

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ruşen KİŞLAK

**DOMATES BİTKİSİNDE *POSPİVİROİD* CİNSİ VİROİD
ETMENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATES BİTKİSİNDE *POSPİVİROID* CİNSİ VİROİD ETMENLERİNİN
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Ruşen KIŞLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 04/03/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
DANIŞMAN

.....
Yrd. Doç. Dr. Orhan BOZAN
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK
ÜYE

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

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2014-3116**

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

DOMATES BİTKİSİNDE *POSPIVIROID* CİNSİ VİROİD ETMENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ruşen KIŞLAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Yıl: 2016, Sayfa: 119

Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

: Yrd. Doç. Dr. Orhan BOZAN

: Yrd. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK

Bu çalışma domates bitkisinde *Pospiviroid* cinsi viroid etmenlerinin varlığının araştırılması amacı ile yürütülmüştür. Bu amaçla, 2014-2015 yılları arasında toplam 400 adet domates tohum, fide ve yaprak örneği toplanmış ve örneklerin total nükleik asit ekstraktları elde edilmiştir. Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE yarı-evrensel primer setleri ile yürütülen RT-PCR çalışmalarında, testlenen 398 adet domates örneğinin herhangi bir viroid etmeni ile bulaşık olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, saksıda yetiştirilen “Çeri” çeşidi iki domates örneğinin *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ile bulaşık olduğu, CEVd etmenine spesifik CEVd-FW/RE primer çifti ile belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında bu örneklerle ait 371 bp’lik DNA fragmentleri görüntülenmiş ve CEVd ile enfekteli domates izolatları, moleküler açıdan da karakterize edilmiştir. Nükleotid dizilimi analizi sonuçları, NCBI gen bankasına bildirilen bazı domates, turuncgil ve diğer bitki türlerine ait izolatlara % 89-98 oranında sekans benzerliği göstermiştir.

Yürütülen moleküler çalışmalara ek olarak, *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ve *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) etmenlerinin domates bitkilerinde oluşturabileceği bazı farklı semptomları gözlemlemek için, bir mekanik inokulasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. İlk semptomlar inokulasyondan yaklaşık 30-35 gün sonra, her iki viroid etmeni için de; bodurlaşma, yaprak epinastisi, yaprak kıvrılması ve bitki yapısında bozulmalar olarak belirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Viroid, Domates, *Pospiviroid*, RT-PCR, Mekanik İnokulasyon

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VIROID AGENTS EXISTANCE AT *POSPIVIROID* GENUS ON TOMATO PLANT

Ruşen KIŞLAK

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

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Year: 2016, Pages: 119

Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN

: Asst. Prof. Dr. Mustafa KÜSEK

This study was conducted to investigate viroid agents existence at *Pospiviroid* genus on tomato plant. For this purpose, between 2014-2015 years totally 400 tomato seeds, seedlings and leaves samples were collected and total nucleic acid extracts of these samples were obtained. In RT-PCR studies which were carried out by Posp1-FW/RE and Vid-FW/RE semi-universal primer sets, any viroid infection was detected in 398 tomato samples. On the other hand, two tomato samples which were grown in flowerpot on "Çeri" cultivar, found infected with *Citrus exocortis viroid* (CEVd) by CEVd-FW/RE specific primer pair. In agarose gel electrophoresis studies, 371 bp of DNA fragments were shown belong to these samples. CEVd infected tomato isolates were also characterized molecularly. Analysis of nucleotide alignments results showed % 89-98 sequence similarity rates to some tomato, citrus and other plant species reported to NCBI Genbank database.

In addition to molecular studies, to observe some different symptoms of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) agents on tomato plants, a mechanical inoculation application was performed. First symptoms were pointed out approximately 30-35 days later from inoculation, for both viroid agents; as stunting, leaf epinasty, leaf curling and malformation of plant structure.

Keywords: Viroid, Tomato, *Pospiviroid*, RT-PCR, Mechanical Inoculation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, yardım ve desteklerini benden esirgemeyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde; gerçekleştirilen arazi çıkışlarındaki katkılardan dolayı Sn. Yrd. Doç. Dr. Orhan BOZAN'a, kullanılan yerli domates tohumlarının tedarikini sağlayan Sn. Prof. Dr. H. Yıldız DAŞGAN'a, iklimlendirme odalarının kullanımı konusunda sağladığı olanaklar için Sn. Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU'na ve Viroloji laboratuvarı çalışanlarına, moleküler çalışmalardaki desteklerinden dolayı Sn. Uzm. Pakize GÖK'e, laboratuvar çalışmalarındaki yardım ve katkıları için Zir. Müh. Mete KARACA ve Zir. Müh. Büşra FİDANCI'ya çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın yürütülmesine maddi olanak sağlayan, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Viroidler ve Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Çalışmalar.....	7
2.2. Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Dünyada Yapılan Bazı Moleküler Çalışmalar	23
2.3. Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Türkiye’de Yapılan Bazı Moleküler Çalışmalar	29
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal.....	33
3.1.2. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal	36
3.1.3. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	37
3.1.4. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	38
3.1.5. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	38
3.2. Metot	39
3.2.1. Domates Örneklerinin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi	39
3.2.2. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	43
3.2.3. RT-PCR Çalışmaları.....	44
3.2.3.1. Ters Transkriptaz Enzimiyle Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi.....	44

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması	45
3.2.4. Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi	46
3.2.5. Sekans Analizi ve Verilerin Karşılaştırılması	47
3.2.6. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Testlenen Domates Tohum Örneklerine İlişkin Bulgular	51
4.1.1. Testlenen Yerli Domates Tohum Örnekleri	51
4.1.2. Testlenen Ticari Domates Tohum Örnekleri	52
4.2. Testlenen Domates Fide ve Yaprak Örneklerine İlişkin Bulgular	55
4.2.1. CEVd Etmeniyle Bulaşık Domates Örneklerinin Alındığı Yere Ait Bilgiler	56
4.2.2. CEVd Etmeniyle Bulaşık Örneklerle Ait Simptomolojik Bulgular	59
4.2.3. CEVd Etmeniyle Bulaşık Örneklerle Ait Moleküler Bulgular	62
4.2.3.1. RT-PCR ve Elektroforez Çalışmaları	62
4.2.3.2. Bulaşık Bitkilere Ait Total Nükleik Asitlerin RT-PCR’da Çoğaltılması	65
4.2.3.3. Sekanslama İşlemleri ve İzolatların Baz Dizilimlerinin Görüntülenmesi	67
4.2.3.4. İzolatların NCBI Veri Tabanındaki Organizmalarla Karşılaştırılması	69
4.2.3.5. Filogenetik Analiz Çalışmaları	77
4.2.4. Domates Örneklerindeki CEVd Etmeninin Kaynağına Ait Olasılıklar	80
4.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	81
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	89
5. 1. Sonuçlar	89
5. 2. Öneriler	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	113
EKLER	114

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Dünya domates yetiştiriciliğinde lider ülkeler (FAO, 2013)	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de meyvesi için yetiştirilen sebze türleri ve üretim miktarları (TÜİK, 2014).....	3
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan fide ve yaprak örneklerine ilişkin bazı bilgiler	34
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan ticari domates tohumlarına ilişkin çeşit listesi	35
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan yerli domates tohumlarına ilişkin çeşit listesi	36
Çizelge 3.4. <i>Pospiviroid</i> cinsine giren etmenleri belirlemede kullanılan yarı-evrensel primer çiftlerinin tanıdığı viroidler (Botermans ve ark., 2013).....	37
Çizelge 3.5. <i>Pospiviroid</i> cinsi viroid etmenlerini belirlemede kullanılan yarı-evrensel primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004)	37
Çizelge 3.6. CEVd ve PSTVd etmenlerinin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri (Önelge, 1997; Weidemann ve Buchta, 1998).....	38
Çizelge 3.7. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları.....	45
Çizelge 4.1. CEVd’inin “Forward” ve “Reverse” primer çiftine göre belirlenen Örnek-1 izolatına ilişkin baz dizilimleri	67
Çizelge 4.2. CEVd’inin “Forward” ve “Reverse” primer çiftine göre belirlenen Örnek-2 izolatına ilişkin baz dizilimleri	68
Çizelge 4.3. Örnek-1 izolatı ile NCBI veri tabanında kayıtlı bazı CEVd izolatlarının karşılaştırılması.....	70
Çizelge 4.4. Örnek-1 izolatıyla domates bitkilerinden bildirilmiş CEVd’i izolatlarının baz dizilimleri açısından karşılaştırılması.....	72
Çizelge 4.5. Örnek-1 izolatıyla bildirilen bazı CEVd’i varyantlarının karşılaştırılması	77

