

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oğuzhan KILINÇ

**ERDEMLİ LİMON YETİŞTİRİCİLİK ALANLARINDA
RUMPLE(ÇÖKÜNTÜ) HASTALIĞININ BULUNMA ORANI
VE ÇÖKÜNTÜ GÖZLENEN LİMON AĞAÇLARINDA VİROİD
ETMENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERDEMLİ LİMON YETİŞTİRİCİLİK ALANLARINDA
RUMPLE(ÇÖKÜNTÜ) HASTALIĞININ BULUNMA ORANI VE
ÇÖKÜNTÜ GÖZLENEN LİMON AĞAÇLARINDA VİROİD
ETMENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan KILINÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 08/02/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
DANIŞMAN

.....
Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL201911800

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

ERDEMLİ LİMON YETİŞTİRİCİLİK ALANLARINDA RUMPLE (ÇÖKÜNTÜ) HASTALIĞININ BULUNMA ORANI VE ÇÖKÜNTÜ GÖZLENEN LİMON AĞAÇLARINDA VİROİD ETMENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan KILINÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Yıl: 2022, Sayfa: 69
Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES

Bu çalışma Mersin ili Erdemli ilçesi limon yetiştiricilik alanlarında Rumble (Çöküntü) hastalığının bulunma oranının araştırılması ve hastalığın görüldüğü ağaçlarda turuncgil viroid etmenlerinin araştırılması amacıyla yürütülmüştür. Bölgede bulunan limon bahçelerinde Kütdiken, Mayer, İtalyan Memeli, Aydın, Euroka ve Enterdonat limon çeşitlerinde sörvey çalışması yürütülmüştür. Çöküntü hastalığının Erdemli ilçesi limon yetiştiricilik alanlarında toplam enfeksiyon oranı %29 olarak saptanmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmalarında ise tohumdan yetiştirilen Etrog citron fidanlarına gerçekleştirilen mekanik inokulasyon sonucunda yapraklarda epinasti ve yaprak nekrozları gözlenen başlıca belirtiler olmuştur. Çöküntü belirtisi gösteren 10 farklı limon ağacının aynı zamanda CEVd ve CCaVd ile enfekteli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rumble, Limon, Erdemli, Mersin

ABSTRACT

MSc THESIS

THE PREVALENCE OF RUMPLE DISEASE IN LEMON GROWING AREAS OF ERDEMLİ DISTRICT AND INVESTIGATION OF VIROID FACTORS IN LEMON TREES WITH RUMPLE

Oğuzhan KILINÇ

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

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Yıl: 2022, Sayfa: 69
Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN
: Asst. Prof. Dr. Ali ENDES

This study was carried out to investigate the prevalence of Rurple disease and to investigate the citrus viroid agents in the trees where the disease is seen in the lemon growing areas of Erdemli district of Mersin province. In the lemon orchards in the region, surveys were carried out on Kütdiken, Mayer, İtalyan Memeli, Euroka, Aydın ve Enterdonat lemon varieties. The total infection rate of the Rurple disease in the lemon growing areas of Erdemli district was determined as 29%. In biological indexing studies, the main symptoms observed were epinasty and leaf necrosis on leaves as a result of mechanical inoculation on Etrog citron seedlings grown from seed. It was determined that 10 different lemon trees showing collapse symptoms were also infected with CEVd and CCaVd.

Keywords: Rurple, Lemon, Erdemli, Mersin

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller; portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*C. reticulata*), greyfurt (*C. paradisi*), limon (*C. limon*) ve laymlar (*C. auratifolia*) gibi ekonomik değeri yüksek olan citrus türü meyve ağacı türlerini de içine alan bir bitki topluluğudur. Limon turunçgiller arasında önemli bir yere sahip olup turunç bitkisi (*C. aurantium*) ile ağaç kavununun (*C. medica*) çaprazlanması sonucu elde edilen doğal hibrit bir türdür.

Limonun ilk olarak nerede ortaya çıktığı bilinmemekle birlikte orijin ülkelerin Güney Hindistan ve Çin olduğu tahmin edilmektedir. Limon dünyada turunçgil üretiminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Dünyada limon üretimi 21 milyon ton civarındadır (FAO, 2019). Limon üretiminde elverişli ekolojilere sahip olan ülkeler arasında potansiyeller ve avantajlar açısından mevcut durumu en iyi ülke Türkiye'dir. Çünkü ürün kalitesi oldukça yüksek olan Türkiye, barındırdığı Kütdiken türünün kalite, muhafaza ve uzun yola dayanıklılık ile dünyadaki çeşitleri ile kıyaslandığında benzeri olmaması nedeniyle gelecek yıllarda da uluslararası pazarda ağırlığını arttırarak korumaya devam edeceği düşünülmektedir (Bostan Budak D. ve ark., 2016).

Ülkemizde 1960 senesinde varlığı tespit edilen, 1962 senesinde %75'lere kadar ulaşan bir zarara neden olan, bugüne kadar da farklı oranlarda ekonomik kayıplara sebep olan 'çöküntü, benek, çopur' gibi adlarla bilinen Rurple, meyvenin pazar değerinin düşüren, yalnızca kabukta meydana gelen ciddi bir fizyolojik problemdir. Limonlarda görülen çöküntü; Ağustos ayı ortalarında küçük sarımsı lekeler halinde meyvede görülmeye başlayarak sonraki aylarda bu lekelerin belirginleşmesi ve daha ilerisinde sarımsı bölgelerde çöküntünün meydana gelmesi ve sonunda da çöküntülü bölgenin kahverengileşerek meyvelerin pazarlanamayacak duruma gelmesiyle sonuçlanan bir zarardır. Çöküntü hastalığı

büyük ekonomik kayıplara sebep olacak boyutlarda görülmeye devam etmekte ve ekonomik açıdan ihracatta üreticileri olumsuz yönde etkilemektedir.

Çöküntü hastalığının yayılışı ve yoğunluğunun belirlenmesi, hastalığa duyarlı olan çeşitlerin ortaya konması milli ekonomiye katkı için oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan arazi tarama sonuçlarına göre çöküntü zararının en fazla Mersin ilinde bulunan limon bahçelerinde görüldüğü belirlenmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde Çöküntü hastalığının turunçgil çeşitlerindeki varlığı daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuş ancak Mersin Erdemli ilçesindeki üretim alanlarındaki durumu ve Rurple görülen ağaçlarda turunçgil viroid hastalıkları konusunda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile limon üretiminde önemli pazar kayıplarına ve ekonomik açıdan ürün değerinin yitirilmesine neden olan Rurple hastalığının Erdemli limon üretim alanlarındaki durumunu belirlemek ve ayrıca Rurple görülen ağaçlarda turunçgil viroid hastalıklarını araştırmak amaçlanmıştır.

Mersin ili, Erdemli ilçesi 95.130 da limon dikili alanların %1'i sörvey alanı olarak seçilmiştir. Sörvey çalışmaları Çöküntü hastalığının belirtisini sadece limon meyvelerinde göstermesinden dolayı bitkilerin meyve döneminde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen %1'lik sörvey alanlarının tamamı gezilmiş ve limon ağaçları hastalığın makroskobik simptomları açısından gözlemlenmiştir. Sörvey çalışması bölgede yaygın olarak yetiştirilen Kütdiken, Mayer, İtalyan Memeli, Aydın ve Enterdonat limon çeşitlerinde gerçekleştirilmiştir. Meyvelerde; hastalığın zaman seyrine göre yaz sonunda kabuk üzerindeki sarımsı benekler halinde görüldüğü, bu beneklerin her birinin 4 veya 5 yağ kesesi ile kaplı olduğu ve bu meyvelerin bulunduğu ağaçlar hastalık ile bulaşık olarak kabul edilmiştir. Simptom gösteren ağaçlardan örnekler alınmış ve örnekler seçilen her bir ağacın farklı yönlerinden olmak üzere üçer adet dal ve yaprak olarak indeksleme ve moleküler tanı çalışmalarında kullanılmak üzere alınmıştır. Çöküntü hastalığı görülen ağaçlarda turunçgil viroid hastalıklarının durumunu araştırmak amacıyla indikatör

bitki olarak Etrog citron tohumlarından yetiştirilen fidanlar kullanılarak mekanik inokulasyon gerçekleştirilmiştir.

Mersin ilinin Erdemli ilçesindeki limon bahçelerinde 10 yaşından büyük limon bahçelerinde sonbahar döneminde yapılan sörveylerde Çöküntü hastalığının karakteristik özelliği olan meyve üzerinde çöküntü belirtileri gözlenmiştir. Gözlenen bu çöküntü belirtileri meyve küçük olduğunda küçük boyutlarda meyve büyüdükçe çöküntü alanlarının da büyüdüğü saptanmıştır. Ayrıca başlangıçta küçük boyuttaki çöküntülerin zaman içinde birleşerek daha büyük alanlar oluşturduğu gözlenmiştir. Oluşan çöküntüler başlangıçta koyu yeşil renkte olup daha sonra Eylül, Ekim aylarında üretim mevsimi sonuna doğru çöküntülerin limon üzerinde daha belirgin hale geldiği ve renginin kahverengine döndüğü gözlenmiştir. Bazı Kütdiken limon ağaçlarında çöküntülerin siyah renkli olduğu da belirlenmiştir.

Çöküntü belirtileri en yoğun Kütdiken limon çeşidinde gözlenmiştir. Ancak bunun dışında bölgede yetiştiriciliği yapılan Euroka ve Aydın limon çeşitlerinde de çöküntü belirtileri gözlenmiştir. Bu limon çeşitlerinde de gözlenen çöküntü belirtileri Kütdiken çeşidinde gözlenen belirtilere benzer olduğu çeşit bazında çöküntü şeklinde ve derecesinde farklılık bulunmadığı görülmüştür.

Çöküntü hastalığı belirtisi gösteren meyveler ağaçların dış kısımlarında yer alan dallarda daha fazla gözlenmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Mersin ili Erdemli ilçesinde toplamda 1.031 dekar arazi gezilmiş 36.683 ağaç incelenmiştir. 10.672 ağacın çöküntü gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda çöküntü hastalığının Erdemli ilçesi limon yetiştiricilik alanlarında toplam enfeksiyon oranı %29 olarak saptanmıştır. Rumble belirtisi gözlenen 10 limon ağacında yapılan viroid hastalıklarının RT-PCR yöntemiyle taraması sonucunda 10 örnekten 6 tanesinin 371 bp seviyesinde bant oluşturduğu ve CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 10 örnekten 6 tanesinin 300 bp seviyesinde bant oluşturduğu ve CCaVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Etrog citron bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile aktarılmaya çalışılan turunçgil viroid hastalıklarının belirtileri yaklaşık iki ay sonra gözlenmeye başlamıştır. Turunçgillerde bulunan CEVd için karakteristik olan orta damar nekrozu ve epinasti ve yaprak nekrozları belirtileri etrog citron yapraklarında gözlenmiştir.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sonsuz bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bu çalışmanın ortaya çıkmasında sınırsız destek ve yardımları olan, bilimsel katkılarını, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen saygıdeğer tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum Dr. Öğr. Üyesi Sn. Orhan BOZAN'a,

Beraber yüksek lisans eğitimi yapma fırsatım bulduğum ve laboratuvar çalışmalarındaki yardım ve katkıları için Zir.Yük.Müh. Saime Büşra FİDANCI ve Zir. Yük. Müh. Gülbahar ARIKAN, Zir. Yük. Müh. Nurcan GÜCER ve Zir. Müh. Gabriella Berigel'e,

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi imkân sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve olumlu fikirleri ile daima yanımda olan eşim Sabahat KILINÇ'a

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.1.1.Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal	21
3.1.2.Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller.....	21
3.1.3.Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmasında Kullanılan Materyal	22
3.1.4.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	22
3.1.5.Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal	22
3.2. Metot.....	23
3.2.1.Sörvey Çalışmaları.....	23
3.2.2.Çöküntü Hastalığı ile Enfekteli Bitki Örneklerinin Toplanması.....	23
3.2.3.Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi ve İnokulasyon Çalışması	24
3.2.4.Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	25
3.2.5.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Aşaması	27
3.2.6.Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi.....	29

3.2.7.Sekans Analizi ve Verilerin Karşılaştırılması	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Çöküntü Hastalığı ile Bulaşık Bahçelere Ait Arazi Gözlemleri	31
4.2. Çöküntü Hastalığının Sörvey Çalışmaları ile Yaygınlığının Erdemli İlçesinde Belirlenmesi	35
4.3. Çöküntü Hastalığının Gözlendiği Ağaçlarda Turunçgil Viroid Hastalıklarının Biyolojik İndeksleme Yöntemi ile Belirlenmesi	40
4.4. Moleküler Çalışmalar ile İlgili Bulgular ve Tartışma	45
4.4.1.RT-PCR Çalışmaları ile İlgili Bulgular	45
4.4.2.Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
5.1. Sonuçlar	57
5.2.Öneriler	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Dünyada Turunçgil Üretimi (Bin ton).....	1
Çizelge 2.1. Turunçgil bitkilerini enfekte ettiği bilinen viroidler.....	14
Çizelge 2.2. CEVD'nin ve diğer turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkisinde oluşturduğu belirtiler.....	20
Çizelge 3.1. CTAB tampon içeriği	25
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışım kimyasalları	27
Çizelge 3.3. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları	28
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primer çiftleri	28
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primer çiftleri	29
Çizelge 4.1. Erdemli İlçesi Mahalleleri çöküntü hastalığı bulaşıklık çizelgesi	37
Çizelge 4.2. Mersin Erdemli İlçesi limon çeşidi bazında çöküntü hastalığı bulaşıklık oranları.....	38
Çizelge 4.3. Çöküntü hastalığının gözlemlendiği ağaçlarda viroidlerin belirlenmesi için farklı limon ağaçlarından alınan örnekler etrog citron bitkisi üzerine inokulasyonu sonucu gösterdiği belirtiler	44



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Dünya Limon Üretimi.....	3
Şekil 1.2.	Türkiye ‘de limon yetiştiriciliği yapılan iller haritası).....	3
Şekil 1.3.	Limon meyvelerinde gelişen çöküntü belirtilmları (Kütdiken limon).....	4
Şekil 3.1.	Etrog citron çekirdekleri	21
Şekil 3.2.	Çöküntü Hastalığı ile Enfekteli Bitki Örnekleri	24
Şekil 4.1.	Meyve üzerindeki çöküntü belirtilmlar (İtalyan memeli)	32
Şekil 4.2.	Oluşan çöküntünün başlangıçtaki koyu yeşil rengi (Kütdiken).....	32
Şekil 4.3.	Hastalığın son döneminde çöküntü bölgesinin siyahlaşması ve hastalıklı bölgenin meyvenin zayıf noktası haline gelmesi.	33
Şekil 4.4.	Çeşit bazında çöküntü şeklinde ve derecesinde farklılık bulunmadığı görölmektedir.	33
Şekil 4.5.	Erdemli ilçesinde Rump hastalığının çöküntü belirtilmlunu gösteren Kütdiken limon meyvesi başlangıç belirtilmlu.	34
Şekil 4.6.	Sörvey çalışmaları sonucunda Erdemli ilçesinde çöküntü hastalığının şiddetli belirtilmlunu gösteren Kütdiken limon meyvesi.....	34
Şekil 4.7.	Erdemli ilçesi gezilen sörvey alanları.....	36
Şekil 4.8.	Etrog citron tohumdan yetiştirilmesi.....	40
Şekil 4.9.	.Etrog citron fidanlarında gerçekleştirilen biyolojik indeksleme çalışmaları ve yapraklarda epinasti ve nekroz gelişimleri.....	42
Şekil 4.10.	Yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5’luk agar jeldeki görüntüsü. (CCaVd 300 nt bant seviyesi) 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump2: rump:3), 4: Aydın (rump:5), 5-6: Euroka (rump:8,rump:10) çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol	46

Şekil 4.11. Yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1.5'luk agar jeldeki görüntüsü. CEVd'nin 371 nt bant seviyesi) 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump:2 rump:3), 4-5:Aydın (rump:5,rump6), 6: Euroka(rump:10), çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol	47
Şekil 4.12. Yapılan RT-PCR sonucunda sekansa gönderilecek (CCaVd) örneklerin çoğaltılması 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump:2, rump:3), 4:Aydın(rump:5), 5-6: Euroka (rump:8,rump:10) çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol	48
Şekil 4.13. Yapılan RT-PCR sonucunda sekansa gönderilecek (CEVd) örneklerin çoğaltılması 1-2-3:Kütdiken (rump:1, rump:2, rump:3), 4-5:Aydın(rump:5,rump6), 6: Euroka(rump:10), çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol	49
Şekil 4.14. Blast analizi sonucunda Rump-8 izolatının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları	51
Şekil 4. 15. Blast analizi sonucunda Rump-2 izolatının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları	52
Şekil 4.16. Rump-8 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacı görüntüsü.....	53
Şekil 4.17. Rump-2 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacı görüntüsü.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
BLAST	: Basic Local Aligment Search Tool
bp	: Baz çifti
CCDa	: Citrus chlorotic dwarf-associated virus
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid fosfat
g	: Gram
K -	: Negatif Kontrol
K +	: Pozitif Kontrol
l	: Litre
M	: Markör
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nt	: Nükleotid
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu

sp.	: Tür
sPAGE	: Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spp.	: Türler
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TE	: Tris-EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole



1. GİRİŞ

Turunçgiller; portakal (*C.sinensis*), mandarin (*C.reticulata*), greyfurt (*C.paradisi*), limon (*C.limon*) ve laymlar (*C.auratifolia*) gibi ekonomik değeri yüksek olan citrus cinsi meyve ağacı türlerini de içine alan bir bitki topluluğudur. Ilıman iklim kuşağında yetiştiriciliği yapılan bir bitki olup anavatanı Çin ve Hindistandır. Dünyada yaklaşık 92 milyon ton turunçgil üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu üretimin %50'si portakal, %34'ü mandarin, %8'i limon ve %8'i greyfurta (Çizelge 1.1) aittir. Brezilya, Çin, ABD, Hindistan, Meksika, İspanya, İtalya, Mısır ve Türkiye dünyadaki başlıca turunçgil üretici ülkelerdir.

