen narlardan biridir. Bunun dışında yerel olarak isimlendirilen çok nar çeşidi olup ticari anlamda en yaygın yetiştirilen hicaz narıdır. Hicaz narının bir diğer özelliği de soğuklara daha toleranslı olmasıdır. Hicaz narı ve Wonderful narı çeşit özellikleri itibariyle çok benzerdir. Yüksek adaptasyon yetenekleri, geççi hasat tarihleri, iri meyve oluşturmaları, kırmızı tane rengi, yüksek verim ve uzun süre depolanabilmeleri ortak özellikleridir. Hicaz çeşidi narın olumsuz depolama koşullarına dayanıklılığı ve depolama süresi wonderful çeşidinden daha yüksektir. Wonderful nar çeşidi Hicaz nar çeşidine göre daha tatlı ve meyve odacıklarını

ayran zarın daha kolay ayrılması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.(Anonim, 2019).

Türkiye, iklim özellikleri, gen kaynakları gibi birçok özellik bakımından nar yetiştiriciliğine en uygun ülkelerden biridir. Son yıllarda insan sağlığı üzerinde yapılan araştırmalarda narın beslenmedeki önemi anlaşılmıştır. Günümüzde narda yüksek miktarda bulunan ellajik asidin insanlarda ki birçok viral enfeksiyonda gıda takviyesi olarak kitle iletişim araçlarında ünlü doktorlar tarafından önerilmesi sonucu dünya genelinde nar tüketimi artmıştır. Bu gelişmelerle birlikte üreticilerin nar üretimine ilgisi artmış üretim alanlarında ciddi miktarda artışlar olmuştur. Dünya genelinde nar istatistikleri sağlıklı olarak oluşturulmamakla birlikte önemli nar üreticisi ülkeler ve üretim miktarları Çizelge1.2 de verilmiş olup Türkiye 2020 rakamları ile 600 021 ton ile dördüncü sırada yer almıştır.



Şekil 1.1 Ülkemizde bölgelere göre 2018 yılı nar üretim oranları

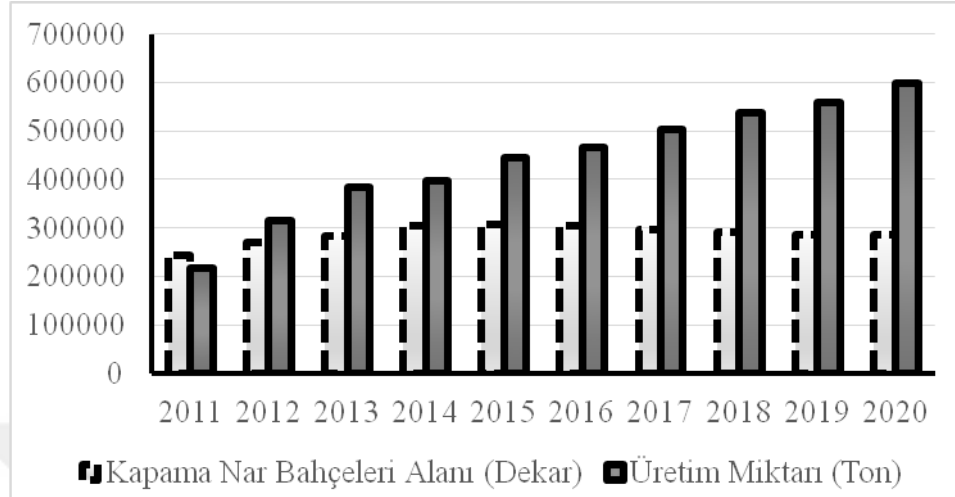
Türkiye meyve üretiminde nar, son yıllardaki gelişimiyle uluslararası piyasalarda adından daha fazla söz ettirmeye başlamıştır. Şekil 1.1 ve 1.2 de Türkiye ve Doğu Akdeniz Bölgesi nar üretim alanlarındaki artış görülmektedir. Tablo 1.3'te görüldüğü gibi Türkiye'nin son on yılda nar üretim alanı 176 197

dekardan, 291490 dekara ve nar üretim miktarı 127 760 tondan 2021 yılında 618 bin tona yükselmiştir.

Çizelge 1.2. Türkiye'deki son 10 yılda nar üretim alanları, ağaç sayıları, verim miktarları ve üretim alanları istatistikleri (Tüik, 2022).

Yıl	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	Toplu Meyveliklerin Alanı (Dekar)	Verim (Kg/Meyve Veren Ağaç)	Üretim Miktarı (Ton)
2011	7 881 144	6 432 893	244 454	28	217 572
2012	10 011 871	5 789 933	269 024	31	315 150
2013	11 086 789	5 089 180	283 991	35	383 085
2014	11 755 997	6 033 851	304 548	34	397 335
2015	13 310 323	4 072 289	307 511	33	445 750
2016	13 858 784	3 481 808	305 302	34	465 200
2017	13 661 560	3 122 595	297 669	37	502 606
2018	13 574 229	2 645 256	291 490	40	537 847
2019	13 739 341	2 420 226	285 253	41	559 171
2020	13 670 173	2 211 605	284 632	44	600 021

Son yıllarda Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yeni tesis edilen geniş alanlardaki kapama nar bahçeleriyle birlikte gelecek yıllarda da üretimin artacağı tahmin edilmektedir. Hicaz çeşidi narın yanında ülkemiz iklim ve toprak koşullarına uygun adaptasyon kabiliyeti yüksek yeni geliştirilen nar çeşitleri de üretim miktarının artacağı konusunda umut vermektedir (Kurt ve Şahin, 2013).



Şekil 1.2. Türkiye’deki son 10 yılda kapama nar bahçeleri alanları ve üretim miktarları grafiği (Tüik, 2022).

Çizelge 1.3. Araştırmanın yapıldığı illerin, bölge ve Türkiye Nar üretim verilerinin karşılaştırılması tablosu (Tüik, 2022).

	Adana	Mersin	Adana, Mersin	Akdeniz	Türkiye
Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	982440	1774539	2756979	6589171	13670173
Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı (Adet)	125214	199891	325105	796619	2211605
Toplu Meyveliklerin Alanı (Dekar)	21391	40413	61804	136137	284632
Verim (Kg/ Meyve Veren Ağaç)	80	57	65	54	44
Üretim Miktarı (Ton)	78483	101676	180159	358588	600021