Şekil 3.1. Yerli domates tohumlarının Bahçe Bitkileri Bölümü seralarında yürütülen ekim çalışmaları: (a), (b).....	39
Şekil 3.2. Ekim işlemleri tamamlanan tüm yerli domates tohumlarının sulanması (a) ve çimlenme aşaması için bekletilmesi (b).....	40
Şekil 3.3. Çimlenen yerli domates tohumları (a), tohumlardan testlemeler yapmak amacıyla örneklerin alınması (b) ve gruplandırılarak paketlenmesi (c)	40
Şekil 3.4. Domates fideleri ve viroid inokulumları ile gerçekleştirilen mekanik inokulasyon aşaması (a), viroid inokulumları ile bulaştırılan domates fidelerinin klima odalarında simptom gelişimi için muhafaza edilmesi (b)	48
Şekil 4.1. RT-PCR ile testlenen yerli domates tohum örneklerine ilişkin % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), b: TR40361, c: TR40532, d: TR43484, e: TR55711, f: TR68517, g: TR61870, h: TR37277, i: TR49449, j: Pozitif kontrol (PSTVd)	52
Şekil 4.2. RT-PCR ile testlenen ticari domates tohum örneklerine ilişkin % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), b: Bambus, c: İkram, d: Newton, e: Verty, f: Yeniçeri, g: Şimşek, h: Aytina, i: Zeus, j: Pozitif kontrol (PSTVd).....	53
Şekil 4.3. Domates bitkisi örneklerinin elde edildiği ticari işletmeye ilişkin lokasyon	57
Şekil 4.4. İşletmede satışı gerçekleştirilmekte olan bazı süs bitkileri (a), (b) ile çeşitli sebze fideleri ve meyve fidanlarına ilişkin görüntüler (c).....	58
Şekil 4.5. Örnek-1 domates bitkisinde gözlemlenen genel gelişim geriliği ve bitkinin bodur bir profile sahip olması	59

Şekil 4.6. Örnek-1 domates bitkisinde gözlemlenen yaprak boyutlarının küçük kalması ve boğum aralarının kısalması (a), yaprakların kıvrılarak bitkinin tepe kısmında kümeleşmesi (b).....	60
Şekil 4.7. Örnek-2 domates bitkisinde gözlemlenen genel gelişim geriliği ve bitkinin bodur bir profile sahip olması (a), yaprak boyutlarının küçük kalması ile boğum aralarının kısalması (b).....	61
Şekil 4.8. RT-PCR ile testlenen Örnek-1 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), d: Örnek-1, f: Pozitif kontrol (CEVd).....	63
Şekil 4.9. RT-PCR ile testlenen Örnek-2 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), c: Örnek-2, g: Pozitif kontrol (CEVd)	63
Şekil 4.10. RT-PCR ile çoğaltılan CEVd'i bulaşık Örnek-1 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a-g: Örnek-1.....	66
Şekil 4.11. RT-PCR ile çoğaltılan CEVd'i bulaşık Örnek-2 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a-g: Örnek-2.....	66
Şekil 4.12. Örnek-1 ile CEVd-t izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması	73
Şekil 4.13. Örnek-1 ile 89002594 izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması	74
Şekil 4.14. Örnek-1 ile 8900808 izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması	75
Şekil 4.15. Örnek-1 ile 89002600 izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması	76
Şekil 4.16. Örnek-1 izolatıyla CEVd'i varyantlarının filogenetik yakınlığını gösteren soyağacı (Kimura 2-Parametre Modeli, Bootstrap Değeri: 1000 Tekrar).....	78
Şekil 4.17. CEVd'i bulaşık domates bitkisinde gözlemlenen tepe kıvrıcıklığı ve bitkinin üst kısımlarındaki kümeleşme simptomları	83

Şekil 4.18. CEVd'i bulaşık domates bitkisi yaprak örneği (sağda) ve sağlıklı domates bitkisi yaprak örneğinin (solda) boyutlarının karşılaştırılması	83
Şekil 4.19. CEVd'i bulaşık domates bitkisinde (sağda) gözlemlenen boğum aralarının kısalması ve bodurluk simptomları.....	84
Şekil 4.20. Mekanik inokulasyondan 50 gün sonra yapılan uzunluk ölçümünde sağlıklı domates bitkisinin (solda) boyu 24 cm iken CEVd'i ile bulaşık domates bitkisinin (sağda) boyu 15 cm olarak belirlenmiştir	84
Şekil 4.21. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde üst yaprakların kıvrılarak aşağı doğru uzaması (epinasti) ve kırılğan bir yapı alması simptomları.....	85
Şekil 4.22. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisi (solda) yaprak örneğinde ileri dönemde gözlemlenen ve besin elementi noksanlığına benzer sararma simptomu (a), sağlıklı domates bitkisi (sağda) yaprak örneği (b).....	85
Şekil 4.23. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde (sağda) gözlemlenen bodurluk simptomu	86
Şekil 4.24. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde gözlemlenen boğum aralarının kısalması simptomu	86
Şekil 4.25. RT-PCR ile testlenen CEVd'i bulaşık Marmande çeşidi domates fidelerine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, c-e: Marmande, f: Pozitif kontrol (CEVd)	88
Şekil 4.26. RT-PCR ile testlenen PSTVd'i bulaşık Marmande çeşidi domates fidelerine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, b-d: Marmande, f:Pozitif kontrol (PSTVd).....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	:	Yüzde
°	:	Derece
°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
A	:	Adenin
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
ASBVd	:	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
BLAST	:	Basic Local Aligment Search Tool
bp	:	Baz çifti
C	:	Sitozin
CCCVd	:	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleik asit
CEVd	:	<i>Citrus exocortis viroid</i>
CEVd-g	:	<i>Citrus exocortis viroid-grapevine</i>
CEVd-t	:	<i>Citrus exocortis viroid-tomato</i>
CLVd	:	<i>Columnnea latent viroid</i>
cm	:	Santimetre
CSVd	:	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>
CTAB	:	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH ₂ O	:	Çift distile su
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksinükleotid fosfat
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELVd	:	<i>Eggplant latent viroid</i>
ELISA	:	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
EPPO	:	European and Mediterranean Plant Protection Organization

F ₁	:	Hibrit
FAO	:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FW	:	Forward
G	:	Guanin
gr	:	Gram
HSVd	:	<i>Hop stunt viroid</i>
IrVd	:	<i>Iresine viroid</i>
l	:	Litre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MPVd	:	<i>Mexican papita viroid</i>
N	:	Normal
NaCl	:	Sodyum klorür
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
PAGE	:	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCFVd	:	<i>Pepper chat fruit viroid</i>
PLMVd	:	<i>Peach latent mosaic viroid</i>
PLRV	:	Potato leafroll virus
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pH	:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PSTVd	:	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
PVP	:	Polyvinylpyrrolidone
RE	:	Reverse
RNA	:	Ribonükleik asit
R-PAGE	:	Return-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RT	:	Reverse Transcriptase
RT-PCR	:	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
sp.	:	Tür

sPAGE	:	Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spp.	:	Türler
T	:	Timin
TAE	:	Tris-Acetate-EDTA
Taq	:	Termostabil polimeraz enzimi
TASVd	:	<i>Tomato apical stunt viroid</i>
TCDVd	:	<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>
TE	:	Tris-EDTA
TPMVd	:	<i>Tomato planta macho viroid</i>
TÜİK	:	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	:	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.); Solanaceae familyasının *Lycopersicon* cinsine bağlı, ılıman iklimlerde tek yıllık, tropikal bölgelerde ise çok yıllık bir bitkidir (Şeniz, 1992). Domates bitkisinin sistematikteki yeri şöyledir:

- Alem** : Plantae (Bitkiler)
- Şube** : Angiospermae (Kapalı Tohumlular)
- Sınıf** : Eudicotidae (İki Çenekliler)
- Takım** : Solanales
- Familya** : Solanaceae (Patlıcangiller)
- Cins** : *Lycopersicon*
- Tür** : *Lycopersicon esculentum* Mill.

Domatesin anavatanı Orta Amerika ile Güney Amerika'nın kuzey kesimleri, ekvatorun 30 ° kuzey – 30 ° güneyinde kalan bölge ve bu bölge içinde yer alan Peru ile Meksika'dır (Ercan ve ark., 2002).

Domatesin çok sayıda yabani ve kültüre alınmış uzak akrabaları, And Dağları'nın batı sahilleri boyunca ince bir şerit halinde ilerleyerek kuzeyde Ekvador, güneyde ise Şili'nin uç kısımlarına kadar yayılmışlardır (Vural ve ark., 2000; Günay, 2005).

Günümüzde kültürü yapılan domates bitkisinin; *L. hirsutum*, *L. peruvianum* ve *L. pimpinellifolium*'dan faydalanılarak geliştirildiği, ayrıca ana materyalin de *L. peruvianum* olduğu bilinmektedir (Vural ve ark., 2000).