Çizelge 1.1.Dünyada Turunçgil Üretimi (Bin ton) (USDA, 2020)

	Portakal	Mandarin	Limon	Greyfurt	Toplam
2015/2016	47.060	28.738	7.050	6.376	89.224
2016/2017	53.813	30.183	7.774	6.562	98.302
2017/2018	48.233	30.138	7.961	6.620	92.952
2018/2019	53.844	31.996	8.525	6.795	101.160
2019/2020	46.062	31.568	7.550	6.699	91.879

Türkiyede turunçgil tarımı Akdeniz ve Ege Bölgelerinde yapılır. Türkiye, 139.831 hektar üretim alanı ve 4.769726 ton üretim hacmiyle dünya narenciye üretiminde 9. sırada yer almaktadır. Üretimin; %88'i Akdeniz Bölgesi'nde, %12'si Ege Bölgesi ve diğer bölgelerde gerçekleştirilmektedir. Adana, Mersin, Hatay, Antalya, Muğla başlıca önemli turunçgil üreticisi illerimizdir (TÜİK, 2020).

Limon turunçgiller arasında önemli bir yere sahip olup turunç bitkisi (*C.aurantium*) ile ağaç kavununun (*C.medica*) çaprazlanması sonucu elde edilen doğal hibrit bir türdür. Limonun ilk olarak nerede ortaya çıktığı bilinmemekle

birlikte yetiştirilmeye ilk başlanan ülkelerin Güney Hindistan ve Çin olduğu tahmin edilmektedir. Limon (*C.limon*), genellikle kuzey ve güney yarımkürede, en düşük sıcaklıkların 4 °C'nin üstünde olduğu yarı kurak ve kurak subtropik iklim kuşağında yapılmaktadır. Genel olarak turunçgillerin büyüme sıcaklığı 12.8°C olarak kabul edilmesine rağmen limonlarda bu sıcaklık değeri 6-7°C'dir (Tuzcu 1990). Yüksek sıcaklık koşullarına en duyarlı turunçgil türü limondur. Limonlar yazları ılık ve nemli; kışları ise ılık geçen yerlerde gelişirler. Limonlar 3-7 metre civarında orta büyüklükte ağaçlar meydana getirirler. Limon yaprakları, orta boyda olup diğer turunçgil türlerinden daha açık yeşil renktedir. Dişi organ kısırlığı bu türde çok sık rastlanan bir özelliktir. Limonlarda meyve verme ve çiçeklenme iklim şartları iyi olduğu sürece bütün sene sürer ve buna 'yediverenlik' özelliği denir. Limonlarda bu sık rastlanan bir özelliktir. Bu özellikte çevre şartlarına çabuk tepki vermesinin yanı sıra genetik faktörler de etkilidir. (Reuther ve ark., 1967; Saunt,1990; Tuzcu 1990)

Limon dünyada turunçgil üretiminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Dünyada limon üretimi 21 milyon ton civarındadır (FAO, 2019). Dünya limon üretiminde Meksika %29 pay ile lider konumda yer almaktadır (Şekil 1.1.). Limon üretiminde elverişli ekolojilere sahip olan ülkeler arasında potansiyeller ve avantajlar açısından mevcut durumu en iyi ülke Türkiye'dir. Çünkü ürün kalitesi oldukça yüksek olan Türkiye, barındırdığı Kütdiken türünün kalite, muhafaza ve uzun yola dayanıklılık ile dünyadaki çeşitleri ile kıyaslandığında benzeri olmaması nedeniyle gelecek yıllarda da uluslararası pazarda ağırlığını arttırarak korumaya devam edeceği düşünülmektedir (Bostan Budak D. ve ark., 2016).



Şekil 1.1.Dünya Limon Üretimi (FAO, 2019)

Türkiye 950 bin ton limon üretimi ile Dünya’da dördüncü sırada yer almaktadır. Bu üretimin %53’nü Mersin, %30’nu Adana, %5’ni Antalya, %7’sini Muğla ve %5’ini de Hatay meydana getirir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2.Türkiye ‘de limon yetiştiriciliği yapılan iller haritası (TÜİK,2019)

Ülkemizde 1960 senesinde varlığı tespit edilen, 1962 senesinde %75'lere kadar ulaşan bir zarara neden olan, bugüne kadar da farklı oranlarda ekonomik kayıplara sebep olan 'çöküntü, benek, çöpür' gibi adlarla bilinen Rumple, meyvenin pazar değerinin düşüren, yalnızca kabukta meydana gelen ciddi bir fizyolojik problemdir. Limonlarda görülen çöküntü; Ağustos ayı ortalarında küçük sarımsı lekeler halinde meyvede görülmeye başlayarak sonraki aylarda bu lekelerin belirginleşmesi ve daha ilerisinde sarımsı bölgelerde çöküntünün meydana gelmesi ve sonunda da çöküntülü bölgenin kahverengileşerek meyvelerin pazarlanamayacak duruma gelmesiyle sonuçlanan bir zarardır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3.Limon meyvelerinde gelişen çöküntü belirtileri (Kütüden limon)

Rumple hastalığı büyük ekonomik kayıplara sebep olacak boyutlarda görülmeye devam etmekte ve ekonomik açıdan ihracatta üreticileri olumsuz yönde etkilemektedir. Rumple hastalığının yayılışı ve yoğunluğunun belirlenmesi ve hangi limon çeşitleri arasında Rumple hastalığına karşı dayanıklı bir limon çeşidinin olup olmadığı milli ekonomiye katkı için oldukça önemlidir. Son yıllarda yapılan arazi tarama sonuçlarına göre çöküntü zararının en fazla Mersin ilinde bulunan limon bahçelerinde görüldüğü belirlenmiştir. Bahçelerin zararları her yıl

farklılık göstermekle beraber %5-50 oranındadır. Bu zararın görüldüğü bahçelerin büyük çoğunluğunu Kütdiken çeşidi oluşturmaktadır. Son yapılan Mersin Tarım Master Planı çalışmasına göre turunçgil üretimi ve pazarlaması konusunda gerçekleştirilen SWOT analizinde yedinci sıradaki tehdit olarak Rurple hastalığı yer aldığı bildirilmiştir (Ananyous, 2011).

Bu çalışma ile limon üretiminde önemli pazar kayıplarına ve ekonomik açıdan ürün değerinin yitirilmesine neden olan Rurple hastalığının Erdemli limon üretim alanlarındaki durumunu belirlemek ve ayrıca Rurple görülen ağaçlarda turunçgil viroid hastalıklarını araştırmak amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çöküntü hastalığını Florida'da 1956 yılında Knorr (1958) keşfetmiştir. Sonraki yıllarda aynı problem Russo ve Klotz (1963), Salerno ve ark. (1968) tarafından İtalyada, Florida, Korsika ve Kıbrıs'ta, Chapot ve Bahçecioğlu (1969) ve Chapot (1971) tarafından Türkiye, Lübnan ve Kıbrıs'ta ayrıca Chapot (1971) tarafından da Etiyopya'da gözlenmiştir.

Salerno (1965), bu hastalığın Sicilya'da uzun yıllardır bilindiğini ve hakkında çalışmalar yapıldığını bildirmektedir.

Chapot ve Bahçecioğlu (1969), çöküntü sorununun ilk zamanlarda yaygın olarak 1960-1961 yıllarında Antalya, Mersin, Adana ve Hatay (Arsuz) yörelerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Çöküntü zararı yıla ve bulunan yöreye göre farklılık gösterir. Knorr (1963) bu zararı %10-14, Salerno (1965) %30 ve Knorr ve Koo (1969) %38 olarak bildirmişlerdir. Örneğin Florida'daki meyve bahçelerinde %77, Türkiye'de %75 gibi oldukça fazla hasarlar ortaya çıkabilmektedir. (Knorr, 1963; Knorr ve Koo, 1969; Chapot ve Bahçecioğlu, 1969; Chapot 1971; Klotz ve ark. 1972).

Çöküntü, farklı ülkelerde farklı isimlerle anılır. İlk tanımlandığı Florida'da 1956 yılında Rumble (Knorr, 1958), İtalya'da "Raggrinzimento della Buccia" (Salerno, 1965), "Wrinkle-rind" (kırışik kabuk) (Russo ve Klotz, 1963) ve Türkiye'de "Çöküntü, Benek ve Çopur" (Özbek ve ark., 1974) olarak isimlendirilmiştir.

Oleocellosis, turunçgil meyve kabuklarında görülen fizyolojik bozukluktur. Çöküntü, Oleocellosis'e benzer şekilde kabuk hasarına sebep olur. Yağ keselerinin görünümünde değişiklik olmaz iken çevresindeki dokuların normal görünimleri kaybolur (Knorr, 1963).

Çöküntü'ye neden olan faktörler ve meyvelerde hasarın oluşumu pek çok arazi denemeleriyle araştırılmış fakat güvenilir sonuçlar elde edilememiştir.

Florida’da 1958 yılında yapılan ilk bilimsel çalışmalar hastalığın genetik yapı ile bağlantılı olduğuyla ilgilidir (Knorr, 1958, 1963; Knorr ve Koo, 1969).

Mantarlar, yaprak bitleri, bakteriler, böcek ve kurt ilaçları gibi durumlarla ilişkisi araştırılmış fakat olumlu bir sonuç alınmamıştır (Knorr, 1963; Salerno ve ark., 1968; Knorr ve Koo 1969). Virüs ve turuncgil taşlaşma hastalıkları ile ilişkili olabileceği varsayılarak araştırılmış ve olumlu bir sonuç alınmamıştır (Knorr, 1963; Chapot ve Bahçecioğlu, 1969; Knorr ve Koo, 1969; Chapot, 1971).

Çöküntü’nün su dengesi ve sulama ile ilişkisinin başlarda umut verici olduğu düşünülmüş ancak elde edilen bulgular tatminkar bulunmamıştır (Russo ve Klotz, 1963; Salerno, 1968, 1965; Scaramuzzi, 1965; Knorr, 1965, 1966, 1967; Salerno ve Continella, 1967; Salerno ve ark., 1968; Knorr ve Koo, 1969).

Çöküntü’nün fizyolojik bir hastalık olabileceği düşünülerek kabuk çatlaması ve yarılmaların önüne geçebilmek amacıyla GA3 ve antitranspirant uygulamışlar fakat beklenen sonuçlar alınmamıştır (Knorr, 1965; Knorr ve Koo, 1969).

Büyük meyvelerde küçük meyvelere göre daha fazla çöküntü belirtisi görüldüğü ve tacın güneş alan güney, batı ve güneybatı bölümlerinde de daha fazla olduğu belirtilmiştir (Salerno, 1965; Knorr ve Oberbacher, 1964; Oberbacher ve Knorr, 1965).

Çöküntü ilkbahar mevsimindeki çiçeklerden oluşan meyveleri daha fazla etkilediği belirtilmektedir (Salerno, 1968; Scaramuzzi, 1965).

Çöküntü’nün başlangıçta belli belirsiz olarak yaz mevsimi sonunda, kabuk üzerinde sarımtırak benekler şeklinde olduğu, bu beneklerin 4 veya 5 yağ kesesi ile kaplı olduğu, yağ keselerinin ilk olarak yeşilimsi kahverengi daha sonra sarımsı kahverengi, koyu kırmızımsı kahverengi ve kahverengimsi siyah olduğu ve sonunda da çöktüğü bildirilmektedir (Knorr ve Koo, 1969).

Meyve ve yapraklardan elde edilen analizlere göre zarar görmüş ağaçların yaprak ve meyveleri ile sağlıklı ağaçlardaki yaprak ve meyveler arasında herhangi

bir farklılık görülmemiştir (Salerno ve Continella, 1967; Salerno ve ark., 1968; Knorr ve Koo, 1969).

Daha önce yapılan araştırmalarda besin elementlerinin önemli bir sonuç oluşturmadığı bilinse de Özbek ve ark. (1977), limonlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda mikro besinler ile Çöküntü hastalığı arasında bir ilişki bulmuşlar; Mangan ve Çinko yokluğunun Çöküntü hastalığı gelişmesinden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir. 3 kg Mangan Sülfat ve 5 kg Çinko Sülfat (1000 litre suyla) dozlarıyla yaptıkları yaprak gübresi uygulamasının, Çöküntü belirtilerini azaltıcı bir etki gösterdiğini açıklayarak bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılması gerektiğini önermektedirler.

Toprak ve iklim koşullarının Çöküntü nedeni olabileceği bildirilmektedir (Russo ve Klotz, 1963).

Çok fazla azot gübrelemesi uygulanan ağaçlarda, orta veya düşük doz azot uygulanan ağaçlara kıyasla daha fazla çöküntü olmaktadır. Yapraklarında az miktar potasyum bulunan ağaçlar daha yüksek oranda çöküntü hasarı göstermektedir (Klotz ve ark., 1972).

Çöküntü belirtisi görülen meyvelerde pazar değeri azalmasına rağmen meyve suyu endüstrisinde kullanılmalarında herhangi bir sorun olmadığı belirtilerek, çöküntülü ve sağlıklı limonların konsantresi arasında farklılık bulunmadığı bildirilmektedir. Çöküntünün, kabuk yağ oluşumu ve kalitesinde olumsuz bir etki olmadığını savunmaktadırlar (Knorr ve Oberbacher, 1965).

Çöküntü genellikle meyvenin iç kalitesini olumsuz etkilememektedir (Knorr, 1958,1959; Knorr ve ark., 1963; Knorr ve Oberbacher 1964; Knorr ve Koo, 1969).

Çöküntü sonucu meyvelerin depolama süresi azalmakta ancak depo içerisindeki sıcaklığın düşürülmesi ve oransal nemin artırılması sonucu bu etki büyük oranda azaltılmaktadır (Knorr ve Oberbacher, 1964).

İspanya'nın Malaga kentinde yapılan bir çalışmada, çöküntü gösteren ağaçların meyvelerindeki zarar durumu ve taç üzerindeki yerleriyle ilgili tespitler

yapmışlardır. Ağaç tacının iç ve dış kısımlarındaki meyvelerde zararın bulunduğu, genellikle tacın doğu ve güneye bakan yüzeylerinde zararın çoğunlukta olduğu belirtilmektedir (Wong ve ark., 2006).