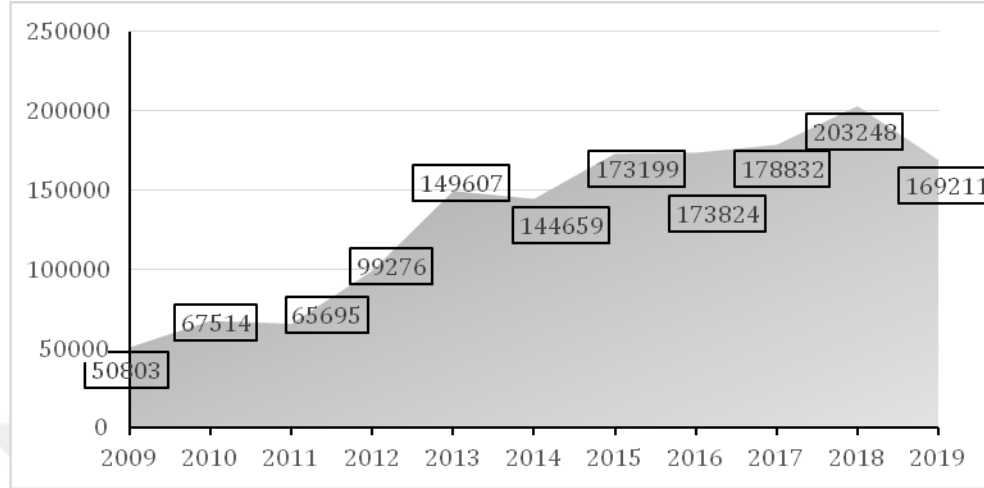
İkinci ve Bolat (2019)’ ın bildirdiğine göre ülkemizde bölgeler itibari ile nar yetiştirilen alanlar ve yüzde dağılımı Şekil 3’ te verilmiştir. Özetle Akdeniz bölgesi ülke üretiminin yarıdan fazlasını karşılarken Doğu Akdeniz bölgesi ise yaklaşık olarak nar alanlarının 1/4 ünü kapsamakta ve üretim miktarının ise 1/3ünü

karşılmaktadır. Ayrıca ülkemizde ağaç başına nar verim ortalaması 30 kg Adana ilimizin ortalaması ise 71 kg'dır. Son 10 yılda Doğu Akdeniz bölgesi üretim miktarının 2,8 kat arttığı görülmektedir.

Çizelge 1.4. Türkiye'deki son 10 yılda üretici bazında meyve fiyatları tablosu (Tüik, 2022).

Yıl	Meyve fiyatları TL/Kg
2008	1,38
2009	1,34
2010	1,36
2011	1,19
2012	0,96
2013	0,78
2014	0,99
2015	0,91
2016	0,89
2017	1
2018	1,26
2019	1,74
2020	2,04

Ülkemiz 2020 yılı verilerine göre 75 ülkeye 192 bin 6 ton nar ihracatına karşılık 126 milyon 54 bin dolar gelir elde etmiştir. Sadece Rusya'ya 44.5 milyon dolarlık nar ihracatı yapılmıştır. Irak, Beyaz Rusya Almanya öncelikli ihracat yaptığımız ülkelerdir. Irak'a ihracat bedeli 2,3 dolar, Almanya'ya ihracat bedeli 10.15 dolardır. Fiyatlardaki farkın nedeni Irak'a düşük, Almanya'ya yüksek kaliteli ürünlerin satılmasıdır. İhraç edilecek narların fiziksel ve pomolojik özellikleri yüksek olmalıdır. Özellikle meyve kabuğunda mekanik hasarlanma olmamalıdır. İhraç edilecek ürünlerde kaliteyi etkileyecek hastalık ve zararlılardan korunmuş olmalıdır. Özellikle yetiştiricilik dönemindeki hastalık ve zararlılar ihraçta önemli kriterdir.(İkinci ve ark., 2018).



Şekil 1.3. Türkiye'deki son 10 yılda nar ihracat miktarı grafiği

Nar üretiminde zararlı olan birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Bunlardan hastalık olarak Kahverengi leke hastalığı (*Alternaria alternata*), *Coniella granati* meyve çürüklüğü, *Aspergillus* meyve çürüklüğü (*Aspergillus niger*), Gövde zamklanma hastalığı (*Phytophthora* sp.) gibi biyotik hastalıklar sorun olmakla birlikte böcek zararlılar (harnup güvesi, unlu bit, yaprak bitleri, ağaç kurdu, beyaz sinek, kırmızı örümcekler vb.) meyve çatlama, gövde kuruma ve/veya kabuk çatlama, zamklanma, meyvede güneş yanıklığı gibi birçok abiyotik hastalık ta zararlar oluşturmaktadır.

Ancak nar bitkilerinde hastalık etmeni olarak en az bilinen ve üzerinde fazla çalışma yapılmamış konulardan biri virüs ve fitoplazma hastalıklarıdır. Birkaç yurt dışı ve yurt içi kaynaktan başka narlarda bilinen ve zarar yaptığı gösterilen virüs ve fitoplazma hastalığı yoktur. Ancak nar yetiştiriciliğinin arttığı ve vegetatif üretim sisteminin kullanıldığı nar bitkisinde virüs veya fitoplazma hastalık etmenlerinin bitkilerde oluşturduğu belirtilere benzer görünüm belirlenmiştir.

Tür ve cins düzeyinde de narda belirgin bir hastalık söz konusu olmamakla beraber önemli bir ürün haline gelen nar yetiştiriciliğinde özellikle bölgemiz için virüs ve fitoplazma hangi hastalıkların olabileceği ve bu hastalıkların nar yetiştiriciliğinde belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Doğu Akdeniz

Bölgesi nar yetiştirilen alanlarda yapılmış survey çalışmaları ile moleküler taramalar ile mevcut hastalıklar belirlenmeye çalışılmıştır.

Diğer bitkilerde virüs ve fitoplazma hastalıkları değişen önemlerde verim ve kalite kaybına neden olmaktadır. Tüm canlılarda obligat olarak bulunduğu bilinen virüs ve fitoplazma etmenlerinin narlarda da bulunduğu bazı çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bölgedeki nar ağaçlarında yapılan gözlemlerde geriye doğru sebebi bilinmeyen ölümler, yapraklarda değişik tipte deformasyon ve sararma ya da kızarmalar ve ağaç genelinde deformasyonlar görülmeye başlamıştır. Önemsizmediği takdirde muhtemelen eğer viral bir etmen ise hem çoğaltma materyalleri ve hem de hasat ya da budama faaliyetleri ile bu belirtiler giderek yayılmaya devam etmiştir. Bu nedenlerden dolayı nar bitkilerinde bulunan veya zarar yapan viral etmenlerin biyolojik, serolojik ve moleküler olarak belirlenmesi, varlığı veya yaygın olduğu saptanan viral etmenin moleküler karakterizasyonunun yapılması bu çalışmanın esas amacını oluşturmuştur.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Narda birçok hastalık ve zararlı bulunmakta, bu hastalık ve zararlılar meyve de verim ve kalitede problem oluşturmakta sonuçta pazarlama sorunlarına neden olabilmektedir. Diğer bitkilerde bu tip problemlere, hatta bitki ölümlerine ve o ürünün yetiştirilmesi imkânını ortadan kaldıran, sınırlayan virüs ve fitoplazma hastalıkları çok sayıdadır. Ancak narlar da virüs ve fitoplazma hastalıkları ile ilgili ne yurt dışında ne de yurt içinde çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır.

Horvath ve ark. (1984) eski Yugoslavya’da Zagreb Üniversitesi koleksiyon bahçelerinde mevcut nar bitkilerinde yaptıkları bir çalışmada hıyar mozaik virüsünü (Cucumber Mosaic Virus, CMV) ilk kez rapor etmişlerdir.