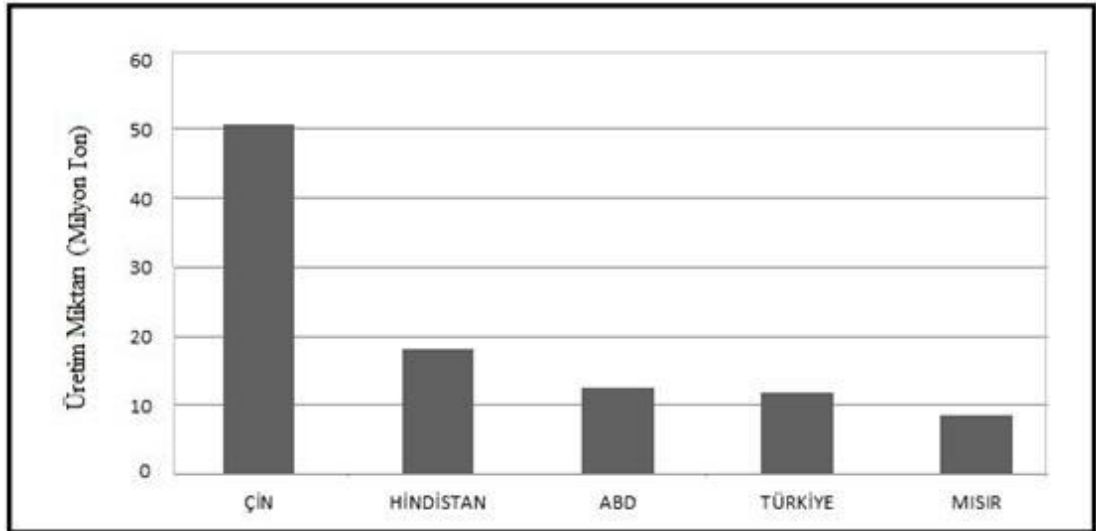
Domates, ilk defa Meksikalılar tarafından kültüre alınmış ve buradan dünyaya yayılmıştır. Amerika'nın keşfinden sonra, bu kıtaya gelen gemiciler vasıtasıyla Avrupa'ya götürülmüş ve kültürü yapılmaya başlanmıştır (Yılmaz ve ark., 2008).

Domates, 1850'li yıllarda Sultan Abdülmecit tarafından Osmanlı sarayına getirilmiştir. Türkiye'de ise 1900'lü yılların başlarında, Adana ilinde üretimine başlanmıştır. Domatesin halk tarafından yoğun olarak yetiştirilmesi ve tüketilmesi ise 1950'li yıllardan sonra olmuştur (Yılmaz ve ark., 2008).

Domates, dünyada en fazla yetiştirilmekte olan sebze türlerinden birisidir. Dünyada toplam 4.751.530 hektar alanda, 156.477.012 ton domates üretilmektedir. Dünya domates üretimi ülkeler sıralamasına bakıldığında, 50.552.200 ton üretimle Çin birinci sırayı almaktadır. Bu sırayı 18.227.000 ton üretim ile Hindistan, 12.574.550 ton üretim ile ABD, 11.820.000 ton üretim ile Türkiye ve 8.533.803 ton üretim ile Mısır takip etmektedir (FAO, 2013).

Domates üretiminde Türkiye, bu üretim değeri ile dünya sıralamasında 4. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Dünya domates yetiştiriciliğinde lider ülkeler (FAO, 2013)

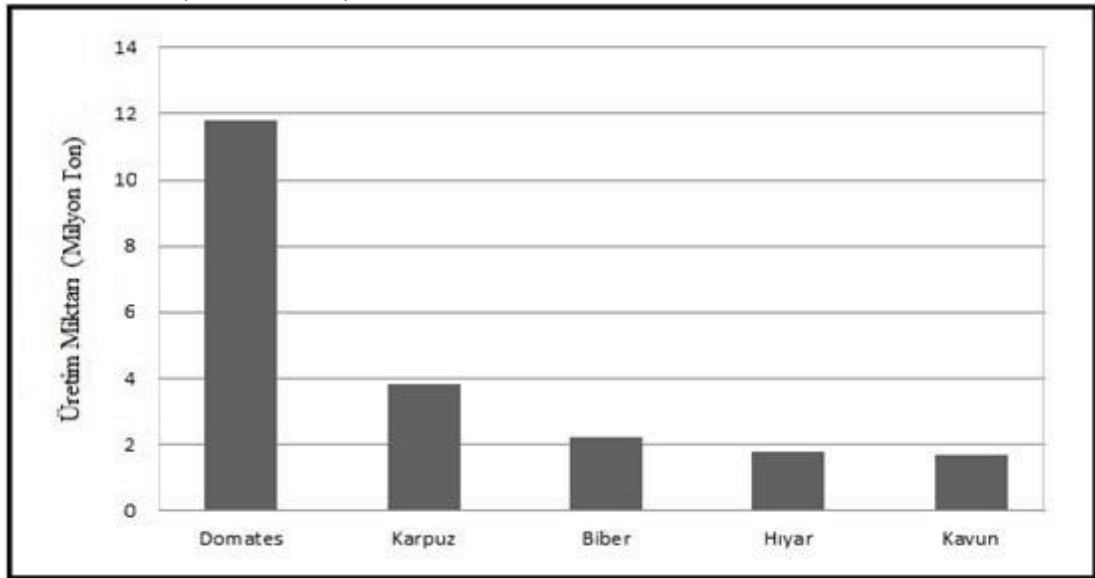


Türkiye, uygun iklim koşullarının avantajı nedeniyle domates üretiminde önemli ülkelerden biridir. Türkiye ekonomisinde önemli bir yeri olan domates, yetiştirildiği bölgelerde çiftçinin temel gelir kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Ülkemizde domates yetiştiriciliği, Karadeniz Bölgesi'nin yoğun yağış alan yöreleri dışında her yerde yapılabilmektedir. Başta Marmara olmak üzere Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde de domates üretimi yapılmaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde genellikle örtü altı yetiştiricilik ve sofralık çeşitlere yönelik domates üretimi yaygın durumda iken, Marmara ve Ege Bölgeleri'nde ise sanayilik çeşitlere yönelik domates üretimi yaygın durumdadır (Vural ve ark., 2000).

Ülkemizin farklı iklim bölgelerine sahip olması, açık ve örtü altı alanlarda hem sofralık hem sanayilik domates çeşitlerinin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Mevcut seralarının yaklaşık olarak % 96'sında sebze üretimi yapılan Türkiye'de, yetiştirilen sebzeler içerisinde % 47'lik oranla domates ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizde sofralık domates üretimi en fazla Akdeniz Bölgesi'nde olmak üzere, kış ayları boyunca seralarda, yaz aylarında ise açık alanlarda yapılmaktadır. Çukurova Bölgesi, Türkiye'nin önemli domates üretici bölgelerinden biridir. Bu bölgedeki domates yetiştiriciliği çoğunlukla Adana, Mersin ve çevresinde olmakla birlikte, açıkta veya seralarda yapılmaktadır (Tüzel ve ark., 2005).

Türkiye'de domates; üretim, tüketim ve ekonomideki değeri bakımından üretilen sebzeler içerisinde ilk sırada yer almaktadır. TÜİK'in 2014 yılı verilerine göre, domates ülkemizde meyvesi için yetiştirilen sebzeler kategorisi listesinde ilk sırayı almaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Türkiye'de meyvesi için yetiştirilen sebze türleri ve üretim miktarları (TÜİK, 2014)



TÜİK'in 2014 yılı verilerine göre, Türkiye'de 183.029 hektar alanda 11.850.000 ton domates üretimi gerçekleştirilmiştir. Mevcut miktarın 7.935.110 tonu sofralık olarak, 3.914.890 tonu da salçalık olarak üretilmiştir (TÜİK, 2014).

Yayınlanan istatistiksel verilere göre, her yıl dünya tarım ürünlerinin en az % 12’lik bir bölümü bazı patojen mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıkları ve % 20’lik bir bölümü ise bazı böceklerden dolayı kaybedilmektedir. Verim ve kalite üzerine olumsuz etki eden biyotik faktörler arasında; hastalık etmeni olarak bilinen patojenler (funguslar, bakteriler, virüsler ve viroidler), zararlılar olarak bilinen bazı hayvansal organizmalar (böcekler, akarlar, nematodlar, salyangozlar, kemirgenler, memeliler ve kuşlar) ve yabancı otlar sayılabilir. Tarımsal ürünlerde hastalık, zararlı ve yabancı otlar önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bunlara karşı gerekli bazı mücadelelerin yapılmadığı durumlarda, ürün kayıpları % 35’ten % 100’e kadar ulaşabilmektedir. Yapılan araştırmalar; bitki hastalıklarına % 60 – 75 oranında fungus ve bakterilerin, % 10 – 15 oranında virüs ve viroidlerin, % 10 oranında ise diğer patojenlerin ve bazı çevresel faktörlerin sebep olduğunu göstermektedir (Agrios, 1997).