Limon yetiştiriciliğinin en fazla olduğu illerden biri olan Mersin’de Çakır ve ark., (2002) çöküntünün genel durumunu değerlendirmek üzere bir sörvey çalışması yapmışlardır. Çalışma Silifke, Erdemli, Mersin Merkez ve Tarsus ilçelerine bağlı Limonlu, Burunucu, Kocahasanlı, Kumkuyu, Erdemli Merkez, Tömük, Çarkçılı, Kargıpınarı, Tece, Çeşmeli, Mezitli, Davultepe ve Tarsus Merkez köy ve beldeleri dahilinde çöküntü sorunu görülen 60 bahçede yapılmış gözlem ve görüşmeler sonucu elde ettikleri bilgileri değerlendirmişlerdir. Değerlendirmeler sonucu bu bahçelerin, %36’sında çöküntü zararının %15-30 arasında, %33’lük kısmında çöküntü zararının %5-15 arasında, %18’inde çöküntü zararının %30-50 arasında, %11’inde çöküntü zararının %50’nin üzerinde ve %2’sinde ise çöküntü zararının %5’ten az olduğu belirlenmiştir. İncelenen bahçelerde teknik çerçeveye uymayan şekilde gübreleme yapıldığı ve bu bahçelerin %33’ünde kompoze gübre uygulandığı bildirilmiştir. Çalışmadaki bahçelerin %53’ünde ağaçlarına uç alma budamasının teknik önerilere uymayarak ilkbahar döneminde yapıldığı bildirilmiştir. Ve çöküntü zararı görülen bu bahçelerin %42’sinin 20 yaş üzerinde, %40’nın 10-20 yaş arasında ve %18’nin ise 10 yaşından küçük olduğu tespit edilmiştir.

Viroidler arasında PSTVd’den sonra viroid olarak açıklanan ikinci bitki patojeni, turunçgil ağaçlarında hastalık oluşumuna sebep olan Turunçgil exocortis viroidi (CEVd)’dir ve 1972 senesinde viroid olduğu tanımlanmıştır (Semancik ve Weathers, 1972).

CEVd, tek iplikçikli, circular veya linear forma sahip 105.000 civarında dalton ağırlığında ve RNA zincir uzunluğu 371 nükleotid olup Rutaceae, Solanacea ve Compositae familyalarında hastalık oluşumuna sebep olmaktadır (Rivera-Bustamente ve Semancik, 1986; Roistacher ve ark., 1978; Semancik ve Weathers, 1972; Semancik, 1987).

Exocortis hastalığının ilk olarak Fawcett ve Klotz'un 1948 yılında Kaliforniya'da tanımlandığı ve aşı gözü ile taşındığı bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949,1950).

Portakal, altıntop, mandarin ve bilhassa turunç üzerinde bir simptom görülmezken, latent halde bulunmaktadır. Bu patojeni, turunç simptomsuz taşıdığından ve yaygın anaç olarak kullanılması nedeniyle hastalığın turunçgil üzerinde gerçek dağılımı bilinmemektedir. Yine de dünyada turunçgil yetiştiriciliği yapılan tüm belgelerde yaygınlığı rapor edilmiştir (Wallace, 1978; Duran-Vila ve ark., 1988).

Turunçgil tristeza virüsü (CTV)'nün turunçgil bahçelerinde yoğun hasarlar meydana getirmesinden sonra CEVd ciddi anlamda bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Pek çok üretici tarafından CTV'ye hassas turunç anacının yerine üç yapraklı ve üç yapraklı hibritlerini anaç olarak kullanılmaya başlaması sonucunda CTV'ye tolerant olan bu anaçlar CEVd'ye duyarlı olduğundan kısa bir sürede CEVd'nin bir sorun olmasına neden olduğu bildirilmiştir. (Semancik, 1987).

Benton ve ark. (1949) tarafından üç yapraklı anacının toprak üzerinde olan kısımlarında kabuk çatlamalarına, soyulmalara ve ağaç gelişimine engel olarak da bodurluğa sebep olduğu bildirilmiştir.

CEVd'ye karşı duyarlı olan türlerin, üç yapraklı ve hibritleri (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), anaç olarak kullanılan Rangpur laymı (*C. aurantifolia*), bazı citron ve limonları kapsadığı belirtilmektedir (Weathers ve Calavan, 1961).

CEVd, duyarlı olmayan turunçgil ağaçlarında simptom oluşturmaksızın ağaçlarda bodurlaşmaya sebep olabilmektedir. Pek çok ticari cins ve çeşitler tolerant olmasına rağmen, bu bitkilerin duyarlı anaçlara aşılması sonucu hastalığın bir belirtisi olarak anaçta kabuk kavlamaları görülür (Benton ve ark.,1949).

CEVd'nin oluşturduğu hastalık ülkemizde turunçgil cüceleşme hastalığı olarak isimlendirilmiştir (Semancik et al., 1994). Hastalığın sebep olduğu

ekonomik zarar, daha çok elde edilen verimin azalması ve ağaç ömrünün kısılmasından kaynaklanmaktadır. CEVd turunçgil ağaçlarının gelişimini engelleyip ağaçları bodur bırakmasına rağmen meyve kalitesine olumsuz bir etki göstermemektedir. Ancak ağaçlarda tacın küçülmesinden kaynaklı elde edilen ürün miktarının azaldığı bildirilmektedir (Broadbent ve ark., 1988).

CEVd ile bulaşık üç yapraklı anacı üzerindeki Satsuma mandarin fidanları ile yaptıkları bir araştırmada, sürgün uzunluğunun ve gövde çapının kontrol grubundaki bitkilere kıyasla %10 ile %40 oranında küçüldüğünü bildirmişlerdir (Yamada ve Tanaka, 1972).

Günümüzde CEVd'nin kabuk kavlamasını göstermeyen, fakat bodurlaşmaya sebep olan ırkı veya ırkları yetiştiricilik alanında birim alanda çok sayıda ağaç yetiştirmek ve üretimi arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. İlk yapılan uygulamalar portakal ve mandarinler üzerinde Avustralya'da yapılmıştır. Böylelikle yüksek ürüne ek olarak kültürel işlemlerde ve hasat döneminde kolaylık sağlanmaktadır (Broadbent ve ark., 1988).

Turunçgillerde CEVd'den sonra bildirilen ikinci viroid Turunçgil cachexia viroididir (CCaVd). Bu viroidin sebep olduğu mandarin ve mandarin hibritlerinin aşı birleşme noktasında floemde renk bozulması ve zamklanma belirtileri ile karakterize olan cachexia hastalığı 1950 senesinde Childs tarafından Latince kötü anlamını taşıyan kakos ve koşul anlamında kullanılan hexis kelimelerinin birleştirilmesi ile kötü koşul anlamında cachexia olarak tanımlanmıştır. Nükleotid sayısı 299 olan bu hastalık durumunun Turunçgil cachexia viroidi aracılığı ile oluşturulduğu belirlenmiştir (Semancik ve ark., 1988).

Kaliforniya üniversitesi ve İspanya ortak araştırmaları sonucu Cachexia hastalık sendromunun bilhassa CVD-IIb tarafından meydana geldiği ve bu sebeple hastalık etmeni için *Turunçgil cachexia viroidi* (CCaVd) teriminin kullanılması gerekliliğini belirtmişlerdir (Semancik ve Roistacher, 1991).

CCaVd nin oluşturduğu hastalık ülkemizde turunçgil gözenekleşme hastalığı olarak isimlendirilmiş Reichert (1959), Norman (1969) ve Moreira (1965) tarafından düzenlenen raporlarla simptomolojik olarak bildirilmiştir.

Gözenekleşme hastalığının spesifik simptomlarının duyarlı turunçgil çeşitlerinin kalem kısmında aşı birleşme noktasından başlayarak yukarı kısımda bulunan primer dallara kadar devam eden floem renklenmesi, odunda çukurluklar ve buna karşı olacak biçimde kabuk kambiyal yüzeylerinde zamklı çıkıntılar olduğu bildirilmiştir (Calavan ve ark., 1961).

Gözenekleşme hastalığına duyarlı tür ve cinsler; mandarin ve mandarin hibritleri, *C. macrophylla*, Parson's Special mandarin ve Orlando tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) dur (Calavan ve Chistiansen, 1965). Bu etmen, dünyada turunçgil yetiştiriciliği yapılan bütün ülkelerde bulunur ve mandarin ve hibritlerinde daha yaygındır. Cachexia (gözenekleşme) hastalığı nedeniyle meydana gelen kayıpların cüceleşme hastalığına kıyasla çok daha fazla olduğu ve Cachexia'nın mevcudiyetinde ağaçların tamamen veriminin azalmasıyla geriye doğru ölümlerin olduğu belirtilmiştir (Reichert ve Bental, 1957).

Özellikle hastalığın duyarlı çeşitlerde yarattığı kayıpların %75'in üzerinde olduğu ve Cachexia hastalığının yaygınlığının önemli ölçüde fazla olmasının çeşit değiştirme uygulamalarında enfekteli ağaçlara duyarlı çeşitlerin aşılmasında büyük bir rol oynadığı bildirilmektedir (Semancik, 1987).

Turunçgillerde görülen viroid hastalıkları genellikle exocortis ve cachexia olarak bilinmesine rağmen; günümüzde dört cins içinde 7 adet viroidin yer aldığı Çizelge 2.1'de açıklanmaktadır (Di Serio et al., 2014): *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HpSVd), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Citrus viroid V* (CVd-V) ve *Citrus viroid VI* (CVd-VI).

Çizelge 2.1. Turunçgil bitkilerini enfekte ettiği bilinen viroidler
(<http://www.ictvonlinenorg/virusTaxonomy.asp>)

Familiya	Cins	Viroid Türü	Nükleotit Sayısı	Sinonimi	Varyantları	Hastalık Adı
Pospiviroidae	Pospiviroid	CEVd	371-410			Cüceleşme
	Hostuviroid	HpSVd	297-303	CVd-II	CVd-IIa CVd-IIb CVd-IIc	Gözenekleşme
	Apscaviroid	CBLVd	318	CVd-I	CVd-Ia CVd-Ib	
	Apscaviroid	CDVd	294-297	CVd-III	CVd-IIIa CVd-IIIb CVd-IIIc CVd-IIId	
	Cocadviroid	CBCVd	284	CVd-IV		
	Apscaviroid	CVd-V	293-294			
	Apscaviroid	CVd-VI	329-331	CVd-OS		

Turunçgillerde bulunan ve farklı sayılarda nükleotide sahip olan viroidler;

- %5'lik sPAGE (Sequential polyacrylamide gel electrophoresis)'deki elektroforetik hareketlilikleri,
- Spesifik cDNA problemlerinin kullanıldığı hibridizasyon yöntemi ile saptanan dizilim benzerlikleri,
- Konukçu dizini ve ayırt edici konukçulardaki biyolojik özellikleri, Etrog citron (*C.medica*) bitkisinde ortaya koydukları belirtiler gibi kriterler göz önüne alınarak ayrımlarının yapıldığı bildirilmektedir

(Duran-Vila et al., 1988; Semancik et al., 1988; Ashulin et al., 1991; Puchta et al., 1991; Semancik and Duran-Vila, 1991; Levy and Hadidi, 1993; Reanwarakorn and Semancik, 1998; Reanwarakorn and Semancik, 1999; Rakowski et al., Owens et al., 2000; Ito et al., 2001; Ito et al., 2002; Serra et al., 2008).

Turunçgillere akraba olan viroid hastalıklarına immun *Atalantia citroides* bitki türünde yeni bir viroid tespit eden Serra ve ark. (2008) bu viroidi CVd-V olarak tanımlamışlardır. CVd-V yeni bir cins olarak öne sürülmüş ve Pospiviroidae familyası içerisinde *Apescaviroid* cinsine dahil edilmiştir. Nükleotid sayısı 293-294'tür. Etrog citron (*C.medica*) ve Orlando tanjelo (*C. paradisi x C. reticulata*) üzerinde uygulanan biyolojik indeksleme ve bunu takip eden sPAGE analizleri HSVd ve CVd-III ile viroid benzeri RNA'nın varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu araştırmacılar ABD, Nepal, İspanya ve Umman'ın turunçgil yetiştiricilik bölgelerinden topladıkları 64 örneği de analiz ederek CVd-V açısından bulaşıcılık tespit etmişlerdir. CVd-V özellikle portakal, mandarin, mandarin hibritleri, turunç ve kamkatta görülmekle birlikte pek çok turunçgil çeşidinde ve turunçgile akraba cinslerde bulunabilmektedir (Serra et al., 2008). CVd-V'nin *Etrog citron*'da bodurlaşma ve yaprak nekrozları gibi belirtiler gösterdiği açıklanmaktadır. Bu viroid türü turunçgil çeşitlerinde tek başına yer almayarak diğer viroid türleriyle (CBLVd ve CDVd) beraber bulunması nedeniyle turunçgillerde meydana getirdiği semptomların net olarak bilinmediği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Serra et al., 2008; Hamdi et al., 2015).

İlk defa Kaliforniya'da pek çok turunçgil viroidini içerisinde barındıran bir turunçgil çeşidinden elde edilen CVd-IV'nin (Duran-Vila et al., 1988), turunçgil yetiştiriciliği yapılan ülkelerde en az gözlenen viroid çeşidi olduğu bildirilmektedir (Duran-Vila and Semancik, 2003). CVd-IV 284 nükleotit uzunluğunda ve oldukça korunaklı nükleotit dizilimine sahip olup İsrail ve Türkiye'de aşı ile taşınan bodurlaştırıcı faktör olarak bildirilmiştir (Hadas et al., 1989; Önelge et al., 2000). CVd-IV ile CEVd yakın homolojiye sahip olmakla beraber sol terminal bölgesinin

HpSVd'ye oldukça benzer olmasından dolayı CVd-IV viroidinin yeni bir mozaik karakterli kimerik bir viroid olabileceği düşünülmüştür (Puchta et al., 1991).

CVd-III'ün konukçuluğunun turunçgillerle sınırlı olup *Etrog citron* bitkilerinde yaprak petiollerinde meydana gelen nekrozlardan kaynaklı bozuk görünüme sahip yaprakların gelişmesine neden olduğu bildirilmektedir (Duran-Vila et al., 1988). Üç yapraklı anacına aşılı turunçgil çeşitlerinde ağaç gövdesinde görülen el izi ve boğulmaların, CVd-III ile ilişkili olmadığı Kaliforniya ve İspanya'da yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Roistacher et al., 1993). Turunçgil yetiştiriciliği yapılan pek çok ülkede hastalık oluşturmaması CVd-III'ün potansiyel bodurlaştırıcı faktör olarak tanımlanmasına neden olmuştur (Gillings et al., 1991; Semancik et al., 1997; Villalobos et al., 1997; Owens et al., 2000).

Ito et al. (2001) tarafından Japonya'da yapılan bir çalışmada, turunçgillerde Original Source (OS) olarak isimlendirilen 330-331 nükleotit uzunluğunda yeni bir viroid çeşidinin bulunduğu belirtilmiştir. Bu viroid çeşidi turunçgil bitkilerindeki diğer hastalıklarla ilişkilendirilmemiş olup *Etrog citron* bitkilerinde zayıf petiol nekrozlarına ve yaprak bantlaşmalarının oluşmasına neden olduğu açıklanmıştır. İlk zamanlar CVd-OS olarak adlandırılmış olan bu viroidin adı daha sonra CVd-VI olarak değiştirilmiştir (www.ictvonline.org). CVd-VI'nın CEVd, CVd-III ve CVd-IV ile benzer nükleotit diziliminde olması büyük olasılıkla bu viroid çeşitlerinin replikasyonu esnasında rekombinat olarak meydana gelmiş kimerik bir viroid olabileceği düşünülmüştür (Ito et al. 2001).

Türkiye'de turunçgil viroidlerinin ilk olarak yabancı araştırmacıların yaptığı çalışmaların sonucu olduğu bilinmektedir. FAO uzmanı olarak bilinen ABD'den ülkemize davet edilen Norman (1963) ülkemizde yaptığı çalışma sonucu hazırladığı raporda turunçgil ağaçlarında farklı virüs hastalıklarına ek olarak exocortis ve cachexia hastalıklarının da bulunduğunu belirtmiştir.

Turunçgil cüceleşme hastalığının Türkiye'de varlığı ilk kez Norman (1963) ve Moreira (1965) tarafından söylenmiştir.

1964 yılında Antalya Turunçgil Araştırma Enstitüsü'nde turunçgil virüs ve virüs benzeri hastalıkları üzerine başlatılan çalışmalar 1977 yılına kadar sürmüş ve çalışmaya dahil edilen ağaçların %30'unun cachexia-xyloporosis hastalığıyla, %72.7'sinin de exocortis hastalığı aracılığıyla bulaşık olduğu belirtilmiştir (Hızal ve Göral,1987).