Bichcheri ve ark.,(2012) İtalya’da Emilia-Romagna Bölgesi'nin Ravenna eyaletinde dünyanın farklı ülkelerinden temin edilmiş 57 nar çeşidinin bulunduğu bir koleksiyon parselinde bazı çalışmalar yürütmüşlerdir. Nar, çelikle çoğaltıldığı için virüs hastalıklarından korunmak için sağlıklı üretim materyali kullanımının önemli olduğu vurgulanmış ve bu nedenle çalışmalarını yeni nar çeşitlerinin geliştirilmesi için kurulan koleksiyon parsellerinde yoğunlaştırmışlardır. Araştırmacılar 2014 yılında koleksiyon parsellerinde ve Bologna’daki parklardaki süs narlarında yaprak deformasyonları görülen bitkilerden alınan örneklerin yüzde 10’unda (CLRv)’nin saptandığını bildirilmişlerdir. Yine 2015 yılında koleksiyon parsellerinde yapılan surveylerde yapraklar üzerinde virüs benzeri belirtiler belirlenmiş ve Alfaalfa mozaik virüsü (AMV), Arabis mozaik virüsü (ArMV), Cherry Leaf Roll Virüs (CLRv), ve Hıyar mozaik virüsü (CMV), Strawberry Latent Ringspot Virüs (SLRV) gibi çeşitli virüslerin varlığını araştırmak için çalışmalar yürütülmüş ve sonuçta alınan 57 yaprak örnekte serolojik (ELISA) ve moleküler analiz (RT-PCR) çalışmaları yürütülmüştür.

EPPO global veri tabanına göre 2012 yılında Bologna Üniversitesi tarafından dünyanın farklı bölgelerinden ithal edilen 126 nar çeşidinin köklü çelikleri Ravenna yakınlarında (Emilia-Romagna bölgesi) karantina altındaki

koleksiyon parseline dikilmiş ve 2013 baharında yapılan ilk survey çalışmalarında hiçbir belirti gözlenmemiştir. Ancak birkaç virüsün varlığını araştırmak için alınan örnekler testlenmiş ve bir nepovirüsün varlığı belirlenmiştir. Bu örnekler daha sonra USDA / ARS klonal germplazm (California, ABD) stoklarından alınan örnekler daha ileri analizler (serolojik testler, RT-PCR, sekanslama)' etabi tutulmuş ve ToRSV'nin varlığını belirlenmiştir. Söz konusu örneklerin dağıtıldığı farklı alanlardaki (Emilia- Romagna'da bulunan 5 çiftlik ve Bari Üniversitesi (Puglia bölgesi) ve Lazio bölgesindeki bir fidanlık) bitkilerde de daha sonra Tomato Ringspot Virus (ToRSV) saptanmış ve varlığı teyit edilmiştir. Bulaşık bitkilerde başlangıçta belirti göstermeyen bazı bitkilerin daha sonra yapraklar üzerinde halkalı lekeler şeklinde de belirtilerin ortaya çıktığı görülmüştür. Sonuç olarak hastalığı yok etmek amacıyla resmi bitki sağlığı önlemleri alınarak ABD menşeli olan tüm nar bitkileri sökülüp imha edilmiştir. Virüsün vektörü nematod *Xiphinema americanum*'un İtalya'da varlığı rapor edilmemiştir, varsa da doğal yayılmasının sınırlı olduğu düşünüldüğü rapor edilmiştir (Anonymous, 2010).

Asma Yaprak Kıvrıcılık Virüsü (Grapevine Leafroll Virus, GLRV) ekonomik öneme sahip bir hastalıktır. Hastalıktan sorumlu olan virüsler Closterovirus ve Ampelovirus familyasından çeşitli etmenler olmakla birlikte ilk tespit edileni GLRaV-1'dir. Günümüzde 9 adet etmen tespit edilmiş 4 tanesinin (GLRaV-1, -2, -3 ve -7) hastalık etmeni olduğu belirlenmiştir. Hastalığın taşınması uzak mesafelere bulaşık üretim materyali ile bölgesel olarak ise unlu bit türleri ile olmaktadır. (Martelli, 2014).

Çağlayan ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada Hatay ilinde Hicaz nar çeşidinde sararma, klorotik lekeler ve meşe yaprağı belirtilerinden virüs hastalıklarına benzer belirtileri gözlemişlerdir. Bu yapraklardan alınan örneklerden DAS ELISA ve özel primerler kullanarak RT-PCR testleri yapmışlar ve sonuçta GLRaV-1 için narların alternatif bir konukçu olabileceğini ifade etmişlerdir.

Narlarda henüz az sayıda virüs hastalığı tanımlanmış olduğu, ancak son yıllarda yürütülen çalışmalarda narında GLRaV-1'in (Asma yaprak kıvrıcılık

virüsü 1, Grapevine leafroll-associated virus 1) konukçusu olma ihtimali ile yapılan çalışmada Elçi ve ark. (2017) bağ ve narlardan elde edilen GLRaV-1 izolatlarını genomik olarak kıyaslamışlardır. Bu amaçla, Hatay ve Niğde illerinden toplanan asma ve nar örneklerinden total RNA ve dsRNA izolasyonları yapılmış, virüs genomuna özgü 2 farklı bölgenin hareket (movement) proteini (p24) ve ısı şok (heats shock) proteinini (HSP70h) çoğaltan primerler kullanılarak RT-PCR ile analizleri yapılmış elde edilen ürünler klonlanmış ve sekans analizlerini yapmışlardır. Ayrıca Closterovirüs'ün HSP70h genine özgü dejenere primer kullanılarak DOP-PCR analizleri yapılmıştır. DNA dizi analizlerinin sonunda elde edilen kısmi genomun, BLAST analizleri yapıldıktan sonra filogenetik analizleri çıkarılmıştır. Bu çalışma ile yeni bir konukçu olduğu tahmin edilen nardan izole edilen GLRaV-1 izolatlarının asma izolatları ile kıyaslamalı olarak analiz edilmesi sağlanmış ve izolatlar arası yüksek oranda benzerlik olduğu tespit edilmiştir. (Elçi ve ark. 2017)

Gomez ve Pallas, (2001) virüs ve virüs benzeri etmenlerin neden olduğu simptomlar gösteren nar yaprak örnekleri 6 farklı viroid veya viroid benzeri RNA varlığını belirlemek için analiz etmişlerdir. SPAGE ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmada 2 örneğin 16 Sr RNA ile aynı olduğu belirlenmiştir.

Hop Stunt Viroidi, (HSVd), 1973 yılında ilk defa tanımlanmış 1977 yılında hastalıklara neden olan etmenin viroid olduğu belirlenmiştir. Etmen %50 ye varan verim kayıplarına sebep olabilmektedir. Turunçgil, sert çekirdekli meyveler ve bağlarda çok sayıda konukçuda bulunmaktadır. Hop Stunt Viroidi, (HSVd) yaprak kenarlarında nekrozlar ve beneklenmeler, boğum arasında kısılma, bitkide bodurlaşma ve geriye doğru ölüm şeklinde belirtiler gösterir, mekanik olarak taşınabilir. Doğu Akdeniz Bölgesinde 1999-2001 yılları arasında bağlarda tespit edilmiştir (Gazel ve Önelge, 2002). Türkiye de bağ ve sert çekirdekli birçok meyvede bu viroidin varlığı diğer bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Şevik, 2015).

Önelge, (2000) simptom gösteren 10 nar yaprağı örneğinde yaptıkları çalışma da viroid içeriği bakımından sPAGE ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak analiz yapmışlar ve çekirdeksiz nar ile bey narı örneklerinde 300 nükleotid uzunluğunda RNA ları saptamışlardır. Bu hopstund viroidi için spesifik bir değer olup çekirdeksiz ve bey narı kültür varlarında Hop Stunt viroidinin (HSVd) ülkemizdeki ilk tespiti olarak kayda geçmiştir.