Domates bitkilerinde de; fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri, önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu bitkide hastalık oluşturan önemli bir patojen grubu da, sub-viral etmenler olarak bilinen viroid etmenleridir.

Viroidler çok sayıda tarımsal üründe önemli düzeyde ürün kayıplarına neden olabilen, dairesel ve tek zincir şeklinde RNA molekülü yapısındaki etmenlerdir (Diener, 1987).

Viroidlerin dünyada yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu belirtilmiştir. Özellikle Hindistan cevizi, avokado ve patatesten önemli verim kayıplarının meydana geldiği bildirilmiştir. En küçük viroid olan 246 nükleotid uzunluğa sahip, *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) etmeninin 1982 yılında Filipinler’de 30 milyondan fazla Hindistan cevizi ağacını öldürdüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 ağacın bu viroid enfeksiyonu nedeni ile yok olduğu rapor edilmiştir (Hanold ve Randles, 1991).

Viroidler, ekonomik önemi olan çok sayıda hastalığa neden olmaları ve ayrıca enfeksiyöz hastalık etmenleri olarak da en küçük patojen grubunu oluşturmaları nedeniyle önemlidir. Günümüzde dünya çapında yapılan çalışmalarla, 30’un üzerinde viroid etmeni birçok kültür bitkisinde saptanmış durumdadır (Flores ve ark., 2011).

Domates bitkileri ve Solanaceae familyasına ait diğer bazı bitkilerde hastalık oluşturan viroidlerle ilgili, dünya genelinde yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Ülkemizde viroid etmenleri ile ilgili çeşitli bazı çalışmalar mevcut olmakla birlikte, özellikle domates bitkilerini kapsayan ve bu konuda detaylı olarak yapılmış mevcut bir çalışma bulunmamaktadır.

Pospiviroid cinsine ait türlerden; *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (Leontyeva, 1980; Puchta ve ark., 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), (Walter ve ark., 1980; Walter, 1987), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), (Galindo ve ark., 1982), *Columnnea latent viroid* (CLVd), (Hammond ve ark., 1989; Singh ve ark., 1992), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), (Mishra ve ark., 1991; Fagoaga ve Duran-Vila, 1996), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), (Singh ve ark., 1999), *Mexican papita viroid* (MPVd), (Ling ve ark., 2008), ve son olarak da *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), (Reanwarakorn ve ark., 2011) etmenlerinin domates bitkilerinde hastalık oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir.

Viroid enfeksiyonları nedeni ile domates bitkilerinde değişen oranlarda meydana gelen verim kayıplarının ve bazen de bitkilerin ölümü ile sonuçlanan durumların ortaya çıkabildiği bilinmektedir. Viroid etmenlerinin bitkiden bitkiye hızlı ve kolay bir şekilde taşınabilmesi ve bu etmenlere karşı kimyasal mücadele yöntemlerinin bulunmaması, bu etmenlerin önemini daha da arttırmaktadır.

Bu çalışma, domates bitkilerinde hastalık oluşturduğu bilinen viroidlerden; *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) ve *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) etmenlerinin, 2014 ile 2015 yıllarında toplanan çeşitli domates tohum, fide ve yaprak örneklerindeki varlığını araştırmak amacı ile moleküler yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.

Moleküler çalışmalara ek olarak; *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) etmenlerine ait inokulumlar ve domates fideleri kullanılarak yürütülen mekanik inokulasyon çalışmaları sayesinde, bu etmenlerin domates bitkilerinde oluşturdıkları çeşitli semptomlar gözlemlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Viroidler ve Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Çalışmalar

Viroidlerin oluşturduğu belirtiler genellikle virüs belirtileri ile benzerlik gösterdiği için yıllardır virüsler ile karıştırılmış ya da gelişim geriliği olarak nitelendirilmiş, bazen de hiç belirtil oluşturmadan latent durumda kalabildikleri için keşifleri oldukça geç olmuştur (Hadidi ve ark., 2003).

1967 yılında, patates iğ yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığı ve yeni bir patojen grubu olan “viroidler” tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar hastalıklı patateslerde yaptıkları çalışmalarda, virüs partikülleri yerine hücrede serbest olarak bulunan ve düşük moleküler ağırlığa sahip RNA’lar izole etmişlerdir. Böylece ilk defa protein mantoya sahip olmayan, virüslerden farklı, küçük molekülü ve tek sarmallı RNA’lardan oluşan patojenleri tanımlamak için “viroid” terimi kullanılmıştır (Diener ve Raymer, 1967; Diener, 1971).

Kültür bitkilerinde hastalık oluşturan ve günümüzde “viroid” olarak adlandırılan bu etmenin, yakın zamana kadar virüs olarak değerlendirildiği ile ilgili birçok rapor bulunmaktadır (Hull, 2002; Hadidi ve ark., 2003; Flores ve ark., 2011).

Viroidlerin hastalık etmeni olarak; düşük moleküler ağırlığa sahip, protein mantosu bulunmayan, tek zincirli, halka formunda, kapalı kovalent bağları bulunan ve RNA’lardan oluşan bir patojen grubu olduğu bildirilmiştir. Viroidlerin ayrıca ısıya son derece dayanıklı oldukları da, yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Riesner ve Gross, 1985; Flores ve ark., 2005a).

En küçük virüs genomundan daha küçük olan (246 – 410 arasında değişen sayıda baza sahip nükleotidden oluşan) viroidlerin, çubuk benzeri ikincil yapılarının olduğu ve sadece çiçekli bitkilerde zarar oluşturduğu belirlenmiştir (Sanger ve ark., 1976; Keese ve Symons, 1985; Flores ve ark., 2011).

İnsanlarda karaciğer enfeksiyonlarına neden olan ve Hepatit B virüsünün varlığında meydana gelen Hepatit D hastalığı etmeninin orijini netlik kazanmamış olup, viroid kökenli olduğu yönünde bazı görüşler mevcuttur (Branch ve ark., 1989).

Viroidler protein manto veya herhangi bir protein kod içermezler, konukçu bitkilerdeki etkilerini enzimler sayesinde gösterirler. Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi idare eden bazı genlerin değişmesine neden olurlar (Gora-Sochacka, 2004).

Farklı bitki familyalarına ait birçok konukçuya mekanik olarak ve çoğaltma materyali ile taşındığı bildirilen viroidlerin; polen, tohum ve düşük oranda da olsa vektör böceklerle taşınabildiği ortaya konulmuştur (Diener, 1987; Hull, 2002).

Viroidlerin dünyada yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir. Ekonomik anlamda önemli kayıpların meydana geldiği bitkilerden bazıları; patates, asma, turuncgiller, Hindistan cevizi, şerbetçi otu, domates, avokado, şeftali, elma, armut, patlıcan ve krizantemdir (Randles, 2003).

Bazı viroidler geniş konukçu dizisine sahiptir: *Hop stunt viroid*'i (HSVd), Carnabaceae, Vitaceae, Cucurbitaceae, Rosaceae ve Rutaceae, *Citrus exocortis viroid*'i (CEVd), Rutaceae, Vitaceae, Compositae ve Solanaceae familyalarından birçok türde enfeksiyona neden olmaktadır (Singh ve Ready, 2003).

Viroidler ekonomik önemi olan çok sayıda hastalığa neden olmaları ve enfeksiyöz hastalık etmenleri olarak da en küçük patojen grubunu oluşturmaları sebebi ile, biyolojik olarak da ayrı bir ilgiye sahiptirler. Manto proteinine sahip virüslerin çoğunun bitki içinde hücreden hücreye yavaş hareket etmesine karşın, viroidlerin konukçu içinde oldukça hızlı hareket ettikleri ve floemde oldukça hızlı ilerledikleri belirlenmiştir. Genel olarak bitkinin büyümesinde ve gelişmesinde bazı değişikliklere neden oldukları veya latent olarak konukçu hücreleri içinde bulundukları bildirilmiştir. Viroidlerden bazılarının bitkilerde hastalık oluşturduğu saptanmış olmasına rağmen henüz hastalık etmeni olarak tanımlanmamış viroidlerin bulunduğu da belirtilmektedir (Semancik ve Szychowski, 1992).

Viroidler genel olarak bitkilerde virüs hastalıkları ile benzerlik gösteren belirtiler ortaya koymaktadırlar. Viroidlerin bitkilerde neden oldukları belirtilerin bazen fizyolojik stres faktörlerinden kaynaklanan belirtiler ile karıştırılması da söz konusu olmaktadır. Viroidlerin konukçularında ortaya koydukları belirtiler; bitki türü ve çeşidine, viroidin ırkına ya da varyantına, ortam koşullarına, bitkilerin beslenme dengesine ve bitkilerde viroidlerin tek başına veya birlikte bulunma durumlarına göre değişmektedir (Hadidi ve ark., 2003).