Üç yapraklı anacının kullanıldığı Ege Bölgesi'nde 1964-1965 yılları arasında bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya 2.5 milyon civarında turunçgil ağacı dahil edilmiş ve bu ağaçların %23'ünün cachexia-xyloporosis hastalığı ile, %10'unun ise exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Özalp ve Azeri, 1967).

Ege Bölgesi'nde Satsuma mandarin ağaçlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkları değerlendirmek amacıyla yapılan sorvey ve indeksleme sonuçlarına göre Satsuma ağaçlarının %4.26'sının exocortis, %1.58'inin cachexia-xyloporosis hastalıkları ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Azeri ve Heper, 1973).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir başka çalışmada, gözenekleşme hastalığının latent halde bulunduğu Vaşington navel, Yafa ve Valensiya ağaçlarında hastalığın mevcudiyeti biyolojik indeksleme ile ortaya konmuştur (Güldür, 1988).

1988 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan navel grubu portakal ve Satsuma ağaçlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkların tespit edilmesi amacıyla yapılan sorvey ve indeksleme çalışma sonucuna göre Satsuma madarinlerinin %37 oranda gözenekleşme hastalığı ile bulaşık olduğu ve indekslenen 16 Vaşington navel ağacının ise %13'ünün CEVd ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Güllü,1989).

Çınar ve ark. 1993 yılında ülkemiz turunçgil yetiştiriciliğinde virüs ve virüs benzeri hastalıkları tespit etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre turunçgil yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıpları oluşturan toplam 15 viroid, virüs ve virüs benzeri hastalık yer almaktadır. Yine ülkemizde yapılan bir başka sorvey çalışmasında, mevcut ağaçların pek çoğunun bu patojenlerden biri veya birkaçı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Güllü,1989).

Viroide spesifik hastalık belirtileri farklı her üründe değişik şekillerde gözlenebilmektedir. Bununla birlikte bağ ve şerbetçi otu gibi vejetatif çoğaltılan ürünlerde ve aşı gözü ile çoğaltılan turunçgillerde hastalık belirtilerine neden olmayan latent viroid varlığının yaygın olduğu öne sürülmüştür (Sanger, 1988). Ülkemizde ise Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunç anacı üzerinde yetiştirilen turunçgillerde semptom gözlenmemekle beraber CEVd ile önemli ölçüde bulaşıklık saptanmış ve Turunçgil cachexia viroidi (CCaVd)'nin de mandarin çeşitlerinde ekonomik olarak zarar meydana getirdiği belirtilmiştir (Güllü 1989; Önelge 1994).

Çukurova Bölgesi'nde yapılan bir sorvey çalışmasında navel portakal ve mandarin ağaçlarının büyük çoğunluğunun CEVd ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Çınar ve ark.,1993).

Klemantin ve Satsuma mandarinleri üzerinde çalışılan turunçgillerde hastalık oluşumuna neden olan viroidlerin biyolojik ve biyokimyasal tanısı konulu bir çalışmada sPAGE yöntemi kullanılarak CEVd ve CCaVd'e ek olarak tüm turunçgil viroidlerinin mevcudiyeti belirlenmiştir (Önelge, 1994).

İsrail'de yapılan önceki çalışmalara göre avokado ve asmada nükleotid dizilimleri tespit edilen CVd-Ib ve CVd-IV'ün Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan portakal ağaçlarında sırasıyla 317 ve 285 nükleotidli olduğu saptanmış ve nükleotid dizilimleri de analiz edilerek rapor edilmiştir (Önelge,1996).

Önelge (1997), Çukurova Bölgesi turunçgil ağaçlarından elde ettikleri CEVd izolatu Etrog citron (*C.medica*) ve Gynura bitkilerine inokule etmiş ve bu bitkilerde CEVd'nin 371 nükleotidli olduğu ve bu nükleotidlerin dizilimlerini belirlemiştir.

Turunçgil viroidlerini tespit etmek amacıyla Çukurova'da yürütülen bir sorvey çalışmasından toplanan örneklerin CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III ve CVd-IV ile bulaşık olduğu, teste tabi tutulan tüm turunçgil çeşitlerinin büyük çoğunluğunda CEVd, CVd-II ve CVd-III gibi bir viroid profili gösterdiğini ve bu viroidlerin genellikle beraber bulunarak ortak enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir (Önelge, 2007).

Viroidler ribonükleik asit (RNA) yapısındadır ve antiserumları olmadığı için tanılanmalarında serolojik teknikler uygulanamamaktadır. Elektron mikroskobu uygulamalarının viroidlerin rutin tanısında başarılı olmadığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

Turunçgil viroidlerinin tanılanması için günümüzde 2 yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki biyolojik indeksleme yöntemi, diğeri de moleküler yöntemle viroid bantlarının moleküler tanısı ve moleküler hibridizasyon yöntemleridir (Riesner ve Gross, 1985; Semancik ve Roistacher, 1961).

Biyolojik indeksleme prosedürlerinin, duyarlı tür ve cinslerde aşı inokulasyonu sonrası meydana gelen semptomları inceleme üzerine olduğu, şu an dahi aşı aracılığıyla taşınan patojenlerin tanı ve karakterizasyonunda zorunlu bir deneme yöntemi olduğu belirtilmiştir (D'Onghia ve ark., 2007).

Viroid infeksiyonlarının deneysel anlamda konukçu bitkilere transferi bilhassa biyokimyasal araştırmalar açısından önemlidir. Pek çok durumda yapay konukçuların kontrollü şartlarda daha hızlı büyüme gösterdiği ve bunların dokularının viroid izolasyonunun değerlendirmesinde kolaylık sağladığı belirtilmektedir (Semancik ve DuranVila, 1991).

Etrog citron (*C.medica*) bitkilerinin indikatör bitki şeklinde uygulaması ilk olarak Salibe ve Moreira tarafından amaç edinilmiş olup kontrollü koşullar çerçevesinde bu yöntem exocortis hastalığının tanısı için hızlı ve duyarlı bir prosedür olarak geliştirilmiştir (Calavan ve ark.,1964;1968). Citron seçimi ile ilgili yıllar süren çalışmalar yapılmış ve Etrog klonunun diğerlerinden çok daha duyarlı bir indikatör olduğu ve CEVd'nin hafif ırklarının bile bu klon üzerinde çok kolay semptom geliştirdiği (Çizelge 2.2.) belirtilmiştir (Roistacher ve ark.,1977). Başlangıçta bu test CEVd'nin tanısı için tasarlanmış iken daha sonraları bu indikatörün diğer viroid çeşitleri için de kullanılabileceği bulunmuştur.

Çizelge 2.2. CEVd'nin ve diğer turuncgil viroidlerinin Etrog citron bitkisinde oluşturduğu belirtiler (Roistacher ve ark, 1977; Duran-Vila ve ark, 1988a,b).

Viroidin Adı	Bitki Gelişimi	Yaprak Belirtileri			Gövde Belirtileri		
		Orta Damar Nekrozu	Petiyo- l Nekrozu	Yaprakta Epinasti	Nekrotik Lezyon (Yarılma)	Çatlama	Zamklanma
CEVd	Şiddetli	Genel	+	Şiddetli	+	+	-
CVd-I (CBLVd)	Hafif	Lokal	-	Seyrek	+	+	+
CVd-II (CCaVd)	-	-	+/-	-	-	-	-
CVd-III (CDVd)	Hafif	Genel	+	Orta	-	-	-
CVd-IV (CBCVd)	Hafif	Genel	-	Seyrek	-	-	-
CVd-V	Hafif	-	-	-	+	+	-

+ : Belirti var - : Belirti yok

3. MATERYAL VE METOT

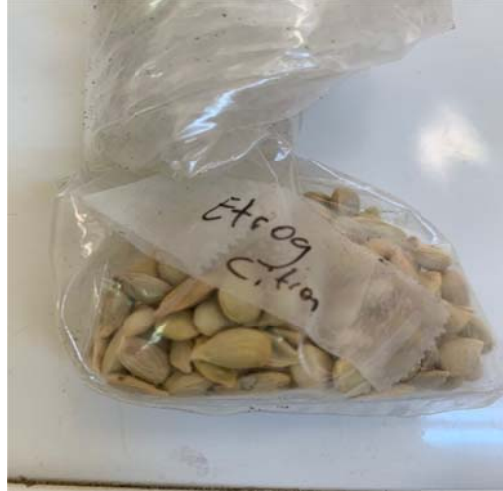
3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal

Bu çalışma Mersin ilinin Erdemli ilçesindeki limon bahçelerinde gerçekleştirilmiştir. Bölgede Kütdiken, Mayer, İtalyan Memeli, Aydın ve Enterdonat limon çeşitleri yetiştiriciliği yapılan bahçelerde sörvey çalışması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca simptomlu ve simptomsuz ağaçlardan bitkisel materyal toplanmıştır. Rurple hastalığı ile bulaşık limon ağaçlarına ait örnekler çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur.

3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Yürütülen biyolojik indeksleme çalışmalarında tohumdan yetiştirilmiş olan etrog citron bitkileri kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Biyolojik indeksleme çalışmaları esnasında; lateks eldiven, şırınga ucu, %2'lik hipoklorit, 1X TKM tamponu çözeltisi, saf su, parafilm bantlar, viyoller ve plastik saksılar kullanmıştır.



Şekil 3.1. Etrog citron çekirdekleri

3.1.3.Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmasında Kullanılan Materyal

Yürütülen TNA ekstraksiyonu çalışmalarında; Mersin'in Erdemli ilçesi limon bahçelerinden alınan bitki örnekleri, hassas terazi, mikrosantrifüj cihazı, CTAB buffer (PVP-40, Tris HCL, EDTA, NaCl, β -Mercaptoethanol), havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, %2'lik hipoklorit, kurutma kağıdı, 1,5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, derin dondurucu, vorteks ve santrifüj cihazı, kloroform : izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi, saf su cihazı gibi çeşitli materyaller ile laboratuvar aletlerinin sterilizasyonu amacıyla da otoklav ve etüv gibi ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.4.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yürütülen PCR çalışmalarında, TNA ekstraksiyonu ile daha önceden elde edilmiş olan TNA örnekleri, turunçgil viroidlerine özgü primerler, RNase-free su, 10X Dream taq, dNTP (10mM), Go Taq enzim, değişik hacimlerdeki bazı pipet ve pipet uçları, PCR tüpleri, vorteks karıştırıcı, santrifüj cihazı, buz makinesi ve thermal cycler aleti kullanılmıştır.

3.1.5.Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

PCR çalışmalarında, TAE tampon, agar jel, elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 1000 ve 200 bp DNA markörü materyal olarak kullanılmıştır.

Tüm jellerin görüntülenmesi aşamasında UV transillüminatör cihazı ve jel yıkama tamponu olarak saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür ve fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Sörvey Çalışmaları

Mersin ili, Erdemli ilçesi 95.130 da limon dikili alanların %1'i tesadüfi sörvey alanı olarak seçilmiştir (Bora ve Karaca 1970). Sörvey çalışmaları Çöküntü hastalığının belirtisini sadece limon meyvelerinde göstermesinden dolayı bitkilerin meyve döneminde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen %1'lik sörvey alanlarının tamamı gezilmiş ve limon ağaçları hastalığın makroskobik simptomları açısından gözlemlenmiştir. Sörvey çalışması bölgede yaygın olarak yetiştirilen Kütdiken, Mayer, İtalyan Memeli, Aydın ve Enterdonat limon çeşitlerinde gerçekleştirilmiştir.

Meyvelerde; hastalığın zaman seyrine göre yaz sonunda kabuk üzerindeki sarımsı benekler halinde görüldüğü, bu beneklerin her birinin 4 veya 5 yağ kesesi ile kaplı olduğu ve bu meyvelerin bulunduğu ağaçlar hastalık ile bulaşık olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Çöküntü Hastalığı ile Enfekteli Bitki Örneklerinin Toplanması

Çöküntü hastalığı görülen ağaçlarda bulunan viroid hastalıklarının araştırılması amacıyla çalışmada kullanılan turunçgil örnekleri, Mersin ilinin Erdemli ilçesi limon bahçelerinden çöküntü hastalığının meyvelerde gösterdiği belirtiler gözlemlenerek toplanmıştır. Örnekler seçilen her bir ağacın farklı yönlerinden olmak üzere üçer adet dal ve yaprak olarak alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilerek buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı'na getirilmiş ve indeksleme ve moleküler tanı çalışmalarında kullanılmak üzere +4C°'de buzdolabında saklanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2.Çöküntü Hastalığı ile Enfekteli Bitki Örnekleri

3.2.3.Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi ve İnokulasyon Çalışması

Çöküntü hastalık etmeninin tanısını araştırmak için indikatör bitki olarak Etrog citron tohumlarından yetiştirilen fidanlar kullanılmıştır. Tohumların ekildiği, bitki yetiştirme ortamı içinde 1:1:1 oranında, ince kum, ticari torf karışımı ve sünger taşı (pumice) kullanılmıştır. Tohumlar, belirtilen yetiştirme ortamının bulunduğu saksılara, her saksıya 4-5 tohum olacak şekilde ekilmiş ve can suları verilmiştir. Tohumlarda çıkış gözlemlenene kadar soğuk havalardan etkilenmemeleri için, ÇÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Parsellerinde bulunan seralara konulmuştur. İndeksleme için kullanılacak olan etrog citron çöğürleri, 10-15 cm büyüklüğe ulaştığında tek tek saksılara şaşırtılmıştır. Düzenli olarak haftada bir kez sulama ve gübrelemesi yapılmıştır. Bu işlemlerden bir yıl

sonra, ilkbaharda, etrog citron fidanlarına mekanik inokulasyon uygulaması yapılmış ve sonrasında simptom gözlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Biyolojik indeksleme çalışmalarında farklı limon türlerinden alınan dal ve yaprak örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca sörvey sırasında bulaşık bahçe içinde enfekteli olmayan ağaçlardan da dal ve yaprak örnekleri biyolojik indeksleme çalışmalarına alınmıştır.

3.2.4.Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmaları

Çöküntü hastalığının moleküler olarak tanınması için CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tamponu kullanılarak enfekteli bitkilerden patojene ait TNA elde edilmesi sağlanmıştır (Murray ve Thompson, 1980). CTAB tampon içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.CTAB tampon içeriği

Ph:8.00	200 ml
CTAB (hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)	4.00 g
Tris HCL	3.14 g
EDTA	1.16 g
NaCl	16.34 g
PVP-40 (%2)	4.00 g
2 Mercaptoethanol % 0.2	200 µl

Gerçekleştirilen TNA ekstraksiyonu çalışmaları, her bir örnek için aşağıda verilen yönteme göre Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarında yürütülmüş ve aşağıdaki ekstraksiyon aşamaları uygulanmıştır.

- Bitkisel materyallerden 500 mg miktarında örnek alınarak, 1:10 m/v CTAB tamponu çözeltisi eklendikten sonra örnek homojen olacak şekilde havanlar yardımıyla ezilmiştir.
- 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 2 ml bitki özsuğu pipet yardımıyla alınmıştır.
- Örnekler 65 °C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilmiş ve 60 dakika bekletilmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst sıvı fazdan 1 ml'lik kısım aktarıldıktan sonra, tüplere 1 ml kloroform: isoamil alkol (24 : 1) eklenip ve çalkalanarak iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst fazdan 750 µl alınıp aktarılmış ve üzerine 450 µl soğuk 2-propanol eklenip yavaşça 2 kez karıştırılmıştır.
- -20 °C'de 60 dakika inkube edilmiştir.
- İnkube edilen örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip, sıvı faz dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.
- Kalan pelet (katı faz) ise 1 ml % 70'lik etanolle yıkanmıştır.
- % 70'lik etanolle yıkanan örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, % 70'lik etanol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
- Örnekler kurutma kağıdı üzerinde hava ile kurutulmuştur.
- Katı kısım (pelet) 100 µl TE tampon çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.