Gazel ve ark., (2009) Adana Hatay ve Mersinde 2006 yılında yapılan survey çalışmaları sonucu sararma ve yapraklarda bir miktar değişme gösteren 152 yaprak örneği, HSVd mevcudiyeti için analiz edilmiştir. Toplam RNA'lar nar yapraklarından izole edilmiş ve RT-PCR' de teplate olarak kullanılmıştır. Test edilen tüm nar numunelerinde HSVd tespit edilememiştir.

Gorsane ve ark. (2010) Tunus'ta yaptıkları çalışmada narlarda hop stunt viroidini (HSVd) belirlemişlerdir. İnfekteli dokular üzerinde yapılan Dot blot hibridizasyon, sPage, RT-PCR, cDNA sekanslaması sonucu farklı Akdeniz Bölgesi ülkelerindeki incir, erik, turunçgil gibi hopstund viroidinin farklı varyantları arasındaki farklılık araştırılmış; araştırma sonucunda Tunus'taki narlarda belirlenen hopstund viroidinin cachexia alt grubu içinde turunçgil grubu ve rekombinant turunçgil-erik grubu olarak iki gruba ayrıldığını belirlemişlerdir. Sonuçlar ayrıca, konukçu veya coğrafi kökene bağlı olmayan yüksek bir haplotip çeşitliliği göstermiştir. Genetik testler, HSVd izolatlarının hızla yayıldığını da göstermektedir.

Gazel ve ark., (2015) Aydın ilindeki nar ağaçlarında, yıllardır görülen sararma, azalan canlılık, deformasyon ve yaprakların kızarıklığı ve geriye doğru ölümlerin sebebini araştırmışlardır. 2013 yılı bahar ve sonbaharında nar bahçelerinde bu simptomları veren fitoplazma hastalıklarının vektörü olabilmüş *Fiebrilla anategea*'nın ana zararlı olduğunu tespit etmişlerdir. 64 *Fiebrilla anategea* örneği üzerine yaptıkları çalışmada 1 ergin ve 1 nimfte fitoplazma hastalığı tespit edilmiştir.

Salehi ve ark., (2016) İran farklı bölgelerinde 2012 den 2014 yılına kadar yapılan survey çalışmalarında bazı nar bahçelerinde değişik yaprak belirtileri gözlemişler ve Neyriz bölgesinden alınan örnekte yapılan PCR çalışmalarında 16SrII fitoplazma grubunun D alt grubuna ait KPLL ve NPLL suşlarını saptamışlar ve ilk kayıt olarak rapor etmişlerdir.

Gao ve ark., (2016) Çinin Shandong Eyaleti Tai'an Bölgesinde Nar bitkilerinde RFLP analizi ile (Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) 16SrI-B fitoplazmanın varlığını rapor etmişlerdir.

Narda virüs ve fitoplazma etmenleri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda insan sağlığı alanında yapılan çalışmalar ve elde edilen bilgiler doğrultusunda narın önemi anlaşılmış buna bağlı olarak nar yetiştirme alanlarında hızla çoğalmıştır. Artan dikim alanları ve üretim miktarı sonucu önemli bir ürün haline gelen nar ile ilgili çalışmalarda artışlar görülmüş, bu nedenle son zamanlara kadar nar virüs hastalıkları konusunda yeterli çalışmaya rastlanmamıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller

Araştırma da Adana ve Mersin illerindeki (Şekil 3.1) nar bahçeleri çalışmanın esas materyallerini oluşturmuştur. Bölgede ticari anlam da nar yetiştiriciliği yapılmakta olup, söz konusu nar bitkilerinden çalışma amacına uygun olarak yaprak, sürgün örnekleri alınmıştır.

Alınan örnekler Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı ile Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezinin laboratuvarlarında testlenmiştir.

Adana İli ve ilçelerinden 99 adet, Mersin İlinden 38 adet (Çizelge 3.1.), virüs fitoplazma benzeri belirtiler gösteren ve virüsle bulaşık olabileceğinden şüphelenilen bitkilerin (Şekil 3.2.-3.4) genç yapraklarından toplanan örneklerin önce fotoğrafları çekilmiş toplandıktan sonra numaralandırılıp etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Çizelge 3.1. İl ve İlçelere göre alınan örnek sayıları

İl	İlçe	Örnek Sayısı (Eylül 2020)	Örnek Sayısı (Mayıs 2021)
Adana	Sarıçam	68	68
Adana	Ceyhan	22	22
Adana	Çukurova	5	5
Adana	Karaisalı	4	4
Mersin	Tarsus	27	27
Mersin	Anamur	4	4
Mersin	Silifke	7	7



Şekil 3.1. Survey çalışmalarında Adana İli Sarıçam İlçesi Çiçekli Mahallesiinde karşılaşılan şüpheli örnekleri



Şekil 3.2. Survey çalışmalarında Adana İli Sarıçam İlçesi Çaylı Mahallesiinde karşılaşılan şüpheli örnekleri



Şekil 3.3. Survey çalışmalarında Adana İli Ceyhan İlçesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri



Şekil 3.4. Survey çalışmalarında Mersin İli Tarsus İlçesinde karşılaşılan şüpheli örnekleri

3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

Total Nükleik Asit İzolasyonu, RT-PCR ve Agaroz jel çalışmalarında kullanılan moleküler materyaller ve bitkisel materyallerin testlenmesinde kullanılan virüs etmenlerine (Çizelge 3.2) spesifik primerler (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada araştırılmış virüs hastalıkları

	Virüs Adı (Türkçe)	Virüs Adı (İngilizce)	Kısa Adı	Taşınma Şekli
1	Elma Mozaik Virüsü	<i>Apple Mosaic Virüs</i>	ApMV	Üretim materyali, mekanik inokulasyon, polen
2	Erik Halkalı Leke Virüsü	<i>Prunus Necrotik Virüs</i>	PRNSV	Tohum, polen
3	Çilek Latent Ringspot Virüsü	<i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>	SLRV	Üretim Materyali, mekanik inokulasyon
4	Asma Mozaik Virüs	<i>Arabis Mosaic Virüs</i>	ArMV	Nematod, Üretim materyali, Mekanik inokulasyon, Tohum
5	Elma Gövde Yivleşme Virüsü	<i>Apple Stem Pittin Virus</i>	ASGV	Üretim Materyali, Mekanik inokulasyon
6	Kiraz Halkalı Leke Virüsü	<i>Cherry Leaf Roll Virus</i>	CLRV	Üretim materyali, Nematod
7	Raspberry Halkalı Leke Virüsü	<i>Raspberry Ring Spot Virus</i>	RpRSV	Üretim materyali, Nematod
8	Domates Halkalı Leke Virüsü	<i>Tomato Ring Spot Virus</i>	ToRSV	Üretim materyali, Nematod
9	Hıyar Mozayik Virüsü	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	CMV	Mekanik inokulasyon, Tohum, Yaprak Biti
10	Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü	<i>Grapevine Leaf Roll Ass. Virus</i>	GLRaV	Üretim Materyali, Unlu bit
11	Yonca Mozayik Virüsü	<i>Alfalfa Mosaic Virus</i>	AMV	Üretim Materyali, Mekanik inokulasyon, Yaprak Biti
12	Fitoplazma	<i>Ca. Phytoplasma</i>		Üretim Materyali, Vektör böcekler, Küsküt ve tohum

PCR çalışması sırasında hedef nükleik asitlerin çoğaltılması amacıyla RT-PCR çalışmalarında kullanılmış 200 µl'lik PCR eppendorf tüpleri, izolatlara ait NA'lerin komplementer DNA (cDNA)'e dönüştürülmesi için Reverse Transcriptase enzimi (M-MLV, 200u/µl), Reverse Transcriptase buffer (M-MLV buffer 5X), RNase inhibitörü (40/µl), dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100mM)), RNA'ın hedef bölgesine spesifik tek iplikli oligonükleotid primer çiftleri, (**Tablo 5**) Taq polimeraz (5u/µl), PCR buffer (10X) firmalardan satın alınmıştır.