Cücelik ya da bodurlaşma birçok viroid hastalığının en belirgin simptomudur. Cücelik symptomu yaprak boyutlarında küçülme ve nodyumların kısılması olarak tanımlanmaktadır (Hadidi ve ark., 2003).

Viroidlerin bitkilerde ortaya koydukları cücelik dışındaki diğer belirtiler; yaprak, çiçek ve meyvelerde lekeler, şekil ve renk bozulmaları, dal ve gövdede çukurluklar, şişme ve zamklanma, bitkilerde gelişme geriliği, sararma, çalılışma ve ölüm olarak bilinmektedir (Hadidi ve ark., 2003).

Gözle görülür bir zararın belirlendiği viroid hastalıklarının yanında, simptomsuz olarak taşınan birçok viroid türü de bulunmaktadır. Simptomsuz taşınan viroidlerin bazıları bitkilerde yüksek oranda enfeksiyon meydana getirebilmektedir (Randles, 2003).

Gözlenebilir symptomların yokluğunda hastalıklı bitkiler simptomolojik olarak teşhis edilememekte ve yetiştirildikleri alanlardan uzaklaştırılamamaktadır. Bu bitkiler viroidlerin daha fazla yayılması açısından bir kaynak oluşturmaktadır (Randles, 2003).

Viroidlerin sınıflandırılması ilk olarak “1989” yılında yapılmıştır. Nükleotid dizilim benzerliklerine dayanan son taksonomik çalışmalarda, viroidler “*Pospiviroidae*” ve “*Avsunviroidae*” olmak üzere iki farklı familyaya ayrılmıştır (Koltunow ve Rezaian, 1989; Flores ve ark., 2005b).

Viroidlerin bilinen 30’un üzerinde türü *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyaları içerisinde yer almaktadır (Flores ve ark., 2005b).

Viroid familyaları yapısal yönden ve replikasyon yönünden bazı farklılıklar göstermektedir. *Pospiviroidae* familyasında yer alan viroidlerin çekirdekte replike olduğu (Keese ve Symons, 1985; Sano ve ark., 1992) belirtilirken, *Avsunviroidae* familyasında yer alan viroidlerin ise kloroplastlarda replike olduğu belirtilmiştir (Symons, 1981; Hutchins ve ark., 1986).

Pospiviroidae ve *Avsunviroidae* familyalarının üyeleri, ortak bir model olarak yuvarlanan çember (rolling circle) modeli ile çoğalmaktadır. *Pospiviroidae* familyası üyeleri bu ortak model içerisinde asimetric şekilde çoğalırken, *Avsunviroidae* familyası üyeleri ise yine bu ortak model içinde simetric şekilde çoğalmaktadır (Verhoeven, 2010).

Avsunviroidae familyasının tipik türü *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)'dir. Bu familyada yer alan viroidler korunmuş bir merkez bölgeye sahip değildirler. Kendi kendine ayrılma özelliği gösteren ve çekiç başı yapısına sahip olan bu familya üyelerinin ribozim aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Flores ve ark., 2000).

Avsunviroidae familyasının diğer üyeleri; *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), (Hernandez ve Flores, 1992; Bussiere ve ark., 2000), *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd), (Navarro ve Flores, 1997) ve yeni bir üye olan *Eggplant latent viroid* (ELVd) 'dir (Fadda, 2003).

Pospiviroidae familyasının tipik türü *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)'dir (Diener, 1971; Gross ve ark., 1978). Bu familyada yer alan viroidlerin çubuk benzeri bir yapıya sahip oldukları ve sekonder yapılarının ise beş farklı yapısal bölgeden oluştuğu bildirilmiştir (Sanger ve ark., 1976; Ding ve Owens, 2003). Bu bölgelerin; iyi korunmuş bir merkez (C) bölge, patojenite (P) bölgesi, değişken (V) bölge, sağ (TR) ve sol (TL) terminal bölge olduğu rapor edilmiştir (Keese ve Symons, 1985; Sano ve ark., 1992; Flores ve ark., 2005b).

Özellikle Solanaceae familyasında hastalıklara neden olan, *Pospiviroidae* familyası *Pospiviroid* cinsi içinde 10 adet viroid türü bulunmaktadır. Bu viroidler: *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), (Diener ve Lawson, 1973), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), (Semancik ve Weathers, 1972), *Columnnea latent viroid* (CLVd), (Hammond ve ark., 1989; Singh ve ark., 1992), *Iresine viroid* (IrVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), (Martinez-Soriano ve ark., 1996), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (Diener, 1971; Singh ve Clark, 1971), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) (Walter, 1987; Spieker ve ark., 1996), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) (Singh ve ark., 1999), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), (Galindo ve ark., 1982; Hadidi ve ark., 2003), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), (Verhoeven ve ark., 2009a). *Pospiviroid* cinsine ait türlerden *Iresine viroid* (IrVd) etmeni dışındaki viroid etmenleri domates bitkilerinde hastalık oluşturmaktadır (Verhoeven, 2010).

Pospiviroid cinsine ait bazı viroid türlerinin benzer belirtiler ve meydana gelen verim kayıplarıyla, domates bitkilerinde bazı enfeksiyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir (Mongera ve ark., 2010).

Doğal olarak enfektelenmiş domates bitkilerinden; *Citrus exocortis viroid* (CEVd), (Mishra ve ark., 1991; Fagoaga ve Duran-Vila, 1996), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (Leontyeva, 1980; Puchta ve ark., 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), (Walter ve ark., 1980; Walter, 1987), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), (Singh ve ark., 1999) ve *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), (Galindo ve ark., 1982) gibi “*Pospiviroid*” cinsi viroid türleri izole edilmiştir.

Kültürü yapılan pek çok bitki türünde enfeksiyonlara neden olan *Pospiviroid* etmenlerinin, bazı süs bitkilerinde de symptom oluşturarak veya latent durumda bulunmalarına ilişkin örnekler mevcuttur. PSTVd etmeninin, Solanaceae familyası süs bitkilerinden; *Lycianthes rantonnetii*, *Solanum jasminoides*, *Solanum jamesonii*, *Brugmansia* türleri, *Calibrachoa* türleri ve *Petunia* türlerinden bazı konukçuları mevcuttur. Etmenin ayrıca Asteraceae familyasına ait *Dahlia* ve *Chrysanthemum* türlerinden de bazı konukçularının bulunduğu belirtilmiştir. CEVd etmeninin, *Glandularia pulchella* (Verbenaceae), *Solanum jasminoides* (Solanaceae), bazı *Impatiens* (Balsaminaceae) türleri ve bazı *Verbena* (Verbenaceae) türlerinden konukçuları mevcuttur. TASVd etmeninin, Solanaceae familyası süs bitkilerinden; *Lycianthes rantonnetii*, *Solanum jamesonii*, *Solanum pseudocapsicum* ve bazı *Cestrum* türlerinden konukçuları bulunmaktadır. TCDVd etmeninin, *Petunia hybrida* (Solanaceae), *Brugmansia sanguinea* (Solanaceae), *Pittosporum tobira* (Pittosporaceae), *Vinca minör* (Apocynaceae) ve *Verbena* (Verbenaceae) türlerinden de bazı konukçularının mevcut olduğu belirtilmiştir. (Verhoeven, 2010).

PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*), Kuzey Amerika’da patates üretim alanlarında oldukça önemli bir patojen olarak, 20. yüzyılın ilk çeyreğinde ortaya çıkmıştır (Schultz ve Folsom, 1923).

1917 – 1921 yılları arasında yapılan gözlemler ve araştırmalarda, PSTVd’inin bulaşıcı bir etmen tarafından oluşturulduğu ve arazi koşullarında hızlıca yayıldığı bildirilmiştir (Schultz ve Folsom, 1923).

PSTVd (Patates iç yumru viroidi) etmeninin, Kuzey Amerika’dan diğer kıtalara enfekteli yumruların taşınması ile yayıldığı ve böylece kıtalar arası taşınmanın gerçekleştiği bildirilmiştir (Salazar, 1989).

PSTVd önemli bir Solanaceae familyası hastalığı olup, dünyada patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisinde; Afrika (Nijerya), Asya (Afganistan, Çin, Hindistan) ve Rusya'yı içine alan Doğu Avrupa, Kuzey Amerika ve Orta Amerika'da yaygındır. Yapılan çalışmalarda, PSTVd'inin Avusturalya'nın Kuzey Bölgesi'nde "Solanum" cinsine ait yabancı bir türden izole edildiği de bildirilmiştir (Behjatnia ve ark., 1996; Badilla, 1999; OEPP/EPPO, 2004).