- Ekstrakte edilen total nükleik asit kullanılıncaya kadar, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.
- Spektrofotometre’de $A_{260/280}\text{ nm}$ ’de konsantrasyonu belirlenmiştir. Yüksek kalitede nükleik asit için optimum $A_{260/230}$ değeri 1.8’e yakın olan örnekler çalışmada kullanılmıştır.
- Ters transkriptaz işlemi için 3-5 μl TNA kullanılmıştır.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Aşaması

PCR işlemi aşağıda verilen çizelgedeki kimyasallardan karışım hazırlanarak her bir örnek için aşağıdaki yöntemle göre işlem yapılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
Master mix	12,5 μl
RNase-free su	8.5 μl
Primer F (10 mM)	1 μl
Primer R (10 mM)	1 μl
Örnek	2 μl
Toplam Hacim	25 μl

- Buz üzerindeki, steril mikrosantrifüj tüplerinde 8,5 µl ddH₂O Master mix Primer F (10mM) Primer R (10mM) eklenerek hazırlanmıştır.
- PCR tüplerinde 25 µl miktarında hazırlanan son hacim, thermal cyclers aletine yerleştirilmiştir.
- Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PCR koşulları ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır. Bu çalışmada modifiye edilen PCR koşulları Çizelge 3.3’de verilmiştir.
- Elde edilen tüm PCR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3.Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları

Ayrılma sıcaklığı	94°C	3 dakika	1 döngü
Bağlanma sıcaklığı	94 °C	30 saniye	40 döngü
	60°C	30 saniye	
	72°C	1.5 dakika	
Uzama sıcaklığı	72°C	5 dakika	1 döngü

Çizelge 3.4.Çalışmada kullanılan primer çiftleri

CCaVd	Primer	Genom Uzunluğu (bp)
Forward	ACTCTTCTCAGAATCCAGCGAG	300
Reverse	TGCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGT	

Çizelge 3.5.Çalışmada kullanılan primer çiftleri (Önelge, 1997)

CEVd	Primer	Genom Uzunluğu
Forward	5'GTGCTCACCTGACCCTGCAGG3'	371
Reverse	5'ACCACAGGAACCTCAAGAAAG3'	

3.2.6.Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi

Yürütülen bu çalışmada ‘agar jel elektroforez yöntemi’ kullanılmıştır. Bu yöntem ise Önelge (1997) göre modifiye edilerek yürütülmüştür.

Agar jel elektroforez yöntemi için adım adım izlenen aşamalar, aşağıda belirtilen adımlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

- 100 ml 1X TAE tamponu çözeltisi ve 1.5 gram agar maddesi kullanılarak hazırlanan karışım, mikrodalga fırında 2 – 3 dakika süre ile agar maddesi iyi bir şekilde eriyinceye kadar ısıtılmıştır.
- Jel tepsisi düz bir zemin üzerinde ayarlanıp, yüklenecek örnek sayısına uygun tarak yerleştirilmiştir. Hazırlanan agar karışımı biraz soğuduktan sonra jel tepsisine kabarcık oluşmayacak şekilde dökülerek, agar jelin donması için oda sıcaklığında bir müddet bekletilmiştir.
- Katılaştıran jel, jel tepsisi ile birlikte tankın içine yerleştirilerek, 1X TAE tamponu çözeltisi ile tankın içerisine jeli kapatacak şekilde dökülmüş ve tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır.

- Jel çukurlarının başlangıç çukuruna 8 µl 100 bp'lik DNA markör, diğer çukurlara ise 10 µl hacminde olmak üzere örnekler, pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril distile su) yüklenmiştir.
- Elektroforez aparatı elektrik akımını sağlayan güç kaynağına bağlanarak, örnekler 80 – 100 volt ayarında 25– 35 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez işlemi tamamlanan agar jel tepsiden ayrılarak biraz soğuması sağlandıktan sonra, saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür çözeltisi içerisinde yaklaşık 10 dakika süre ile bekletilmiştir.
- Bekleme aşaması tamamlanan agar jel, UV transilluminator aleti aracılığı ile görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.7.Sekans Analizi ve Verilerin Karşılaştırılması

PCR ve agar jel elektroforez çalışmaları sonucunda pozitif bulunan örnekler, aynı koşullarda PCR uygulanarak 200 µl hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan tüm örnekler nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana ilinde bulunan 'Molgentek' firmasına gönderilmiştir.

Sekanslama işlemi tamamlanan tüm örneklerin baz dizilimleri 'Finch TV' programı kullanılarak görüntülenip, mevcut baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında 'BLAST' yöntemiyle kayıtlı benzer organizmalar ile karşılaştırılmıştır.

Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri 'Mega X' (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak 'Likelihood Tree' metodu ile sınıflandırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Çöküntü Hastalığı ile Bulaşık Bahçelere Ait Arazi Gözlemleri

Mersin ili, Erdemli ilçesi 95.130 da limon dikili alanların %1'i sörvey alanı olarak seçilmiştir. Sörvey alanlarının tamamı W şeklinde çaprazlama örnekleme yöntemi ile gezilmiştir. Sörvey çalışmasında bölgede yaygın olarak yetişen Kütdiken limon çeşidi dışında İtalyan Memeli, Aydın, Mayer ve Enterdonato limon çeşitlerini içeren bahçelerde gezilmiştir. Mersin ilinin Erdemli ilçesindeki limon bahçelerinde 10 yaşından büyük limon bahçelerinde sonbahar döneminde yapılan sörveylerde Çöküntü hastalığının karakteristik özelliği olan meyve üzerinde çöküntü belirtileri (Şekil 4.1.) gözlenmiştir. Gözlenen bu çöküntü belirtileri meyve küçük olduğunda küçük boyutlarda meyve büyüdükçe çöküntü alanlarının da büyüdüğü gözlenmiştir. Ayrıca başlangıçta küçük boyuttaki çöküntülerin zaman içinde birleşerek daha büyük alanlar oluşturduğu gözlenmiştir. Oluşan çöküntüler başlangıçta koyu yeşil (Şekil 4.2.) renkte olup daha sonra Eylül Ekim aylarında üretim mevsimi sonuna doğru çöküntülerin limon üzerinde daha belirgin hale geldiği ve renginin kahverengine döndüğü gözlenmiştir. Bazı Kütdiken limon ağaçlarında çöküntülerin siyah renkli olduğu da gözlenmiştir (Şekil 4.3.)

Çöküntü belirtileri en yoğun Kütdiken limon çeşidinde gözlenmiştir. Ancak bunun dışında bölgede yetiştiriciliği yapılan Euroka ve Aydın limon çeşitlerinde de çöküntü belirtileri gözlenmiştir. Bu limon çeşitlerinde de gözlenen çöküntü belirtileri Kütdiken çeşidinde gözlenen belirtilere benzer olduğu (Şekil 4.4.) çeşit bazında çöküntü şeklinde ve derecesinde farklılık bulunmadığı görülmüştür.



Şekil 4.1. Meyve üzerindeki çöküntü belirtilerleri (İtalyan mandalinası)



Şekil 4.2. Oluşan çöküntünün başlangıçtaki koyu yeşil rengi (Kütdiken)



Şekil 4.3. Hastalığın son döneminde çöküntü bölgesinin siyahlaşması ve hastalıklı bölgenin meyvenin zayıf noktası haline gelmesi.



A. Aydın limon çeşidi

B. Kütdiken limon çeşidi

Şekil 4.4. Çeşit bazında çöküntü şeklinde ve derecesinde farklılık bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 4.5. Erdemli ilçesinde Rumble hastalığının çöküntü simptomunu gösteren Kütdiken limon meyvesi başlangıç simptomsu.



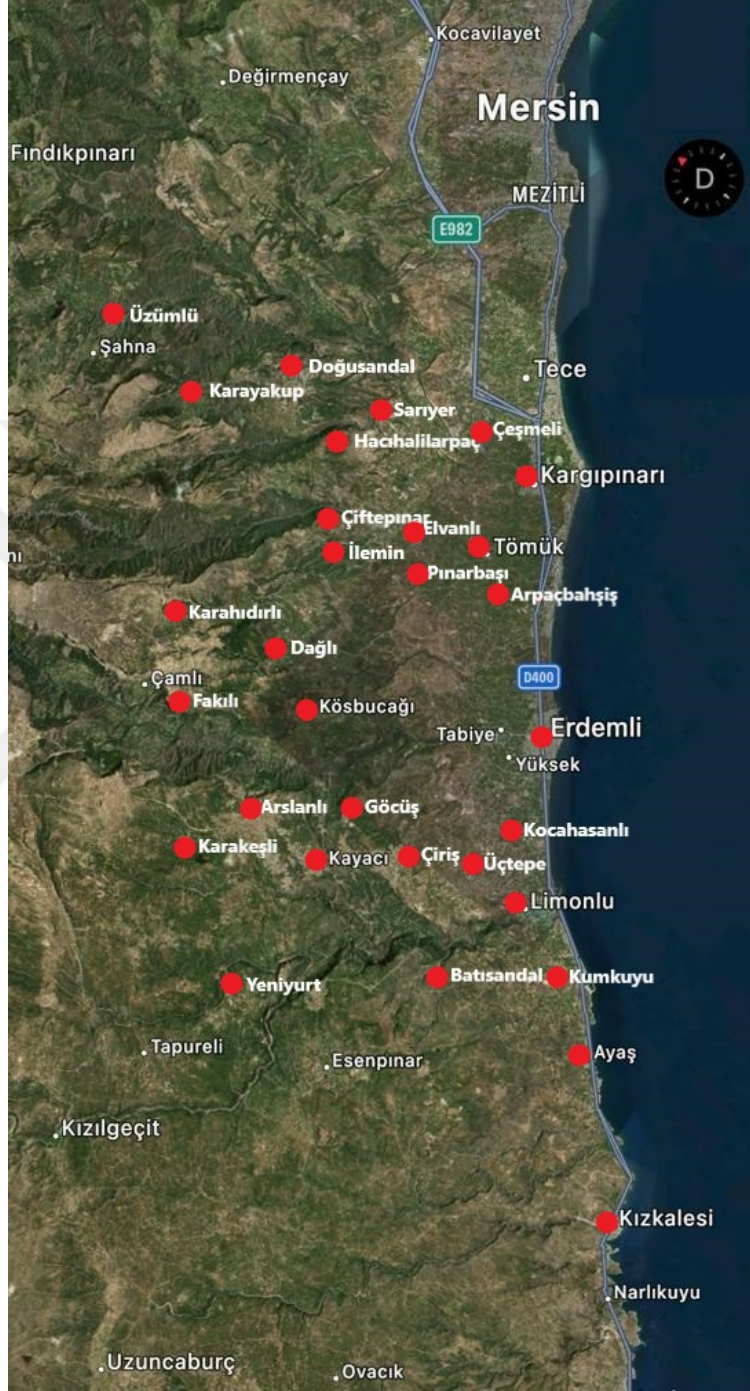
Şekil 4.6. Sörvey çalışmaları sonucunda Erdemli ilçesinde çöküntü hastalığının şiddetli simptomunu gösteren Kütdiken limon meyvesi.

4.2.Çöküntü Hastalığının Sörvey Çalışmaları ile Yaygınlığının Erdemli İlçesinde Belirlenmesi

Rumple hastalığının yaygınlığı belirlemek amacıyla limon bahçelerinde yapılan sörvey çalışmasında Erdemli ilçesindeki limon bahçeleri 5 ile 150 dekar alan büyüklüğünde olup dekar başına ortalama 40 ağaç bulunmaktadır. Erdemli ilçe tarım müdürlüğünden alınan verilere göre 95180 da limon dikili alan olduğu bildirilmiştir. Limon dikili alanların çeşit bazında dağılımının %82.5'i Kütdiken, %9 Aydın, %4'ünü Enterdonat, %3'ünü Mayer ve %1.5'inin İtalyan Memeli limon çeşidi olduğu belirtilmiştir. Kütdiken limon çeşidinin dikim alanı diğer limon çeşitlerinden fazladır. Aydın limon çeşidinin Kütdiken limon çeşidi ile birlikte dikildiği bölge çiftçileri tarafından bildirilmiştir. Bölgede az sayıda bulunan çeşitlerden Mayer yeni kurulan bahçelerde; İtalyan Memeli ise eski kurulan bahçelerde rastlanmıştır. Çizelge 4.1.'de Erdemli ilçesi limon bahçeleri dekarları mahalle bazında verilmiştir.

Mersin'in Erdemli ilçesinde yapılan sörvey çalışmasında 95.180 da limon dikili alanın 1031 da alan W şeklinde çaprazlama örnekleme yöntemi ile gezilmiş ve limonlar hastalığının makroskobik simptomları açısından sonbahar aylarında incelenmiştir.

Erdemli ilçesi limon yetiştiricilik alanı 32 mahallede bulunmaktadır (Çizelge 4.1). Erdemli ilçesinde mahalle bazında yaklaşık 36.683 limon ağacı çöküntü hastalığı açısından gözlemlenmiştir. 10.672 ağaçta hastalığın makroskobik simptomları gözlenerek bulaşık olduğu ve bulaşıklık oranının %29 olduğu bulunmuştur(Şekil 4.7). Hastalıkla bulaşıklık oranı %32,82 ile en fazla Kargıpınarı mahallesinde, en düşük ise %16,34 oran ile Çiriş mahallesinde gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Erdemli ilçesi gezilen sörvey alanları

Çizelge 4.1.Erdemli İlçesi Mahalleleri çöküntü hastalığı bulaşıklık çizelgesi

Mahalle	Limon Dekar	Gezilen Limon Dekar	Gezilen Limon Ağaç Sayısı	Bulaşık Limon Ağaç Sayısı	Bulaşıklık Yüzdeliği
Arpaçbahşiş	9500	176	6200	1984	%32.00
Arslanlı	20	-	-	-	-
Ayaş	4500	88	3080	985	%31.98
Batısandal	800	12	480	88	%18.33
Çeşmeli	9500	66	2350	724	%30.80
Çiftçınar	4000	52	1825	576	%31.56
Çiriş	200	6	257	42	%16.34
Dağlı	1610	14	520	160	%30.77
Doğusandal	420	16	586	166	%28.32
Elvanlı	7200	92	3225	997	%30.91
Fakılı	10	-	-	-	-
Gücüş	200	-	-	-	-
İlemin	50	-	-	-	-
Hacıhalıarpaç	3500	34	1150	320	%27.82
Karahıdırlı	1730	8	290	77	%26.55
Karakeşli	400	-	-	-	-
Karayakup	50	-	-	-	-
Kargıpınarı	6000	66	2510	824	%32.82
Kayacı	350	-	-	-	-
Kızıkalesi	330	-	-	-	-
Kocahasanlı	3500	21	780	234	%30.00
Kösbucağı	2000	8	320	82	%25.62
Kumkuyu	5500	30	1120	224	%20.00
Limonlu	2100	6	250	47	%18.80
Merkez	10490	124	4400	1126	%25.59
Pınarbaşı	2000	11	420	112	%26.66
Sarıyer	2000	-	-	-	-
Tömük	14000	188	6460	1812	%28.05
Üçtepe	2500	13	460	92	%20.00
Üzümlü	100	-	-	-	-
Yeniyurt	170	-	-	-	-
Toplam	95180	1031	36683	10672	%29.09

Çalışmada sörvey yapılan limon ağaçlarının 30.263'ü Kütdiken, 3.302'si Aydın, 1467'si Enterdonat, 1101 tanesi Mayer ve 550 tanesi İtalyan Memeli'dir. Bölgede Kütdiken limon çeşidi birinci sırada yer almaktadır. Toplam 30.263 Kütdiken ağacı incelenmiş; 9.836 ağaç bulaşık olarak tespit edilmiş ve bulaşıklık oranının %32.5 olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra %18'lik bulaşıklık oranı Aydın'da, %13 Enterdonat'da, %9 İtalyan Memeli'de (Çizelge 4.2.) bulunmuştur. Bulaşıklık oranı sıralaması en yüksekten en düşüğe Kütdiken, Aydın, Enterdonat, İtalyan Memeli ve Mayer şeklindedir. Euroka limon çeşidi 2 bahçede 100 ağaca yakın gezildiği için çizelgeye eklenmemiştir.