Agaroz jel elektroforez çalışmaları ile kontrol edilmiş olan materyal olarak total NA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen virüs izolatlarına ait total NA'ler, RT-PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan RT-PCR ürünlerinin kontrolünde kullanılmış agaroz ve DNA marker firmalardan satın alınmıştır. Bütün çalışmalarda kullanılmış olan alet ve ekipmanlar (Mikropipetler, Santrifüj, sıcak su banyosu, Termocycle ve Elektroforez aparatları) viroloji laboratuvarından kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada patojenlere ait kullanılmış primer çiftleri

Patojen	Primer ismi ve Primer baz dizilimi	Ürün (bp)	Referans
ArMV	ArMV-S: 5'- AAAGAATTGGCAGCGGATTGG-3' ArMV-A: 5'- GAGTTCGATGATAGGGAGAACG-3'	453 bp	(Bertioli et al. 1991)
ApMV	ApMV-S: 5- GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3 ApMV-A: 5- GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3'	820 bp	Petrick ve Lenz.(2002)
PNRSV	PNRSV-C537:5'- ACGCGCAAAAGTGTGAAATCTAAA-3' PNRSV-H83: 5'- TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAG-3'	455 bp	(MacKenzie ve ark., 1997)
SLRSV	SLRSV-S; 5 'CCTCTCCAACCTGCTAGACT 3' SLRSV-A: 5 'AAGCGCATGAAGGTGTAAC 3'	497 bP	(Postman et al., 2004)
CLRV	CLRV-5:TGGCGACCGTGTAAACGGCA CLRV-3:GTCGGAAAGATTACGTAAGG	416 bp	(Faggioli et al., 2005)
CMV	CMV-CPN5:ACTCTTAACCAACCTT CMV-CPN3:AACATAGCAGAGATGGCGG	280 bp	(Faggioli et al., 2005)
GLRaV-1-p24	F:5'CGCGCTTGCAGAGTTTAAGTGGTT-3' R:5'TCCGTGCTGCATTGCAACTTTCTC-3'	634 bp	Alabi ve ark., 2011
GLRaV-1-HSP70h	F:5'-CAGGCGTCGTTTGTACTGTG-3', R:5'-TCGGACAGCGTTTAAGTTCC-3	540 bp	Alabi ve ark., 2011
RpRSV	F:5'- TGTGTCTGGTTTTGATGCT -3', R:5'- GAGTGCATAGGGGCTGTT-3	385 bp	Ochoa-Corona et al., 2006
ASGV	5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3' 5'-ATAGCCGCCCGGTTAGGTT-3'	264 bp	Kobs, 1988
ToRSV	F : GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC R: TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	450 bp	Griesbach 1995
AMV	MV-F (5'- CCATCATGAGTTCTTCACAAAAG-3' AMV-R(5'- TCGTCACGTCATCAGTGAGAC-3'	351 bp	Bath ve ark., 2002 Fidan ve ark., 2012
FİTOPLAZMA	Universal R16F1/5'-AAGACGAGGATAACAGTTGG-3' R16R0/5'- GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3'	1.400 bp	Davis ve ark., 1997;
	Nested R16F2n/ (5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3' R16R2/ 5'-TGAC GGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	1.250 bp	Gundersen ve Lee, 1996

3.2. Yöntem

3.2.1. Survey Çalışmaları ve Örneklerin Toplanması

Survey çalışmaları Doğu Akdeniz Bölgesinde nar yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Adana ve Mersin illerindeki kapama nar bahçeleri ve münferit ev bahçelerinde virüs ve fitoplazma ya da tanımlanamayan anormallikler gösteren ağaçların belirti gösteren geç sürgün yaprak ve varsa meyve örnekleri alınmıştır. Örnekleme çalışmaları 2020 yılı Eylül ve 2021 Yılı Mayıs tarihleri arasında yapılmış, belirti gösteren bitkilerin ayrıca aranmasına özen gösterilmiş, güdümlü örnekleme yapılarak Adana İlinden 99 adet Mersin İlinden 38 adet bitkiden örnek alınmıştır. Alınan her bir örnek kodlanmış, resimleri çekilip etiketlenmiştir. Alınan örnekler ayrı ayrı torbalanıp buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiş ve buzdolabında kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiş, ilk hafta içinde örnekler ile çalışıldıktan sonra pozitif olduğu belirlenen örneklerin kalan kısmı -20°C de saklanmıştır.

Yaprak örnekleri etiketlenmiş ve etiketlerde numune numarası, tarihi ve örnek alınan yer belirtildikten sonra soğuk zincir sağlanıp laboratuvara getirilmiştir. Bitki örnekleri moleküler çalışmalardan önce +4°C'de, çalışmalardan sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir. İn-vitro işlemleri Ç.Ü Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalarda simptomolojik olarak herhangi bir virüs veya fitoplazma hastalığı ile bulaşık olduğundan şüphelenilen örnekler materyal olarak kullanılmış ve sırasıyla aşağıdaki aşamalarda çalışmalar yürütülmüştür.

3.2.2.1. Nar Bitkisi Örneklerinin PCR Testleri için Hazırlanması**3.2.3.2. Total Nükleik asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları**

Nar bitkilerinin simptomlu yapraklarından total NA ekstraksiyonu yapılmıştır. Total NA izolasyonu Astruc ve ark., (1996)'nın önerdiği yönteme göre yapılmıştır.

İzlenen basamaklar sırasıyla:

a-Örnekler ekstraksiyon bufferı (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol 1/1000) ile 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak porselen hava içerisinde havaneli yardımı ile ezilmiş ve bitki özsuğu steril tülbenkten süzölmüştür. Bitki özsuğundan 1ml alınarak eppendorf tüpleri içerisine yerleştirilmiştir.

b-Örnekler 3 dakika 4.000 rpm de santrifüj edilmiştir.

c- Süpernantant içerisine 50 µl Sodium Dodecylsulfat (%20) ilave edilerek vorteks te karıştırılmış ve sonra tüpler 65 °C de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir.

d-Tüplere 250 µl potasium asetate (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiştir.

e-Tüpler 15 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir.

f-Süpernantant ikiye bölünmüş ve 500 µl si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C te saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernantant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konulup, üzerine % 100 lük Ethanolden 500 µl ilave edilerek ml ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler vortekste karıştırılmıştır.

g-Sonra tüplere 50µl sodium asetate (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 °C de bir gece bekletilmiştir.

h-Örnekler 15 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilerek süpernantan ortamdan uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika kurutulup daha sonra pellet üzerine 1ml ethanol (% 70) ilave edilmiştir.