Etmenin ana konukçuları başta patates ve domates olmakla birlikte; avokado (*Persea americana*), pepino (*Solanum muricatum*), patlıcan (*Solanum melongena*), altın çilek (*Physalis peruviana*), biber (*Capsicum annuum*) bitkileri de etmenin diğer konukçuları arasındadır. Ayrıca bu etmenin Solanaceae familyasına dahil bazı yabancı otlar, Solanaceae ve diğer familyalara dahil bazı süs bitkilerinden de konukçuları bulunmaktadır (Owens ve Verhoeven, 2009).

PSTVd etmeninin konukçu dizisini araştırmak amacıyla 31 familyayı içeren ve toplamda 94 bitki türü ile yapılan bazı deneysel çalışmalar sonucunda, araştırılan türlerde PSTVd etmenine karşı duyarlılık gözlenmiştir (Jeffries, 1998).

Sanger ve arkadaşları tarafından, 1976 yılında nükleotid dizilimi tanımlanan ilk bitki patojeni viroid *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)'dir ve böylece "PSTVd" etmeni viroidlerin patotipi olmuştur. PSTVd'inin yapısının ilk kez saptanmasından sonra etiyojisi bilinmeyen birçok bitki hastalığının da, viroidler tarafından oluşturulduğu ortaya konulmaya başlanmıştır (Hadidi ve ark., 2003).

Araştırmacılar PSTVd etmeninin nükleotid dizilimlerini araştırıp bazı farklı varyantlarını ortaya koyarak, bu varyantlardan bazılarının daha şiddetli symptom geliştirdiğini belirtmişlerdir (Gross ve ark., 1978; Diener, 1987).

1967 yılına kadar bir virüs hastalığı olarak nitelendirilen "patates iğ yumru viroidi" etmeni 356 – 361 arasında değişen sayıda nükleotide sahip, dairesel ve tek sarmallı RNA moleküllerinden oluşmaktadır (Wang ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda çevre koşullarının hastalık gelişiminde etkili olduğu, soğuk bölgelerde hastalık symptomları maskelenirken, sıcak bölgelerde daha şiddetli symptomların gelişebildiği bildirilmiştir. PSTVd etmeninin özellikle yüksek sıcaklık koşullarında oluştuğu ve neden olduğu ürün kaybının ise % 25'ten % 70'lere kadar değişebildiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Gross, 1924; Diener, 1987).

PSTVd nedeniyle patates bitkilerinde gelişen belirtiler, patates bitkilerinin çeşidine ve iklim koşullarına göre değişmektedir. Yeşil aksamda gelişen belirtiler genellikle zayıf veya şiddetli bodurluk, yaprakların yeşil renginin griye dönüşmesi ve matlaşması ile bu yaprakların uç kısımlardan hafifçe kıvrılması şeklindedir. PSTVd ile enfekteli bitkiler sağlıklı olanlara oranla daha fazla dikine doğru gelişmekte, daha fazla yan dal oluşturmakta ve yapraklar daha dar şekilde gelişmektedir. Enfekteli patates yumruları karakteristik olarak uzunlamasına yapılar geliştirmekte ve yumrular üzerinde "eyebrow" olarak adlandırılan, iğ şeklinde tümsek çıkıntılar gelişmektedir. Enfekteli bitkilerin normal olanlara oranla daha fazla göz içerdiği de, yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Diener, 1987).

PSTVd'inin patates bitkisinde verimi % 40 – 45'lere varan oranlarda azalttığı, yapılan bazı çalışmalarla tespit edilmiştir (Kryczynski ve ark., 1988).

PSTVd nedeniyle domates bitkilerinde oluşan belirtiler uç yapraklarda epinasti ve kıvrılmalar şeklinde kendini göstermekte, bitkinin büyüme bölgesindeki küçük yaprakların sararması ve nekrozlar bunu izlemektedir. Hastalığın ilerlediği aşamalarda tüm bitki bodurlaşmakta, apikal yapraklar küçülüp, boğum araları kısalmakta ve orta yapraklardan itibaren geriye doğru ölümler oluşabilmektedir (Jones ve ark., 1991).

PSTVd'inin domates türüne ekonomik etkisi belgelenmemiştir ancak domates bitkilerinin ölümü ile sonuçlanan çıktılar kaydedilmiştir (Mumford ve ark, 2003).

PSTVd özellikle tohum üretiminde ve germplazm koleksiyonlarında sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Yaprak belirtilerinden ziyade yumrulara gelişen belirtiler önemli kayıplara neden olmaktadır. PSTVd'inin zayıf izolatlarının Saco varyetesinde % 17 – 24 oranlarında ürün kayıplarına neden olduğu, bu varyetede etmenin şiddetli ırkının ise % 65 oranında verim kaybı oluşturduğu bildirilmiştir (Salazar, 1989).

PSTVd son derece bulaşıcı bir hastalık etmeni olup, bazı farklı şekillerde taşınabilmektedir. Etmenin mekanik yollarla kolaylıkla taşınabildiği, bunun yanında tohum, yumru, polen ve yaprak bitleri ile meydana gelen çeşitli bazı taşınma şekilleri de bilinmektedir (Diener, 1987; Hull, 2002).

PSTVd'inin "Patates yaprak kıvrıcılık virüsü (PLRV)" ile enfekteli patates bitkilerinde, "Yeşil şeftali afidi (*Myzus persicae*)" ile taşınabildiği bildirilmiştir (Querci ve ark., 1997).

PSTVd'inin patates bitkilerinde bir jenerasyondan diğerine yayılmasına en fazla, enfekteli patates yumrularının aracılık ettiği saptanmıştır. Bunun yanında polen ve tohum ile de taşınabilmekte olan bu etmen, tohumdaki enfeksiyon yeteneğini yitirmeden uzun süre aktif kalabilmektedir (Timmermann ve ark., 2001).

PSTVd'inin tohumla taşınma durumunun bitkinin türüne ya da çeşidine, bitkinin ana veya baba hatlarının bulaşıklık durumuna ve etmenin ırkına göre değişebildiği bildirilmiştir (Salazar, 1989).

Ana ve baba tohum hatlarının PSTVd ile bulaşık olduğu bilinen domates bitkilerinde, yapılan melezlemeler sonucunda elde edilen tohumlardan yetiştirilen fidelerde % 11 oranında bulaşıklık tespit edilirken, sadece baba hattın bulaşık olması durumunda bu oranın % 9, sadece ana hattın bulaşık olması durumunda ise bu oranın % 6 olduğu yürütülen bir çalışma ile ortaya konulmuştur (Singh, 1970).

PSTVd etmeninin patates bitkilerinde % 10 – 100, domates bitkilerinde ise % 0.3 – 23 aralıklarında değişen oranlarda tohumla taşınabildiği belirtilmiştir (Spence, 2004).

Viroidlerle bulaşık materyallerin kompost şeklinde doğada çürürken, bu etmenlerin yok olmadığı durumu bilinmektedir. Yürütülen bazı çalışmalarda, PSTVd'inin bitkilerin kurumuş ya da nemli yapraklarında altı aya kadar aktif durumda kalabildiği belirtilmiştir. Ayrıca PSTVd etmeninin karanlık ya da aydınlık ortam fark etmeksizin alüminyum üzerinde, aydınlık ortamda ise cam üzerinde dört haftaya kadar aktif durumda kalabildiği saptanmıştır (Spence, 2004).

PSTVd, dünyada önemli bir hastalık olarak bildirilmiş ve tüm yetiştiricilik yapılan ülkelerde karantina listelerine alınmıştır. Kuzey Amerika ve Doğu Avrupa'da yapılan düzenli karantina testlemeleri ile, PSTVd'inin üretim alanlarında önemli derecede azaldığı bildirilmektedir (Mackie ve ark., 2009).

"Patates iğ yumru viroidi hastalığı" Türkiye'de de karantinaya tabi olup, etmenin toleransı sıfırdır. Ülkemizde patates tarımının yapıldığı bazı alanlarda, bu etmenin varlığı bildirilmiştir (Anonim, 2010).

PSTVD'den sonra viroid olarak bildirilmiş diğer bir bitki patojeni de, turunçgil ağaçlarında hastalık oluşturan *Citrus exocortis viroid* (CEVd) olup, etmen ilk olarak "Fawcett ve Klotz" tarafından 1948 yılında Kaliforniya'da tanımlanmış ve etmenin aşısı gözü ile taşındığı ortaya konulmuştur (Benton ve ark., 1949; 1950).

CEVd etmeninin Türkiye'deki varlığı ise, ilk olarak "Norman" (1963) ve "Moreira" (1965) tarafından bildirilmiştir. 1972 yılında ise "Semancik" ve "Weathers" tarafından, "viroid" olarak tanımlanmıştır (Gross ve ark., 1982).

CEVd (Turunçgil cüceleşme viroidi) tek iplikçikli, halkasal veya doğrusal formda, yaklaşık 105.000 dalton ağırlığında, RNA zincir uzunluğu 371 nükleotid olup; Rutaceae, Solanaceae, Compositae, Fabaceae, Brassicaceae, Apiaceae ve Vitaceae familyalarında hastalık oluşturmaktadır (Semancik ve Weathers, 1972; Rivera-Bustamente ve Semancik, 1986; Semancik, 1987; Roistacher ve ark., 1988).