Çizelge 4.2. Mersin Erdemli İlçesi limon çeşidi bazında çöküntü hastalığı bulaşıklık oranları

Limon Çeşidi	Sörvey Yapılan Limon Ağacı Sayısı	Bulaşık Limon Ağacı Sayısı	Bulaşık Ağaç Sayısının Çeşit Bazında Enfeksiyon Oranları
Aydın	3302	595	%18
Enterdonat	1467	191	%13
İtalyan Memeli	550	50	%9
Kütdiken	30263	9836	%32.5
Mayer	1101	0	%0
Toplam	36683	10672	%29.09

Çöküntü, farklı ülkelerde farklı isimlerle anılır. İlk tanımlandığı Florida'da Rurple (Knorr, 1958), İtalya'da "kabuk buruşması" (Salerno, 1965), "Wrinkle-rind" (kırışik kabuk) (Russo ve Klotz, 1963) ve Türkiye'de "Çöküntü, Benek ve Çopur" (Özbek ve ark., 1974) olarak isimlendirilmiştir.

Bu çalışmada incelenen ağaçların çöküntü hastalığı ile bulaşık olduğunun belirlenmesinde hastalığın belirtileri olan çöküntüler ve benekler baz alınarak değerlendirmeler yapılmıştır.

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Mersin ili Erdemli ilçesinde toplamda 1.031 dekar arazi gezilmiş 36.683 ağaç incelenmiştir. 10.672 ağacın çöküntü belirtisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Rumble hastalığının karakteristik özelliği olan çöküntü belirtisinin Sicilyada uzun zamandır var olduğu ve bu hastalık üzerine çalışmaların gerçekleştirildiği Salerno tarafından bildirilmiştir. Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise Akdeniz bölgesinde Mersin, Adana, Hatay ve Antalya illerinde yaygın bir şekilde görüldüğü bildirilmiştir (Chapot ve Bahçecioğlu, 1969)

Yapılan farklı çalışmalarda Rumble hastalığının her yıl farklı oranda olmak ile birlikte Florida’da %77 Türkiye’de ise %75’e kadar olan oranda şiddetli zararlar gösterdiği belirlenmiştir (Knorr ve Koo 1969; Chapot ve Bahçecioğlu, 1969).

Çöküntü hastalığı belirtisi gösteren meyveler ağaçların güneş gören dış kısımlarında yer alan dallarda daha fazla gözlenmiştir. Araştırmacılar yapmış olduğu çalışmalarda çöküntü hastalığının belirtileri İtalya’da “Raggrinzimento della buccia” (Salerno, 1965) “Wrinkle-rind”(kırıkkabuk) (Russo ve Klotz, 1963) şeklinde isimlendirilmiştir. Bu belirtiler bu çalışmada gözlenen belirtilere benzerdir. Ayrıca ülkemizde 1974 yılında yapılan çalışmalarda da benzer belirtiler gözlemlendiği bildirilmiş ancak belirtilerin her yıl gözlenmediği bazı yıllarda belirtilerin yoğun olduğu bunu takip eden yılda ise çok az belirtilerin görülebildiği bildirilmiştir.

Özbek ve arkadaşlarının 1977 yılında yapmış olduğu çalışmalarda çöküntü belirtilerinin toprakta bulunan mangan ve çinko elementi noksanlığı nedeniyle gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar topraktaki bu elementin normal seviyede olduğu ağaçlarda da benzer durumun gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

4.3.Çöküntü Hastalığının Gözleendiği Ağaçlarda Turunçgil Viroid Hastalıklarının Biyolojik İndeksleme Yöntemi ile Belirlenmesi

Mersin ili Erdemli ilçesi limon bahçelerinden çöküntü hastalığının karakteristik simptomlarından meyvelerde çöküntü symptomu gösteren ağaçlardan alınan sürgün ve yaprak örnekleri her bir örnek için 3 adet olacak şekilde tohumdan yetiştirilen sağlıklı Etrog citron fidanlarının gövdesi yaralanarak bitki öz suyu mekanik olarak inokule edilmiştir. Etrog citron fidanlarından üçer adet bitki negatif kontrol ve üçer adet bitki ise pozitif kontrol olarak bırakılmıştır. Etrog citronların tohumdan yetiştirilmesi Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. .Etrog citron tohumdan yetiştirilmesi

İnokulasyonlar gerçekleştirildikten sonra bitkiler haftalık olacak şekilde yaprak simptomları açısından gözlemlenmiştir. 2 ay sonra geriye doğru budama yapılmış ve yeni sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır daha sonra inokulasyon gerçekleştirilen bitkilerde symptom gözlemleri başlamıştır. Turunçgillerde bulunan CEVd için karakteristik olan orta damar nekrozu ve epinasti simptomları etrog citron yapraklarında Rumple2, Rumple4, Rumple6, Rumple8, Rumple10

izolatlarında gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Gözlenen bu semptomların CEVd'nin karakteristik semptomları olduğu pek çok araştırmacı tarafından (Roistacher, 1991; Semancik, 1978; Önelge, 1997) bildirilmiştir. Ayrıca ülkemizde yapılan çalışmalarda (Hızal ve Güral, 1987; Güllü, 1989; Önelge, 1994) CEVd için etrog citron yapraklarında orta damar nekrozu ve epinasti semptomlarının karakteristik olduğunu bildirmişlerdir. Negatif kontrol olarak bırakılan sağlıklı fidanlarda semptomlar görülmemiştir. Yürütülen inokulasyon çalışmalarında etrog citron indikatör bitkilerinde gelişen semptomlar Şekil 4.8'de verilmiştir. Etrog citronda gözlenen en belirgin semptomlar yaprakların içe doğru kıvrılması ve yaprak deformasyonlarını içeren epinasti semptomudur. Ayrıca CEVd'nin geliştirdiği şiddetli damar nekrozları da indikatör bitkilerde gözlenmiştir. CCaVd etrog citron bitkilerinde genellikle semptom geliştirmemekte hafif olarak bazen yaprak uçlarında nekrozlar gözlenebilmektedir (Reichert ve Bental, 1957). Bu çalışmada etrog fidanlarının yapraklarında nekrozlar yanında yaprak epinastilerinin de geliştiği gözlenmiştir. CCaVd için gelişen bu karışık semptomlar izolat olarak belirlenen ağaçlarda viroidlerin karışım halinde bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca viroid etmenlerinin moleküler bazda belirlenmesi amacıyla yürütülen RT-PCR çalışmalarında seçilen 10 izolatın 7 tanesinin viroidlerle enfekteli olduğu ve 5 izolatın CEVd ve CCaVd ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Etrog citron fidanlarında gerçekleştirilen biyolojik indeksleme çalışmaları ve yapraklarda epinasti ve nekroz gelişimleri

Çöküntü hastalığının gözlendiği ağaçlarda viroidlerin belirlenmesi için farklı limon ağaçlarından alınan örnekler etrog citron bitkisi üzerine inokulasyonu sonucu gösterdiği belirtiler Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Kösbucağı mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Kütdiken limon çeşidine ait Ruple1 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde semptomsuz olup

RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından pozitif bulunmuştur. Yine aynı mahallede Kütdiken limon çeşidine ait Rurple2 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde simptom göstermiş olup RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından pozitif bulunmuştur. Merkez mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Kütdiken limon çeşidine ait Rurple3 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde yaprak kıvrıcıklığı simptomu gözlenmiş olup CEVd ve CCaVd bakımından pozitif bulunmuştur. Merkez mahallesinde bulunan bir başka bahçeden alınan Kütdiken limon çeşidine ait Rurple4 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde orta damar nekrozu simptomunu göstermiş olup RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından negatif bulunmuştur. Tömük mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Aydın limon çeşidine ait Rurple5 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde yaprak kıvrıcıklığı simptomu gözlenmiş olup CEVd ve CCaVd bakımından pozitif bulunmuştur. Arpaçbahşiş mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Aydın limon çeşidine ait Rurple6 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde simptomlar gözlenmiş olup RT-PCR sonuçları CEVd bakımından pozitif ve CCaVd negatif bulunmuştur. Kargıpınar mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Kütdiken limon çeşidine ait Rurple7 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde yaprak kıvrıcıklığı simptomu gözlenmiş olup RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından negatif bulunmuştur. Çeşmeli mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Kütdiken limon çeşidine ait Rurple8 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde orta damar nekrozu simptomunu göstermiş olup RT-PCR sonuçları CEVd bakımından negatif ve CCaVd pozitif bulunmuştur. Ayaş mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Euroka limon çeşidine ait Rurple9 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde orta damar nekrozu simptomunu göstermiş olup RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından negatif bulunmuştur. Elvanlı mahallesinde bulunan bir bahçeden alınan Euroka limon çeşidine ait Rurple10 adlı örnek etrog citron indikatör bitkisinde yaprak kıvrıcıklığı simptomu gözlenmiş olup RT-PCR sonuçları CEVd ve CCaVd bakımından pozitif bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Çöküntü hastalığının gözlemlendiği ağaçlarda viroidlerin belirlenmesi için farklı limon ağaçlarından alınan örnekler etrog citron bitkisi üzerine inokulasyonu sonucu gösterdiği simptomlar

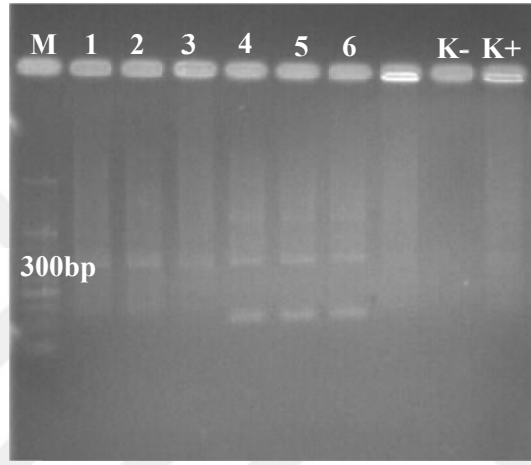
İzolatlar	İndikatör bitki	İndekslemeye alınan limon bitki çeşitleri	Alınan yerler	Simptomsuz	Simptomlu (yaprak kıvrıcıklığı)	Simptomlu (orta damar nekrozu)	RT-PCR SONUÇLARI	
							CEVd	CCaVd
Rumple1	Etrog C.	Kütdiken	Kösbucağı	+	-	-	+	+
Rumple2	Etrog C.	Kütdiken	Kösbucağı	-	+	+	+	+
Rumple3	Etrog C.	Kütdiken	Merkez	-	+	-	+	+
Rumple4	Etrog C.	Kütdiken	Merkez	-	-	+	-	-
Rumple5	Etrog C.	Aydın	Tömük	-	+	-	+	+
Rumple6	Etrog C.	Aydın	Arpaçbahşiş	-	+	+	+	-
Rumple7	Etrog C.	Kütdiken	Kargıpınar	-	+	-	-	-
Rumple8	Etrog C.	Kütdiken	Çeşmeli	-	-	+	-	+
Rumple9	Etrog C.	Euroka	Ayaş	-	-	+	-	-
Rumple10	Etrog C.	Euroka	Elvanlı	-	+	-	+	+

4.4.Moleküler Çalışmalar ile İlgili Bulgular ve Tartışma**4.4.1.RT-PCR Çalışmaları ile İlgili Bulgular**

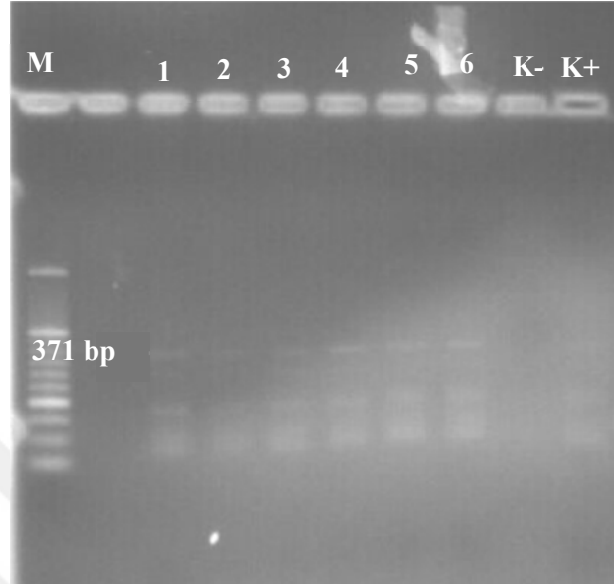
Mersin ili Erdemli ilçesi limon bahçelerinden çöküntü hastalığının karakteristik simptomlarından meyvelerde çöküntü simptomu gösteren ağaçlardan alınan sürgün ve yaprak örneklerinde turunçgil viroid hastalıklarından CEVd ve CCaVd varlığının belirlenmesi ve moleküler olarak tanılanması için RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. CEVd hastalığının varlığının belirlenmesi için gerçekleştirilen RT-PCR çalışmasında araziden toplanan 10 farklı limon ağacından alınan izolatlar kullanılmıştır. Alınan örneklerin 6 adedi Kütdiken limon 2 adet Aydın ve 2 adet Euruko limon çeşidinden oluşmaktadır (Çizelge 4.3). Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda 10 örnekten 6 tanesinin 371 bp seviyesinde bant oluşturduğu belirlenmiştir. Şekil.4.10. da %1.5'luk agar jelde oluşan CEVd ile bulaşık örneklerin 371 bp seviyesindeki bant oluşumu gösterilmiştir. Çöküntü hastalığı gösteren limon ağaçlarından alınan örneklerden Rumble1, Rumble2, Rumble3, Rumble5, Rumble6, Rumble10 izolatlarıdır. CCaVd hastalığının varlığının belirlenmesi için gerçekleştirilen RT-PCR çalışmasında ise 300 bp seviyesinde bant oluşturduğu belirlenmiştir. %1.5'luk agar jelde oluşan 300 bp seviyesindeki bant oluşumu Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Çöküntü hastalığı gösteren ve CCaVd ile enfekteli olan izolatlar Rumble1, Rumble2, Rumble3, Rumble5, Rumble8, Rumble10'dur.

Elde edilen bulgular CEVd ve CCaVd için daha önce yapılan çalışmalarla uygun baz seviyesindedir. RT-PCR çalışmalarında viroid hastalıklarının birlikte aynı ağaç içinde karışım halinde bulunduğu belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan pek çok çalışmada viroidlerin turunçgil ağaçlarında bir karışım halinde bulunduğu belirtilmiştir (Önelge, 2007). Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar belirtilmekte ve sertifikasyon çalışmalarının yapılmadığı veya sağlıklı aşı gözünün yoğun olarak kullanılmadığı ülkelerde turunçgil viroidlerinin oldukça yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir (Hadidi vd.2003; Randles, 2003). Ülkemizde yürütülen çalışmalarda turunçgil ağaçlarının turunçgil viroidleri

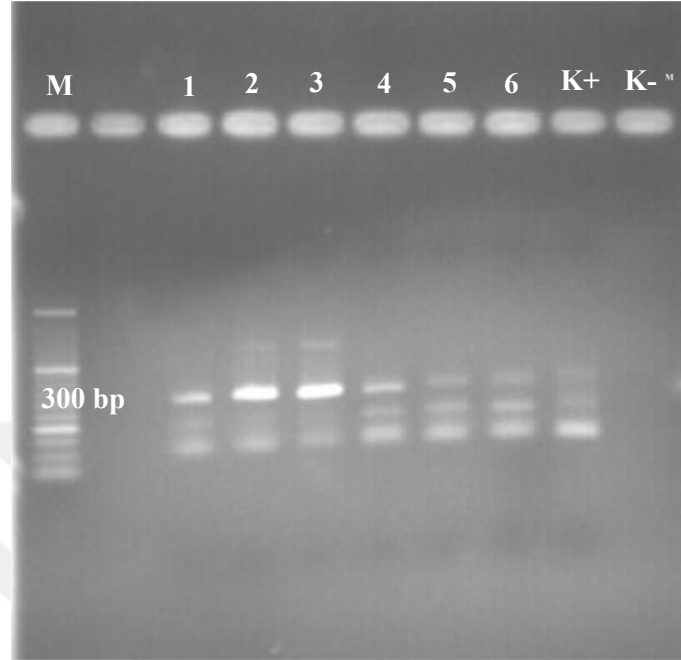
bakımından oldukça yoğun bulaşık olduğu bildirilmektedir. Bunun nedenlerinden bir tanesi ve en önemlisi viroid etmenlerinin mekanik olarak çok kolay biçimde taşınmasıdır. Zira özellikle her yıl budamanın yapıldığı limon bahçelerinde özellikle obur sürgün alımında ve hasatta sodyum hipokloritin kullanılmadığı sürvey sırasında yapılan gözlemlerde belirlenmiştir.