ı-Örnekler RNA' ların çökmesi için 5 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilerek tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurulanmıştır.

k-Elde edilen total RNA lar 50 µl RNase free distile su ile sulandırılmıştır. Örnekler 15µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünerek eppendorf tüpleri içerisinde -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.3 DNA izolasyonu

DNA ekstraksiyonunda Ahrens and Seemüller (1992)'nin kullandığı yöntem uygulanmıştır.

a-Bitkilerin genç yaprak ve flöemlerinden alınan örnekler (1 g örnek için 4 ml) CTAB buffer (2% w/v cetyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2--mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% polyvinylpyrrolidone, pH 8.0) ile porselen havan içinde havan eli yardımı ile ezilmiştir.

b-Bu ekstraksiyon dan 500 mikrolitre alınıp 1.5 ml lik eppendorf tüplerine konulacak ve tüpler 30 dakika 60 °C de su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır.

c-Daha sonra parçalama için tüpler içerisine 500 mikrolitre chloroform / izoamylalkol (24:1) ilave edilerek 1 dakika süreyle vortek yapılmıştır.

d-Tüpler 12.000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilmiştir.

e-Supernatanttan 400 microlitre alınarak yeni eppendof tüplerine aktarılmış ve üzerine 2/3 oranında soğuk isopropanol ilave edilip -20 °C de 20 dakika bekletilmiştir.

f-Daha sonra tüpler 12.000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilmiştir.

g-Pellet %70' lik etil alkol ile yıkanacak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra pellet 100 µl TE (1X) buffer ile çözdürülecek ve elde edilen DNA' ler kullanılıncaya kadar -70 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.3. RT- PCR (Reverse Transcriptase Polimeraz Chain Reaction) Çalışmaları

Örneklere mevcut virüs vb. hastalıklarının saptanması ve tanılanması amacıyla, PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) çalışmaları yapılmıştır.

Nükleik asit materyali olarak DNA içeren etmenler için direkt olarak PCR aşaması uygulanırken, RNA yapısındaki virüsler için RT aşaması yapıldıktan sonra PCR işlemine geçilmiştir. Birinci aşama olan RT (Reverse transcription) aşamasında cDNA 'lar elde edilmiş ve ikinci aşamada ise, bu cDNA' lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır.

I. RT aşamasında; her PCR tüpüne, 1 µl total NA 1 µl reverse primer ve 13 µlH₂O konularak 95 °C'de 3 dakika bekletilmiş, daha sonra tüpler buz üzerine alınmıştır. PCR tüplerine, 5,9 µl saf su, 2,5 µl RT buffer, 1 µl dNTP (2 mM), 0.3 µl RNase inh ve 0.3 µl RT enzimi ilave edilerek, 42 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

II. PCR aşamasında, 1 µl cDNA, 5 µl, PCR (10X) buffer, 1µl dNTPs (10 mM), 1 µl PrR, 1 µl PrF, 0,250 µl Taq, 40,75 µlH₂O ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler çizelge 1'deki gibi şekilde ayarlanarak Thermocyclera yerleştirilmiş ve böylece PCR işlemi tamamlanmıştır.

RT-PCR İçin Termocycle Programı

95 santigrat derecede 3 dakika	 1 döngü
bağlı		
95 santigrat derecede	1 dakika
Tm-3 santigrat derecede	1 dakika 35 döngü
72 santigrat derecede	50-sn
bağlı		
72 santigrat derecede 10 dakika	 1 döngü

3.2.3.4. Fitoplazmalar için Direct ve Nested PCR Çalışmaları

Öncelikle Direct PCR aşamasında, 2 µl DNA, 5 µl, PCR (10X) buffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl PrR, 1 µl PrF, 0,250 µl Taq, 39,75 µl H₂O ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler Thermocycler' a yerleştirilerek PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Direk PCR için Termocycle Programı

94 santigrat derecede 3 dakika 1 döngü

Bağlı

94 santigrat derecede 1 dakika

Tm-5 santigrat derecede 2 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 3 dakika

Bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

R16F1/R16R0 universal primer çiftlerinin kullanılarak yapılan direk PCR çalışmaları sonucuna elde edilen PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Elektroforez sonucunda jelde beklenen molekül ağırlığına sahip herhangi bir DNA badi görüntülenememiştir. Daha sonra direk PCR ürünleri 1/100 oranında sulandırılarak nested PCR çalışmalarında template DNA olarak kullanılmıştır. Moleküler malzemeler olarak direct PCR olduğu gibi gerekli malzemeler karıştırılmış ve önceden ayarlanmış olan Nested PCR programı uygulanmak üzere Thermocycler' a yerleştirilmiştir. 1. Adım da yoksa neden nested a geçildi?

94 santigrat derecede 3 dakika 1 döngü

bağlı

94 santigrat derecede 1 dakika

Tm-5 santigrat derecede 2 dakika 35 döngü

72 santigrat derecede 3 dakika

bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

3.2.3.5.Agarose Gel Elektroforez Çalışmaları

Agarose Gel Elektroforez çalışmalarında viral etmenlerin testlenmesi amacıyla kullanılan RT-PCR ve fitoplazmaların testlenmesi amacıyla kullanılan Direct ve Nested PCR çalışmaları ile elde edilen PCR ürünleri kontrol edilmiştir. Agarose Jel Elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra, (1994)'e göre yapılmıştır. İşlemler sırasıyla:

a) Agarose miktarı, kontrol edilmesi planlanan PCR ürününün primerlerin kullanılması ile beklenen molekül ağırlığına göre 20 ml 1x TAE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acide, 2 MmEDTA) içerisine konulmuştur.

b) Bu agarose-TAE buffer karışımı kaynayıncaya ve agarose eriyinceye kadar mikrodalgalı bir fırın içerisinde ısıtıldıktan sonra volum 20 ml'ye ayarlanmıştır.

c) Karışım tekrar 60 0C ye kadar soğumaya bırakılmış ve tarak geçirilmiş olan tank içerisine boşaltılmıştır.

d) Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çekilip gel'in üzerini 1-2mm kadar kaplayıncaya kadar tank içerisine TAE buffer ilave edilmiştir.

e) 10 ml örnek jel deki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura 10ml 1 kb marker konulmuştur. Loading buffer daki turuncu renk (orange G) jel' in sonuna gelene kadar jel tankına elektrik akımı verilmiştir.

f) Runnin işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika 100 ml H₂O +30 ml(10mg/ml distilate su) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırıncaya kadar 5 dakika distile su içerisinde tutulmuştur.