Domates, fasulye (*Phaseolus vulgaris*), havuç (*Daucus carota*), şalgam (*Brassica rapa*), bakla (*Vicia faba*) ve bazı lale (*Tulipa* spp.) türlerinde doğal enfeksiyonlar gözlenebilmektedir (Fagoaga ve Duran-Vila, 1996).

CEVd'e duyarlı türlerin, üç yapraklı ve hibritlerini (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) anaç olarak kullanılan Rangpur laymı (*Citrus limonia*), bazı citronları ve limonları kapsadığı bildirilmiştir (Weathers ve Calavan, 1961).

CEVd'e duyarlı olmayan turunçgil ağaçlarında, herhangi bir semptom gelişmeksizin bodurlaşma görülebilmektedir. Çoğu ticari tür ve çeşitler etmene karşı tolerant olmasına rağmen, bu bitkiler duyarlı anaçlara aşılandığında hastalığın bir göstergesi olarak anaçta kabuk kavlamaları görülmektedir. CEVd üç yapraklı anacının toprak üzerinde kalan kısımlarında kabuk çatlamalarına, soyulmalara ve ağaç gelişmesini engelleyerek bodurluğa neden olmaktadır (Benton ve ark., 1949).

CEVd etmeni portakal (*Citrus sinensis*), greycitrus (*Citrus paradisi*), mandarin (*Citrus reticulata*) ve özellikle de turunç (*Citrus aurantium*) üzerinde herhangi bir semptom geliştirmeksizin latent halde bulunmaktadır. Turunç anacının bu patojeni semptomsuz olarak taşıması ve yaygın bir anaç olarak kullanılması nedeniyle, hastalığın turunçgil alanlarındaki mevcut gerçek dağılımı da bilinmemektedir. Ancak dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok bölgeden, bu etmenin yaygınlığıyla ilgili raporlar mevcuttur (Wallace, 1978; Duran-Vila ve ark., 1988).

Ülkemizde ise Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunç anacı üzerinde yetiştirilen turunçgil çeşitlerinde, semptom görülmemekle birlikte CEVd ile yoğun bulaşıklık saptanmıştır (Güllü, 1989; Önelge, 1994).

CEVd'inin farklı konukçularından elde edilmiş varyantları, dünyada yapılan bazı çalışmalarla belirlenmiştir. Ülkemizde Çukurova Bölgesi turunçgil ağaçlarından elde edilen CEVd izolatu, Etrog citron (*Citrus medica*) ve *Gynura aurantiaca* bitkilerine inokule edilerek, bu indikatör bitkilerde CEVd'inin 371 nükleotide sahip olduğu ve ayrıca da bu nükleotidlerin dizilimleri belirlenmiştir (Önelge, 1997).

CEVd etmeninin domates bitkilerinde doğal olarak hastalık oluşturduğu, bazı ülkelerden rapor edilmiştir. 1979 yılında Hindistan'da, domates bitkilerinde tepe kıvrıcıklığı ve tepe kabarıklığı olarak görülen hastalığın CEVd'inin bir ırkı olduğu belirlenmiş ve daha önceden "Indian bunchy top disease of tomato" olarak isimlendirilen hastalık, CEVd etmeninin domates bitkisindeki ırkı anlamına gelen CEVd-tomato/CEVd-t olarak adlandırılmıştır. Etmen "Indian bunchy top viroid" ismiyle de, CEVd-tomato etmeninin sinonimi olarak çeşitli kayıtlarda mevcuttur. (Gross ve ark., 1982; Mishra ve ark., 1991).

Araştırmacılar CEVd-t etmeninin domates bitkilerinde patojenik olmakla birlikte bilinen çoğu turunçgil çeşitlerinde ise patojenik olmadığını, bu duruma da CEVd-t etmenin nükleotid dizilimindeki bazı bazlarda meydana gelen varyasyonların sebep olduğunu belirtmişlerdir (Gross ve ark., 1982; Mishra ve ark., 1991).

CEVd etmeni, 1991 ve 2002 yıllarında ise Hollanda'da seralarda yetiştirilen domates bitkilerinde doğal salgınlara neden olmuş ve hastalık daha sonra kontrol altına alınmıştır (Verhoeven ve ark., 2004).

Tomato apical stunt viroid (TASVd), EPPO'nun alarm listesinde yer alan önemli bir domates hastalığıdır ve ilk olarak Fildişi Sahilleri'nde tanımlanmıştır (Walter ve ark., 1980).

TASVd etmeni, zaman zaman bazı EPPO Bölgeleri'nden bildirilmiştir. Örneğin; Avusturya'da yasemin (*Solanum jasminoides*), Almanya'da yasemin ve Mavi patates çalısı (*Lycianthes rantonnetii*), Finlandiya'da yasemin, İsrail'de domates, Hollanda'da domates ve bazı süs bitkilerinde bu etmen tespit edilmiştir (Verhoeven ve ark., 2008a; 2008b).

TASVd (Domates tepe bodurluk viroidi) etmeninin, domates bitkilerinde hastalık oluşturduğu Senegal ve Tunus'ta da bildirilmiştir (Verhoeven ve ark., 2006). Etmenin ayrıca Kudüs kirazı (*Solanum pseudocapsicum*), (Spieker ve ark., 1996), Ateş çalısı (*Streptosolen jamesonii*), (Verhoeven ve ark., 2010) ve bazı çeşitli *Brugmansia* türlerinde de (Olivier ve ark., 2011) varlığı saptanmıştır.

TASVd etmeni de PSTVd etmenine benzer olarak, önemli verim kayıpları oluşturmaktadır. Etmenle bulaşık bitkilerde, meyve kalitesi önemli ölçüde düşmekte ve meyvelerin depolama süresi de azalmaktadır. Bu durum, pazarlama açısından önemli sıkıntılara neden olmaktadır (Jones ve ark., 1991; Verhoeven ve ark., 2006).

TASVd etmeniyle enfekteli domates bitkilerinde bitki büyümesinin azaldığı, yapraklarda yoğun klorozların olduğu, kırılabilirliğin arttığı, meyve olgunlaşmasının geciktiği ve meyvelerde muhafaza süresinin üç haftadan bir haftaya kadar inebildiği bildirilmiştir (Verhoven ve ark., 2006).

TASVd etmeniyle enfekteli domates bitkilerinde boğum aralarında kısılma, yaprak deformasyonları ve sararma, meyve boyutlarında küçülme ve meyvelerde renk açılması şeklinde çeşitli belirtiler gözlenmektedir. Şiddetli enfeksiyonlardaki durumlarda ise % 100'e kadar ulaşabilen, bazı ağır verim kayıplarının oluşabildiği bildirilmiştir (Antignus ve ark., 2002; 2007).

TASVd etmeni özellikle de sera domatesi yetiştiriciliğinde, oldukça önemli bir patojendir. İsrail'deki çeşitli domates üretim alanlarında TASVd etmeni rapor edilmiş ve bu hastalığın sıralar boyunca elle, budama aletleriyle ve/veya bitkilerin birbirine temasıyla hızlıca yayıldığı belirtilmiştir (Antignus ve ark., 2002).

TASVd'inin, seralardaki domateslerde "Bombus arısı (*Bombus terrestris*)" tarafından taşınabildiği araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur (Antignus ve ark., 2007).

Hollanda'da da bazı domates üretim alanlarında, TASVd'inin önemli zararlar oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu etmenin, sıcak havalarda sera içinde daha hızlı yayıldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca şimdiye kadar sadece domates bitkilerinde belirlenen TASVd etmeninin, Solanaceae familyasında yer alan patates bitkilerinde de, PSTVd etmeninde olduğu gibi önemli zararlar oluşturma riskinin bulunduğunu belirtmişlerdir (Verhoeven ve ark., 2004; 2008b).

Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) etmeni de domates bitkilerinde hastalık oluşturan önemli bir patojen olmakla birlikte, TCDVd'inin konukçu dizisi, epidemiyolojisi, konukçu-patojen ilişkisi ve moleküler yapısı hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu etmenin sekans dizilimi ise PSTVd etmeni ile, % 86 – 88 oranında benzerlik göstermektedir (Singh ve ark., 1999).

TCDVd (Domates klorotik cüceleşme viroidi) etmeninin konukçuları başta domates, patates ve bazı Solanaceae familyası süs bitkileridir. Ayrıca *Nicandra physaloides*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana glutinosa*, *Physalis angulata*, *Physalis floridana*, *Scopolia sinensis* ve *Solanum demissum* bitkilerinin, TCDVd etmenine karşı hassas olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark., 2003).