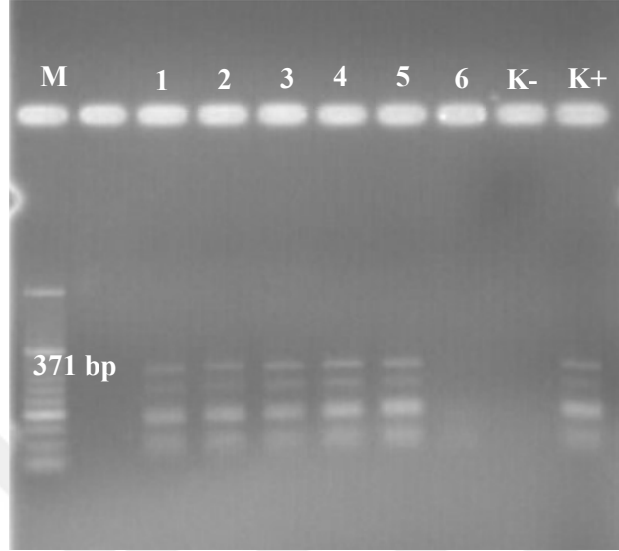
Şekil 4.10. Yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5'luk agar jeldeki görüntüsü. (CCaVd 300 nt bant seviyesi) 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump2: rump:3), 4: Aydın (rump:5), 5-6: Euroka (rump:8,rump:10) çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol



Şekil 4.11. Yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1.5'luk agar jeldeki görüntüsü. CEVd'nin 371 nt bant seviyesi) 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump:2 rump:3), 4-5:Aydın (rump:5,rump6), 6: Euroka(rump:10), çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol



Şekil 4.12. Yapılan RT-PCR sonucunda sekansa gönderilecek (CCaVd) örneklerin çoğaltılması 1-2-3: Kütdiken (rump:1, rump:2, rump:3), 4:Aydın(rump:5), 5-6: Euroka (rump:8,rump:10) çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol



Şekil 4.13. Yapılan RT-PCR sonucunda sekansa gönderilecek (CEVd) örneklerin çoğaltılması 1-2-3:Kütdiken (rump:1, rump:2, rump:3), 4-5:Aydın(rump:5,rump6), 6: Euroka(rump:10), çeşitlerinden alınan limon örnekleri, K+:Pozitif Kontrol, K-:Negatif Kontrol

4.4.2.Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular

RT-PCR çalışması gerçekleştirilerek pozitif olarak belirlenen izolatlardan Rumple-8 ve Rumple-2 izolatu için 200 µl hacminde çoğaltma işlemi yapılmış ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana İlinde bulunan Molgentek firmasına gönderilmiştir. Bu firmadan alınan nükleotid dizilimleri fasta formatında aşağıda verilmektedir.

Rump-8 İzolatı CCaVd

> Rump-8

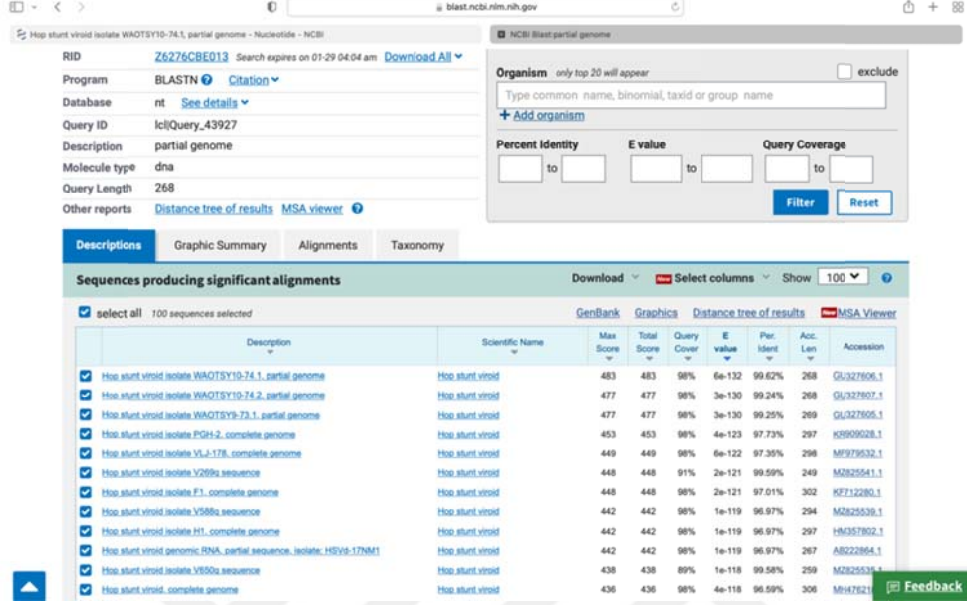
TCAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAG
AGGCTCTGCCTTCGAAACACCTTCGATCGTCCCTTCTTCTTTACCTTCTT
CTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTTCGTC
CCAACCTGCTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAG
CCCCTCTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCATGCAAAGAAAAA
AATTGGCAGGGAGGTACTTAGG

Rump-2 İzolatı CEVd

>Rump-2

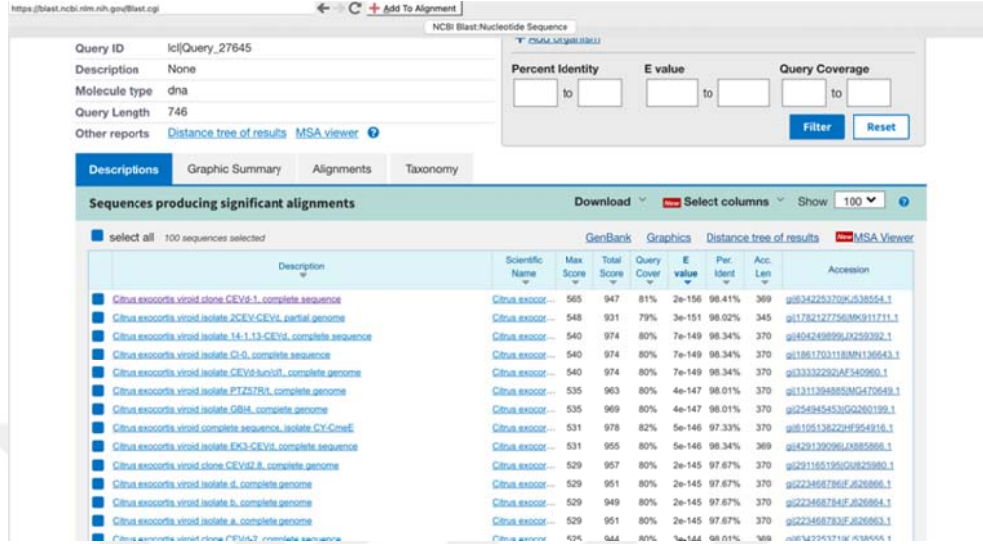
GGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTGCGGGGGGAGCAACTGCCTCGGTTCGC
CGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGACTCCTTCCT
TTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCCTGCGCGCCCCCTC
GCCCCGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACTGAAGCTTC
AACCCCGTACCGCTTTTCTTGATCTCTACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGA
AAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAGGTTTC
CTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAAAAGAGGCGG
GGGGGAAGAAGTCCAACAGGGATCCCCGG

Görüntülenen baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak bu bankada kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Firmadan alınan sekans sonuçları NCBI gen bankasında bulunan kayıtlar ile karşılaştırılmasının sonucunda alınan ekran görüntüleri Şekil 4.13; 4.14;’de verilmiştir. NCBI ile gerçekleştirilen blast analizi sonucunda nükleotid dizilimi elde edilen ve farklı limon izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile %90 - %99 oranında benzerlik oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Blast analizi sonucunda Rumple-8 izolatının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları

CCaVd incelediğimizde çalışmanın RT-PCR sonucu pozitif bulunan 6 izolattan 1 tanesi sekansa gönderilmiş ve yukarıda belirtilen sekans sonuçları elde edilmiştir. Bu izolatlardan Rumple-8 BLAST analizi sonucunda NCBI verilerinde yer alan CCaVd izolatları ile %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13).

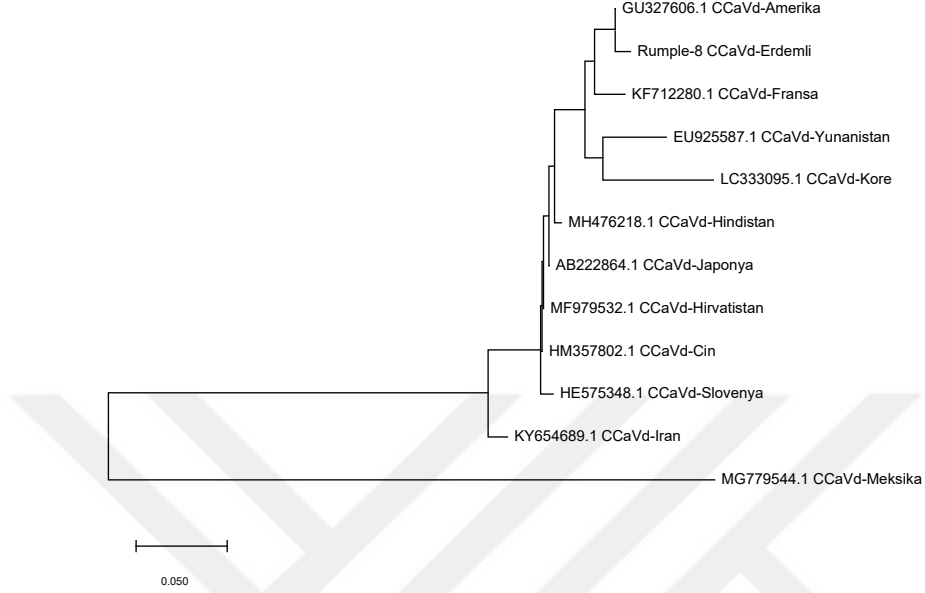


Şekil 4. 15. Blast analizi sonucunda Rumple-2 izolatının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları

CEVd viroidinin moleküler tanısı amacıyla Rumple-2 izolatı sekansa gönderilmiş ve yukarıda belirtilen sekans sonuçları elde edilmiştir. Rumple-2 izolatının BLAST analizi sonucunda NCBI verilerinde yer alan CEVd izolatları ile %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14)

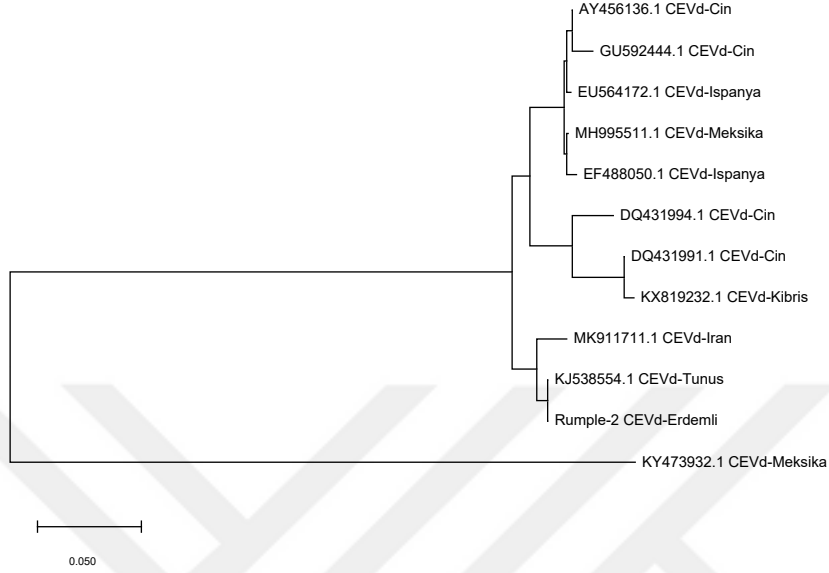
Sekans sonuçlarını NCBI gen bankası ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar her iki viroid içinde %90-98 oranında daha önce gen bankasına kayıtlı izolatlarla benzer olduğu belirlenmiştir. Her iki viroidin de dünyada oldukça yaygın olduğunu düşündüğümüzde elde edilen sonuçlar diğer ülkelerde ve ülkemizde kayıtlı izolatlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Filogenetik analiz çalışması için ise baz dizileri Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak “Neighbour joining” metodu ile sınıflandırılmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçların görüntüleri Şekil 4.15.; Şekil 4.16.’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Rumple-8 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacı görüntüsü

Elde edilen sekans sonuçlarına göre Rumple-8 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacında Amerika izolatı ile %98 benzerlik gösterirken Fransa izolatı ile de aynı cluster'da yer aldığı ve %96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Rumple-2 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacı görüntüsü

Elde edilen sekans sonuçlarına göre Rumple-2 izolatının Neighbor-joining (NJ) analiz yöntemi kullanılarak elde edilen soy ağacında Tunus izolatı ile %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca İran izolatı ile aynı cluster'da yer aldığı ve %92 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Nükleotid dizi analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı limon ağaçlarından CCaVd ve CEVd izolatları elde edilmiştir. Bu viroid etmenleri mekanik olarak makas ve bıçaklarla kolayca taşınabilen her iki etmen açısından benzerlik göstermektedir. Mersin ilinin Erdemli ilçesinde yoğun olarak limon yetiştiriciliği yapılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda CCaVd ve CEVd viroidleri turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgemizde pek çok yerde saptanmıştır (Önelge, 2007). Çöküntü gözlenen ağaçlarda viroid etmenlerinin varlığı ve nükleotid dizilimleri arasındaki benzerlikler bu çalışmada ele alınmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri bölge açısından yeni bulgulardır ancak nükleotid dizilimleri Çöküntü semptomu göstermeyen diğer turunçgil çeşitleri ile yakın

benzer olduğu belirlenmiştir. Rumble hastalığının abiyotik bir hastalık olduğu konusunda pek çok literatür vardır (Knorr,1963; Knorr ve Koo,1963; Özbek vd., 1976). Ancak etmenin virüs olabileceğini ve aşıgözü ile taşınabilir bir hastalık olduğu da İtalyan araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Majonara ve Continella,1982). Hastalık özellikle Akdeniz bölgesinde ve limon üretiminin gerçekleştirildiği Erdemli ilçesinde yaygın olarak görülmektedir. Patojenlerin tanısında son yıllarda yeni ve detaylı tanılama yöntemleri gelişmiştir. Özellikle yeni nesil sekanslama (NGS) bunlardan biridir. Bu çalışma sonucunda elde edilen izolatların yeni nesil sekanslama ile incelenmesi hastalık konusunda daha detaylı bilgiler vereceği düşünülmektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışma ile Mersin ili Erdemli ilçesindeki limon yetiştiricilik alanlarında Çöküntü hastalığının yaygınlığının araştırılması ve çöküntü gözlenen ağaçlarda viroid etmenlerinin tanınması yapılmıştır.

1. Mersin ilinin Erdemli ilçesindeki limon bahçelerinde 10 yaşından büyük limon bahçelerinde sonbahar döneminde yapılan sörveylerde Çöküntü hastalığının karakteristik özelliği olan meyve üzerinde çöküntü belirtileri gözlenmiştir.
2. Oluşan çöküntüler başlangıçta koyu yeşil renkte olup daha sonra Eylül Ekim aylarında üretim mevsimi sonuna doğru çöküntülerin limon üzerinde daha belirgin hale geldiği ve renginin kahverengine döndüğü gözlenmiştir. Bazı Kütdiken limon ağaçlarında çöküntülerin siyah renkli olduğu da gözlenmiştir.
3. Çöküntü belirtileri en yoğun Kütdiken limon çeşidinde gözlenmiştir. Ancak bunun dışında bölgede yetiştiriciliği yapılan euroka ve aydın limon çeşitlerinde de çöküntü belirtileri gözlenmiştir. Bu limon çeşitlerinde de gözlenen çöküntü belirtileri Kütdiken çeşidinde gözlenen belirtilere benzer olduğu çeşit bazında çöküntü şeklinde ve derecesinde farklılık bulunmadığı görülmüştür.
4. Çöküntü hastalığı belirtisi gösteren meyveler ağaçların dış kısımlarında yer alan dallarda daha fazla gözlenmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Mersin ili Erdemli ilçesinde toplamda 1031 dekar arazi gezilmiş 36683 ağaç incelenmiştir. 10672 ağacın çöküntü belirtisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda çöküntü hastalığının Erdemli ilçesi limon yetiştiricilik alanlarında toplam enfeksiyon oranı %29 olarak saptanmıştır.