Sonuçlar transilluminatör de kontrol edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Simptomolojik Gözlemler

Çalışmanın yürütüldüğü Adana ve Mersin ili civarındaki nar bahçelerinde yapılan survey çalışmalarında münferit ağaçlarda kloroz, bazı ağaçlarda geriye doğru ölümler, gövdeyi çevreleyen kabukta kavlamalar, yaprak deformasyonları, yapraklarda renk değişimleri, meyve çatlama ve gözlemlenmiştir. Bu belirtilere neden olabilecek tuz toksitesinin bulunmadığı (eğim oranı yüksek geçirgen topraklar) belirlenmiştir. Survey yapılan bahçeler orman alanları, meralar, buğday, ayçiçeği tarlaları ile çevrelenmiştir. Bu üretim alanlarında BGD etkisi yaratabilecek herbisit veya direk BGD lerin kullanılmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Survey çalışmalarında tespit edilen simptomlu örnek fotoğrafları

4.2. Moleküler Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan kapama nar bahçelerinde survey çalışmalarında virüs ve fitoplazma etmenlerine benzeri belirtilere sahip 137 örnek toplanmıştır. Yapılan moleküler testler sonucunda farklı dönemlerde toplanan örneklerin tamamı testlenen Elma Mozaik Virüsü, Erik Halkalı Leke Virüsü, Çilek Latent Ringspot Virüsü, Asma Mozaik Virüsü, Elma

Gövde Yivleşme Virüsü, Kiraz Halkalı Leke Virüsü, Raspberry Halkalı Leke Virüsü, Domates Halkalı Leke Virüsü, Hıyar Mozaik Virüsü, Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü, Yonca Mozaik Virüsü ve fitoplazma etmenleri açısından temiz bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Çalışmada testlenen virüs ve fitoplazmalar ve PCR sonuçları

	Virüs Adı (Türkçe)	Virüs Adı (İngilizce)	Kısa Adı	Eylül 2020 Moleküler test (PCR) Sonucu	Mayıs 2021 Moleküler test (PCR) Sonucu
1	Elma Mozaik Virüsü	<i>Apple Mosaic Virus</i>	ApMV	-	-
2	Erik Halkalı Leke Virüsü	<i>Prunus Necrotik Virus</i>	PRNSV	-	-
3	Çilek Latent Ringspot Virüsü	<i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>	SLRV	-	-
4	Asma Mozaik Virüs	<i>Arabis Mosaic Virus</i>	ArMV	-	-
5	Elma Gövde Yivleşme Virüsü	<i>Apple Stem Pitting Virus</i>	ASGV	-	-
6	Kiraz Halkalı Leke Virüsü	<i>Cherry Leaf Roll Virus</i>	CLRV	-	-
7	Raspberry Halkalı Leke Virüsü	<i>Raspberry Ring Spot Virus</i>	RpRSV	-	-
8	Domates Halkalı Leke Virüsü	<i>Tomato Ring Spot Virus</i>	ToRSV	-	-
9	Hıyar Mozayik Virüsü	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	CMV	-	-
10	Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü	<i>Grapevine Leaf Roll Ass. Virus</i>	GLRaV	-	-
11	Yonca Mozayik Virüsü	<i>Alfalfa Mosaic Virus</i>	AMV	-	-
12	Fitoplazma	<i>Ca. Phytoplasma</i>		-	-

Nar meyvesi özellikle son yıllarda ciddi anlamda ihraç edilmektedir. Üreticiler ihraç kalitesinde üretim yaptığında ciddi gelirler sağlamakta iken meyve kalitesi düőtüğünde çok fazla zarar edebilmekteler. Nar bitkisinde zarar yapan birçok emici böcek zararlısı vardır. Bu da narda virüslerin yayılması için uygun bir ortam sağlamaktadır. Üreticilerimiz saydığımız nedenlerle ruhsatsız olduğu halde yüksek dozda ve insektisitleri sık sık kullanmaktadır. İhraç ürünlerinde sık sık acetamiprid ve chlorpyriphos etken maddelerine rastlanmaktadır. Bu nedenle son yıllarda özellikle bölgemizdeki nar bahçeleri hasat öncesi pestisit denetim programına alınmıştır. Nardaki zararlılar ile ilgili bu olumsuz koşullar, ilgili zararlıların virüs etmenlerin taşıyıcı özelliklerini önemli oranda kısıtlamış olabilir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırma kapsamında yapılan survey çalışmalarında çok sayıda bahçede ve nar ağaçlarında virüs ve fitoplazma etmenlerinin sebep olduğu semptomlara rastlanmıştır. Ancak surveylerde toplanan örneklerin moleküler yöntemlerle testlenmesi sonucunda söz konusu testlenen virüs ve fitoplazma etmenlerine rastlanmamış olup bütün örnekler testlenen virüsler ve fitoplazma açısından sağlıklı bulunmuştur. Belirti gösterdiği halde bitkilerin getaif sonuç vermesinin nedenleri arasında;

1. Nar bahçelerinin genellikle verimsiz ve kireçli topraklarda kurulması, dolayısıyla semptomların aşırı kireç ve demir eksikliğinden kaynaklanabileceği düşüncesi
2. Nar fidanının ucuz ve kolay üretilebilir olmasından dolayı sorunlu bitkilerin sürekli yenileri ile değiştiriliyor olması
3. Narın antiviral bileşikler ihtiva edebiliyor olmasından dolayı virüs infeksiyonlarının gerçekleşmeyebileceği
4. Nar üretiminde yüksek miktarda insektisitlerin kullanımından dolayı vektörler aracılığı ile virüslerin bulaştırılmadığı fikri ortaya çıkmaktadır:

Bölgemiz toprakları yüksek miktarda kireç içermesinden dolayı gözlemlenen semptomların kireç miktarının yüksekliğinden dolayı demir gibi mikro element noksanlığından kaynaklanabileceği ön plana çıkmaktadır. Nar fidanı üretim metodu çeliklemedir. Yapılan bahçe ziyaretleri ve özellikle fidanlıklardaki survey çalışmalarında virüs ve fitoplazma etmenlerinden korunmak için budama makasının dezenfekte edilmesi gibi birçok korunma yöntemlerinin hiçbirisinin uygulanmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte fidan üreticilerinin ve bahçe sahiplerinin bahçede gördükleri farklı fidanları kolaylıkla imha etmektedirler. Bu da hastalıkların yayılmasını engellemektedir. Kapama nar bahçelerinde bitkiler sık dikildiği için üreticilerin sorunlu olduğunu düşündükleri

ağaçları kolaylıkla imha etmekte, buda virüs ve fitoplazma etmenlerin yayılması engelleyebilir.

Bu çalışma kapsamında simptomolojik olarak hastalık belirtisi gösteren bitkilerde virüs ve fitoplazma etmenleri belirlense de farklı nedenlerle moleküler olarak kanıtlanamamıştır. Bu durum nar bitkisinin içerdiği farklı maddeler nedeniyle virüs ve fitoplazma etmenlerini etkisizleştirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle bu konuda çalışma yürütülmelidir.



KAYNAKLAR

- Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.
- Anonim, (2000). Nar Yetiştiriciliği, Teknik Tarım, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü, Yayın No.356, Sy.222-229, İZMİR
- Anonim, (2010). <https://gd.eppo.int/reporting/article-5141> son erişim 07/11/2019 19:16
- Anonim (2011) Nar Yetiştiriciliği. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Yayınları Ankara.
- Anonymuous, (2019). Türkiye İstatistik Kurumu, (TÜİK) Bitkisel Üretim İstatistikleri,
- Anonim, (2020). <https://www.hurriyet.com.tr/gundem/akdeniz-bolgesi-illeri-nelerdir-akdeniz-ozellikleri-iklimi-daglari-ovalari-ve-bitki-ortusu41529185> son erişim 04/01/2021 16:52
- Astruck, N., Marcus, J.F., Macquarie, G., Candresse, G.T. and Vicent Pallas, 1996. Studies on the Diagnosis of hop Stunt Viroid in Fruit Trees: Identification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organic Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 837-846.
- Bichcheri, R.; A. Mirotti; A. R. Babini; C. Poggi Pollini; et al. (2015) Viral infections in one collection field of pomegranate (*Punica granatum*) in Italy. *Journal of plant pathology*, 97, 4.
- Çağlayan, K., Elçi E., Gazel, M., (2015). Detection and partial characterization of grapevine leafroll-associated virus 1 in pomegranate trees in Turkey *European Journal of Plant Pathology* · November 2015