5. PCR çalışmalarında CEVd hastalığının araştırılması için CEVd-1F ve CEVd-2R primer çifti kullanılmıştır. Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda 10 örnekten 6 tanesinin 371 nt seviyesinde bant oluşturduğu belirlenmiştir. CEVd etmeni Rump1, Rump2, Rump3, Rump5, Rump6 ve Rump10 izolatlarında pozitif olarak saptanmıştır.
6. CCaVd hastalığının varlığının belirlenmesi için yürütülen RT-PCR çalışmasında 300 nt seviyesinde 6 örnekte bant gelişimi gözlenmiş ve Rump 1, Rump2, Rump3, Rump5, Rump8 ve Rump10 izolatlarının CCaVd ile enfekteli olduğu belirlenmiştir.
7. Etrog citron üzerinde gerçekleştirilen mekanik inokulasyon sonrasında etrog yapraklarında epinasti ve yaprak damarlarında nekrozlar gözlenen başlıca belirtiler olmuştur.

5.2.Öneriler

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda yapılacak öneriler aşağıda yer almaktadır.

Çöküntü hastalığı özellikle Akdeniz bölgesi limon yetiştiricilik alanlarında önemli zararlar oluşturmakta ve meyvenin pazarlanamayacak duruma gelmesine neden olan bir abiyotik hastalıktır. Bu durum da ekonomik açıdan ihracatta üreticileri olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Erdemli ilçesi Doğu Akdeniz bölgesinde en fazla limon üretim alanlarına sahip bir ilçemizdir. Bu ilçemizde gerçekleştirilen sörvey sonucunda %29 oranında hastalığın yaygın olarak bulunması oldukça önemli bir rakamdır.

Hastalığın abiyotik bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Ancak hastalıkla ilgili kesin bir tanı olmamakla birlikte, detaylı araştırmalar da yürütülmüş değildir. Ekonomik olarak önemli kayıpların geliştiği bölgemizde Rump ağaçların yoğun olarak viroidlerle de enfekteli olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle hastalıklara karşı testlenmiş fidan kullanımı budama ve hasatta mekanik taşınmaların sodyum

hipoklorit kullanımı ile azaltılması daha verimli bahçeler elde edilmesinde ve daha kaliteli meyve eldesinde önemlidir.

Rumple hastalığının abiyotik bir hastalık olarak düşüncecek olursak özellikle budama ve bahçe düzeni kurulurken rüzgar yönünün belirlenmesi ve bahçe neminin uzaklaştırılması için gerekli önlemlerin alınması ekonomik açıdan kayıpların önlenmesinde etkin olacağı düşünülmektedir.





KAYNAKLAR

- Anonim, 2011. Mersin Tarım Master Planı, Turunçgil Üretimi ve Pazarlaması SWOT Analizi, s. 235, Mersin Valiliği, İl Tarım Müdürlüğü, Maestro Danışmanlık A.Ş., Mersin, s.441.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R., Bar-Joseph, M., 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. Nucleic Acids Research, 19(17), s.4767.
- Azeri, T., Heper, E., 1973. Ege Bölgesi satsuma mandarinlerindeki virüs hastalıklarının tanımı, yayılımı ve ekonomik önemi üzeri araştırmalar. TUBITAK IV. Bilim Kongresi, 5-8.
- Benton, R.J., Bowman, F.T., Fraser, L., Kebby, R. G., 1949. Selection of citrus budwood to control scalybutt in trifoliata rootstock. Agricultural Gazette 60:31-34.
- Benton, R.J., Bowman, F.T., Fraser, L., Kebby, R. G., 1950. Stunting and scalybutt associated with Poncirus trifoliata rootstock. Agricultural Gazette 70:1-20.
- Bora, T., Karaca, İ., 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, s. 167.
- Calavan, E.C., Christianson, D.W., 1961. Stunting and chlorosis induced in young-line citrus plants by inoculations from navel orange trees having symptoms of stubborn disease. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 2, No. 2).
- Calavan, E.C., Christianson, D.W., 1965. Variability of cachexia reactions among varieties of rootstocks and within clonal propagations of citrus. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 3, No. 3).

- Chapot, H., Bahçecioğlu, H., 1969. Some lemon culture troubles in Turkey, 10.1279-83. Proc. First Intern. Citrus Symposium, Univ.California, Riverside.
- Chapot, H., 1971. The occurrence in Ethiopia of rumple in grapefruit, Citrus Industry 52 (6):22.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S., Sas, G., 1993. Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. In: P. Moreno, J. V. da Graca and L. W. Timmer, (eds.), Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside, CA, USA, s.397-400.
- Çakır, İ., Kara, H., Kafa, G., Tekin, H.İ., 2002. Ruple (Çöküntü) Raporu, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Erdemli, (Yayınlanmamış).
- Duran-Vila, N., Cambra, M., Pina, J.A., Ballester, J.F., Navarro, L., 1988. Virus content and growth patterns of callus cultured in vitro from healthy and virusinfected citrus species. In: Timmer LW, Gamsey SM, Navarro L. eds. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside: IOCV, s.310-21.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballester, J.F., Juarez J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., Semancik, J.S., 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. In: Timmer LW, Gamsey SM, Navarro L, eds. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus virologists Riverside IOCV, s.152-64.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., Semancik, J.S., 1988. A determination of citrus viroid Biological diversity of CRSV isolates 357 groups and their relationship to the exocortis disease. Journal of General Virology 69: 3069-80.
- Duran-Vila, N., Semancik, J. S., 2003. Citrus viroids, Viroids. s.178-194.
- FAO, 2019. <http://www.fao.org/statistics>

- Gillings, M. R., Broadbent, P., & Gollnow, B. I. (1991). Viroids in Australian citrus: relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Functional Plant Biology*, 18(5), 559-570.
- Güllü, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakal ve Satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virüs ve virüs-benzeri hastalıkların sörveyi ve indekslenmesi üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- Hadas, R., Bar-Joseph, M., Semancik, J. S., 1989. Segregation of a viroid complex from a graft-transmissible dwarfing agent source for grapefruit trees. *Annals of applied biology*, 115(3): 515-520.
- Hamdi, I., Elleuch, A., Bessaies, N., Grubb, C. D., Fakhfakh, H., 2015. First report of Citrus viroid V in North Africa. *Journal of general plant pathology*, 81(1): 87-91.
- Hızal, A. Y., Göral, V. T., 1987. Türkiye turunçgil üretimi, ihracatı ve virüs hastalıkları yönünden durumu. *Derim*, 4(1): 32-42.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., Ito, T., 2001. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Archives of Virology*, 146(5): 975-982.
- Kafa, G., 2004. Türkiye’de Selekte Edilen Bazı Limon ve Yafa Portakal Tiplerinin Verim Ve Meyve Özelliklerinin Belirlenmesi, Ç.Ü. Fen. Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, Yüksek Lisans Tezi, s.261, Adana.
- Klotz, L.J., Calavan E.C., Weathers, L.G., 1972. Virus and viruslike diseases of citrus. *California Agr.Exp.Sta-Circ*. 559: 42.
- Klotz, L.J., 1973. Color handbook of citrus diseases. Univ.of California Div.Agr.Sci., Berkeley, p.122, USA. alatarım 2014, 13 (1): 1-10 10
- Knorr, L.C., 1958. Finding the best lemon for Florida-Areport of progres. *Proc.Fla.State Hort- Soc*.71 . s. 123-28.
- Knorr, L.C., 1959. Selecting lemon varieties for Florida production. *Fla. Agr. Exp. Sta. Ann. Rept*. s. 246-47.

- Knorr, L.C., 1963. Rumple- A new disease of lemon fruits Plant Dis. Rep. 47: 335-39.
- Knorr, L.C., Olsen, R.W., Kesterson, J.W., 1963. Rumple of Lemons-its effect on Fresh Fruit, Lemonade concentrate, and peel oil. Citrus Industry 44 (11): 7, 11-13.
- Knorr, L.C., Oberbacher, M.P., 1964. Selecting Lemon varieties for Florida Production. Fla. Agr. Exp. Sta. Ann. Rept. s.223.
- Knorr, L.C., 1965. Behavior of rumple-affected lemons in storage. Citrus Industry 46 (9): 12-24.
- Knorr, L.C., 1966. Selecting Lemon varieties for Florida Production. Fla. Agr. Sta. Ann. Rept. s. 231.
- Knorr, L.C., 1967. Selecting Lemon varieties for Florida Production. Fla. Agr. Sta. Ann. Rept. s. 235-35.
- Knorr, L.C., Koo, R.C.J., 1969. Rumple-a Serious rind collapse of lemon in Florida and in Mediterranean Countries. p.1463-72-In Chapman, H.D.(ed) Proc. First Intern. Citrus Symposium, Univ. California, Riverside.
- Levy, L., Hadidi, A., 1993. Direct Nucleotide Sequence of PCR-amplified DNAs of the Closely Related Citrus Viroids IIa and IIb (Cachexia). In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 12, No. 12).
- Moreira, S., 1965. Report to the Government of Turkey on virus diseases of Citrus. Report to the Government of Turkey on virus diseases of Citrus.
- Norman, P. A., Sutton, R. A., 1969. Efficiency of mature and immature melon aphids in transmitting tristeza virus. J. Econ. Entomol, 62: 1237-38.
- Oberbacher, M.F., Knorr, L.C., 1965. Increase of rumple and decay in Lemon fruits during storage. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86: 260-66.
- Önelge, N., 1994. Turunçgillerde hastalık oluşturan viroidlerin biyolojik ve biyokimyasal tanısı üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.

- Önelge, N., 1996. Nucleotide sequence of CVd-Ib and CVd-IV viroids collected from citrus gummy bark-diseased sweet orange trees in the east Mediterranean region of Turkey/Nukleotidsequenz der Zitrusviroide CVd-Ib und CVd-IV aus Citrus gummy bark erkrankten Süßorangen an der östlichen Mittelmeerküste der Türkei. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, s.482-487.
- Önelge, N., 1997. Direct nucleotide sequencing of citrus exocortis viroid (CEV). Turkish journal of Agriculture and Forestry, 21(4): 419-422.
- Önelge, N., Kersting, U., Guang, Y., Bar-Joseph, M., Bozan, O., 2000. Nucleotide sequences of citrus viroids CVd-IIIa and CVd-IV obtained from dwarfed Meyer lemon trees grafted on sour orange/Nukleotidsäuresequenz der Zitrusviroide CVd-IIIa und CVd-IV aus zwergwüchsigen Meyer Limonen gepfropft auf Bitterorange. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, s.387-391.
- Önelge, N., Bozan, O., Gök, M., Satar, S., 2007. Yellow vein clearing of lemons in Turkey. 17th Conf.
- Riesner, D., Gross, H.J., 1985. Viroids. Annual review of biochemistry, 54(1): 531-564.
- Özalp, O., Azeri, T., 1967. Ege Bölgesi turuncgil virüs hastalıkları surveyi. Bitki Koruma Bülteni, 7(4): 167-187.
- Özbek, N., Özsan, M., Tuzcu, Ö., Danışman, S., 1974. A. Preliminary Study of Rumble A Serious Rind Disorder of Lemons in Turkey. Proceedings of the seventh Can. Intern. Org. Citvirologists. (Ed). E.C. Calavan s.157-166.
- Özbek, N., Özsan, M., Danışman, S., 1977. Akdeniz Bölgesinde yetiştirilen önemli Limon çeşitlerinde görülen mikro besin maddeleri noksanlıklarının teşhisi ve giderilmesi. TOAG-144, TÜBİTAK Yayınları no: 330-58, TÜBİTAK Fotoğraf Kılış Laboratuvarı ve Ofset Tesisleri, Ankara.

- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hadas, R., Bar-Joseph, M., Snger, H. L., 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research*, 19(23): 6640.
- Reanwarakorn, K., Semancik, J. S., 1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *Journal of General Virology*, 79(12): 3163-3171.
- Reanwarakorn, K., Semancik, J. S., 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology*, 89(7): 568-574.
- Reichert, I., Bental, A., 1957. Additional tristeza infected citrus varieties found in Israel. *FAO Plant Protection Bulletin*, 4(8): 129-30.
- Reichert, I., 1959. A survey of citrus virus diseases in the Mediterranean area. *Citrus virus diseases*, s.23-28.
- Rivera-Bustamente, R.F., Gin, R. And Semancik, J.S., 1986. Enhanced resolution of viricular and linear molecular forms of viroid and viroid like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal. Biochem*, 156:91-95.
- Roistacher, C. N., & Kitto, S.L., 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot tip grafting in vitro. *Plant Disease Reporter*, 61: 594-596.
- Roistacher, C.N., Pehrson, J.E., Semancik, J.S., 1991. Effect of citrus viroids and the influence of rootstocks on field performance of navel orange. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 11, No. 11)*.
- Roistacher, C. N., 1993. Psorosis—a review. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, Vol. 12, No. 12.
- Russo, F., Klotz, L.J., 1963. Wrinkle ring of Lemons in Sicily. *Calif. Citrograph* 48: 264.
- Salerno, M., 1965. Osservazioni Sula del “raggrinzimento della buccia” dei frutti di Limone. *Riv Patol.Veg.* 1: 33-40.

- Salerno, M., Continella, C., 1967. Ricerche sul “raggrinzimento della buccia” in relazione alla decarsa selezioni di Cultivor di Limone. *Technica Agricola* 19:340-57.
- Salerno, M., 1968. II. “raggrinzimento della buccia” Grave alternazione dei frutti di Limone, *Technica Agricola* 15:507-11.
- Salerno, M., Perrota, G., Benintende, M., 1968. L'incidenza del “raggrinzimento della buccia” in rapporto ad alcuni Livelli nutritivi in Piante di Limone. *Riv. Patol. Veg. (Pavia)*. 4: 201- 10.
- Scaramuzzi, G. 1965. *Le Malattie degli agrumi-edizione agricole*, Bologna. s.167.
- Semancik, J. S., Weathers, L. G., 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of “infectious” low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology*, 237(77): 242-244.
- Semancik, J.S., Rivera-Bustamante, R., Goheen, A.C., 1987. Widespread occurrence of viroid-like RNAs in grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1): 35-40.
- Semancik, J.S., Roistercher C.N., Duran-Villa N., 1988. A New Viroid is The Causal Agent of Citrus Cachexia Disease. In *Proc. 10th Conf. IOCV*. Riverside, s.125-136.
- Semancik, J.S., Duran-Vila, N., 1991. The grouping of citrus viroids: additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, (Vol. 11, No. 11).
- Serra, P., Barbosa, C. J., Daròs, J. A., Flores, R., Duran-Vila, N., 2008. Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology*, 370(1): 102-112.

- Tanaka, H., Yamada, S., 1972. Evidence for a relationship among the viruses of Satsuma dwarf, Citrus mosaic, Navel-infectious-mottling, Natsudaiddai dwarf, Citrus variegation, and Citrus crinkly leaf. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 5, No. 5).
- Tuzcu, Ö., 1990. Türkiye’de Yetiştirilen Başlıca Turunçgil Çeşitleri. Akdeniz İhracatçı Birlikleri. s.71. Mersin. Nurol Matbaası, Ankara.
- TÜİK, 2020. <http://www.tuik.gov.tr>
- USDA, 2020. <http://www.usda.gov>
- Villalobos, W., Rivera, C., Harnmond, R. W., 1997. Occurrence of citrus viroids in Costa Rica. *Revista de biologia tropical*, s.983-987.
- Wallace, J. M., 1978: Virus and viruslike diseases. In: Reuther, W., Calavan E.C., Carman G.E., (eds) *The Citrus Industry*, volume IV. Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Berkeley, s.67-184.
- Weathers, L.G., Calavan E.C., 1961. Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus. *Phytopathology* 51: 262-264.
- Wong, E., Márquez, A. L., Olivero, J., García, E. J., 2006. Distribution patterns and sampling design for “Wrinkle Rind” or “Rumple” on lemon crops. *International Conference on Integrated Control in Citrus Fruit Crops*, Proceedings of the meeting at Lisbon, Portugal, 26 – 27 September, 2005. IOBC wprs Bulletin Vol. 29 (3).

ÖZGEÇMİŞ

Oğuzhan Kılınç, İlköğretimini Adanada okudu. Lise eğitimini Seyhan Çeş Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2013 yılında lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünde başladı ve 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Viroloji bilim dalında master eğitimine başlamaya hak kazandı.