- Davis, R.E., Dally, E.L., Gundersen, D.E., Lee, I.M. and Habili, N. 1997.
“Candidatus Phytoplasma australiense”, a new phytoplasma taxon
associated with Australian Grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:
262–269.
- Dursun, E., İkinci, A., Bolat, İ., (2019). Türkiye ve Şanlıurfa İlinde Nar
Yetiştiriciliğinin Bugünkü Durumu ve Geleceği 1. Uluslararası Harran
Multidisipliner Çalışmalar Kongresi– Şanlıurfa/Turkey
- Ebcioğlu, N. (2003). Sağlığımızın Yapıtaşları Sebze ve Meyveler Tanımları, Besin
Değerleri, Yararlı Etkileri, Üretimleri ve Yetiştirilmeleri, Remzi Kitabevi,
s. 208, İstanbul.
- Elçi, E., Gazel, M., Çağlayan, K., (2017). Asma ve Narlardan İzole Edilen
Grapevine leafroll-associated virus-1 İzolatlarının Kısmi Sekanslarının
Karşılaştırmalı Genomik Analizleri *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji
Dergisi*, 5(10): 1136-1141, 2017
- Fernandes L. (2005) Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils
from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in
Spain
- Fidan, H., Adak, N.A., Konuksal, A., Akerzurumlu, E. ve Yılmaz, M.A. 2012.
*Occurrence of Alfalfa Mosaic Virus (AMV) Diseases on Potato Crops in
Northern Cyprus*. *Acta Hort. (ISHS)* 960:341-346
- Galitelli, D., and Minafra, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus
Diagnosis, 15-30 October 1994. Adana-Turkey. Page: 89-99
- Gao, R., Wang, J., Zhu T., Jia X., Li, X., (2018). Identification and Molecular
Characterization a Phytoplasma Associated with Pomegranate Fasciation
Disease. *Horticultural Plant Journal*, 4 (1): 30–34.
- Gazel, M., Çağlayan, K., Serçe, Ç., Durgac, C., (2009). Detection of hop stunt
viroid in pomegranate (*Punica granatum* L.) trees in the east mediterranean
region of Turkey. *Acta Hort.* 2009.818.40

- Gazel, M., Önelge, N., (2002). First report of grapevine viroids in the East Mediterranean region of Turkey. *New Disease Reports*, 6: 4-4.
- Gazel, M., Çağlayan, K., Başpınar, H., Mejia, J.F., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Contaldo, N., (2015). Detection and identification of phytoplasmas in pomegranate trees with yellows symptoms. *J. Phytopathol.* 164 (2), 136-140.
- Gazel, M., Çağlayan, K., Başpınar, H., Yıldırım, M., (2015). Preliminary observations on *Fiebertiella anatagea* as possible vector of phytoplasma diseases in pomegranate orchards in Turkey Conference: 23rd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, At Morioko, Iwate, Japan
- Gomez G. and V. Pallás, (2001). Detection of viroid-like RNAs in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Acta Horticultura* 2, 321–325.
- Gorsane, F., Elleuch1, A., Hamdi, I., Salhi, A., Hannachi1, Fakhfakh1, H., (2010). Molecular detection and characterization of Hop stunt viroid sequence variants from naturally infected pomegranate (*Punica granatum* L.) in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* 49, 152–162.
- Gundersen, D.E. and Lee, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Medit.*, 35: 144–151.
- Horvath, J. and Juretic, N (1984). Isolation of cucumber mosaic virus from pomegranate *punica granatum* in Yugoslavia *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19(3-4): 309-314 1984
- İkinci, A., Bolat, İ., Şimşek, M. (2018). International Pomegranate Trade and Pomegranate Standard 1. International GAP Agriculture & Livestock Congress 25-27 April 2018 – Şanlıurfa/Turkey
- Kurt H., Şahin G., (2013). Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye’de Nar (*Punica Granatum* L.) Tarımı. *Marmara Coğrafya Dergisi* Sayı: 27, Ocak 2013, S. 551-574

- Martelli GP. (2014). Directory of Virus and Virus-Like Diseases of The Grapevine and Their Agents. J Plant Pathol 96: 1-4.
- Önelge N. (2000). Occureance of Hop Stund Viroid (HSVd) on Pomegranate trees in Turkey. j. Turk. Phytopath, Vol. 29 No:1 49-52
- Pienaar L. (2021). https://www.sapomegranate.co.za/wpcontent/uploads/2021/05/Pomegrant_Report-2021F.pdf .Son erişim 17.01.2022 19:32
- Salehi, M., Hosseini, S., Rasoulpour, R., Salehi, E., Bertaccini, A., (2016). Identification of a phytoplasma associated with pomegranate little leaf disease in Iran Crop Protection 87 (2016) 50-54
- Şahin, A. (2006). Nar Bahçesi Tesisi, BATEM Yayınları, Yayın No: 28, Antalya.
- Şahin, A. (2013). Nar Yetiştiriciliği Batem Yayınları Antalya.
- Şenocak, E. (2016). Halk Anlatı Ve İnanışlarında Mitolojik Bir Meyve: Nar. Avrasya Uluslararası araştırmalar Dergisi Sayı 8
- Şevik, A., (2015). Viroidler ve Türkiye’de Saptanan Viroid Hastalık Etmenleri Turk J Agric ResC(2015) 2: 63-68
- Tüik (2019). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=104&locale=tr> (Son erişim:3.11.2019).
- Tüik (2022). Türkiye İstatistik Kurumu <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=110&locale=tr>. Son Erişim 17.01.2022 19:53

ÖZGEÇMİŞ

1999 Yılında eğitimime başladığım Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programı Bitki Koruma Alt Programını 2003 yılında bitirdim. 2004-2007 yılları arasında Tat Tohumculuk A.Ş. de ziraat mühendisi olarak çalıştım. 2007-2012 yılları arasında Balıkesir Tarım İl Müdürlüğü Sındırgı İlçe Tarım Müdürlüğünde çalıştım. 2012-2016 Yıllarında Adana Tarım İl Müdürlüğü Pozantı İlçe Tarım Müdürlüğünde çalıştım. 2016 Yılından itibaren Sarıçam İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışmaktayım.



EKLER

EK 1.

DNA Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler

1.Extraction (CTAB) Buffer

- 1.4 M Na Cl
- 100 mM Tris (pH 8.0)
- 20 mM EDTA (pH 8.0)
- % 2 β -Mercaptoethanol
- % 2 CTAB
- pH 8'e ayarlandıktan sonra çözelti sıvının içinde homojen oluncaya kadar karıştırılır. Oda sıcaklığında saklanır.

2. Chloroform: isoamylalcohol Karışımı (24:1)

EK 2.

Total RNA Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

Ekstraksiyon bufferı (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl	2.4228 gr
EDTA	3.7224 gr
NaCl	5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

% 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)

20 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

Potassium asetat (CH₃COOK) (5M)

49.075 gr potassium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

Sodium asetat CH₃COONa(3M)

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

% 70 lik Ethanol

70 ml %99' luk ethanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70 lik ethanol hazırlanmıştır.