Yapılan bazı deneysel çalışmalarla, TCDVd'inin mekanik olarak ve tohumla taşındığı belirlenmiştir. TCDVd etmeni yüksek sıcaklıklarda daha aktif davranış gösterdiğinden, bu etmenin taşınma oranı da sıcak iklim koşullarında daha yüksek oranda olmaktadır (Singh ve ark., 2003).

TCDVd ile enfekteli bitkilerde, erken dönemlerde uç yapraklarda sararmalar ve klorozlar ile birlikte gelişme geriliği görülürken, hastalığın ileri dönemlerinde bitkiler bodurlaşmakta, klorozlar artmakta ve klorozların rengi mora dönüşmektedir. Bu etmen ile yoğun olarak bulaşık domates bitkilerinde, meyvelerin küçük ve çatlak olarak oluştuğu, bu durumun da pazarlama açısından olumsuz sonuçlar doğurduğu görülmüştür. Etmenin şiddetli ırkları ile bulaşık bitkilerde ise ölüm görülebilmektedir (Singh ve ark., 2003).

TCDVd etmeninin, Avrupa'da hem serada hem de açık alanda yetiştiriciliği yapılan bazı domates bitkilerinde enfeksiyon yaptığı görülmüştür. Etmen ilk olarak, 1996 yılında Kanada'nın Manitoba eyaletinde bir domates serasında görülmüştür (Singh ve ark., 1999).

TCDVd etmeni, 2006 yılında Fransa ve 2007 yılında da ABD'nin Arizona eyaletinde bulunan domates seralarında salgınlar yapmıştır. Etmenin süs bitkilerinde bulunması durumu ile ilgili, Hollanda ve Japonya'dan bazı raporlar bildirilmiştir. Bu etmen, Solanaceae familyasından Petunya (*Petunia* spp.) türleri ve Verbenaceae familyasından Yer minesini (*Verbena* spp.) gibi türlerde görülmüş, ancak bu bitkilerde gözle görülür bir semptom oluşumu gerçekleşmemiştir (Verhoeven, 2010).

Viroidlerin çeşitliliğindeki en etkin mekanizma, RNA sarmalında yer alan merkezi korunaklı bölgedir. Bu bölgedeki nükleotidlerin sıralanış şekli, viroidlerde hem çeşitliliğin ve sistematığın oluşmasında hem de bu viroidlerin tanınmasında önemli rol oynamaktadır (Gora-Sochacka, 2004).

Viroidlerin yayılmasının önlenmesinde alınan bazı kültürel ve sanitasyon önlemlerinin yanı sıra, etmenlerin bitkide teşhis ve tanınmasına yönelik çalışmalar da çok büyük önem taşımaktadır. Viroidlerin oluşturdukları hastalıklarda öncelikle etmeni her yönü ile tanımak, ırklarını ve konukçu dizinini belirlemek ve hızlı tanı teknikleriyle etmeni saptamak kontrol açısından önemlidir (Flores ve ark., 2004).

Viroidler RNA moleküllerinden oluştukları ve protein kılıf içermedikleri için bu etmenlerin tanınmalarında, serolojik yöntemler kullanılamamaktadır. Elektron mikroskobu denemelerinin viroidlerin rutin olarak tanısında çok fazla oranda başarılı olmadığı da, yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Riesner ve Gross, 1985).

Günümüzde viroidlerin tanınmasında poliakrilamid jel elektroforez analizi tekniği (PAGE), (Faggioli ve ark., 1997), radyoaktif ve radyoaktif olmayan problemlerle nokta blot hibridizasyonu (Shamloul ve ark., 1995; Kyriakopoulou ve ark., 2001) ve doku blotlama hibridizasyonu (Mandic ve ark., 2008) gibi bazı çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca bazı spesifik primer dizinlerinin kullanılarak yürütüldüğü RT-PCR analizleri de, güvenilir sonuçlar vermektedir (Shamloul ve ark., 1995; Loreti ve ark., 1999; Ragozzino ve ark., 2004).

Özellikle poliakrilamid jel elektroforez analizi (PAGE) ve hibridizasyon teknikleriyle, daha doğru ve detaylı bir şekilde viroid testlemeleri yapılabilmektedir (Riesner ve Gross, 1985; Semancik, 1987).

PAGE tekniği ve hibridizasyon teknikleri birbirlerini tamamlayacak şekilde, viroidlerin tanınmasında etkin bir şekilde kullanılabilmektedir (Semancik, 1987).

Hibridizasyon tekniklerinin kullanılarak viroidlerin teşhisinin oldukça duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu, fakat cDNA problemlerinin hazırlanması ve radyoaktif materyalin kullanılması için bazı özel laboratuvar, laboratuvar gereçleri ile birlikte bu konuda deneyimli teknik personellerin bulunmasının gerekli olduğu bildirilmiştir (Schumacher ve ark., 1983).

PAGE analizleri yıllardan beri viroidlerin tanılanmasında, anahtar bir rol oynamıştır. Diener (1971) ile Semancik ve Weathers (1972), PSTVd ve CEVd etmenlerinin moleküler ağırlıklarının virüslerden daha küçük olduğunu göstermek amacı ile, sukroz densiti gradient santrifüjlemesi ve poliakrilamid jel elektroforez analizi kombinasyonunu birlikte kullanmışlardır.

PAGE yöntemiyle enfekteli bitki dokularından kısmi olarak nükleik asitlerin ekstrakte edilmesi ve jel elektroforezde viroidlerin doğrusal ve halkasal formlarının ayırt edilmesinin, ancak 8 saate yakın bir sürede tamamlanabileceği rapor edilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

Sano ve arkadaşları (1984), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) etmenlerini PAGE yöntemini kullanarak birlikte analiz etmişlerdir. Deneme şartlarında jel üzerindeki HSVd'e ait bantların CPFVd'inin bantlarından daha hızlı şekilde yer değiştirdiği gözlenirken, PSTVd'inin bantlarının ise diğerlerinden daha yavaş hareket ettiği gözlemlenmiştir.

Elektroforez terimi genellikle elektrik yüklü bir alan etkisi altında, belirli bir solüsyon içindeki küçük iyonların ve yüklü makro moleküllerin hareket ettirilmesini ifade etmektedir. Bu prensipten yararlanılarak RNA'ların belirli bir büyüklükte ayrımı, uygun bir delik büyüklüğü içindeki jelde başarılmaktadır. Elektroforez tekniği ile RNA'ların başarılı bir şekilde ayrımı, ilk olarak 1960 yıllarının ortalarında başarılmış ve günümüzde de rutin olarak kullanılmaktadır (Giersen, 1982).

Elektroforez işleminin tüpler veya belirli boydaki plaka jeller içinde gerçekleştirilebildiği, ayrıca agar ve poliakrilamid olmak üzere farklı bazı jel materyallerinin kullanılabileceği de bildirilmiştir (Giersen, 1982).

Elektroforezi takiben viroidlerin elektroforez tamponundaki 0.5 mg/ml etidyum bromür (Sambrook ve ark., 1989), su ile % 0,05 oranında seyreltilmiş toluidin mavisi (Palukaitis ve Symons, 1980) ya da gümüş nitrat (AgNO_3) (Sammons ve ark., 1981; Igloi, 1983) ile boyanarak görüntülenebildiği belirtilmiştir.

Günümüzde birçok araştırmacı gümüş nitrat (AgNO_3) yönteminin etidyum bromür yöntemine göre çok daha duyarlı olduğunu bildirmiş, fakat bu yöntem ile yapılan boyamanın viroidleri inaktif duruma getirebileceğini de belirtmişlerdir (Semancik, 1987; Duran-Vila ve ark., 1988).

Viroidlerin tanısında kullanılan metotlardan biri de, indikatör bitkilerin yer aldığı “biyolojik indeksleme” yöntemidir. İndikatör bitki kullanımı daha çok, belirtilerini kısa sürede gösterebilen ve konukçusu fazla olan bazı viroidler için kullanılmaktadır. Bu yöntemde sera veya tarla bitkilerinde yapılan denemeler hem uzun periyoda yayılmakta hem de maliyeti çok yüksek rakamları bulduğu için, viroid tanılamalarında çok sık kullanılan bir yöntem değildir. Ayrıca indikatör bitkilerde bazen birden fazla viroidin bir araya gelerek veya çevre koşulları ile viroidin etki mekanizması etkilenecek, farklı belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Ancak “biyolojik indeksleme” prosedürlerinin; duyarlı türlerde aşı inokulasyonu sonrası gelişen belirtileri inceleme esasına dayandığı, duyarlı bir indeksleme prosedürü olduğu, halen aşı ile taşınan patojenlerin tanısı ve karakterizasyonunda zorunlu bir deneme olduğu bildirilmiştir (D’Onghia ve ark, 2007).

Viroid enfeksiyonlarının deneysel olarak bazı konukçu bitkilere transferi, özellikle biyokimyasal çalışmalar açısından da önemlidir. Birçok durumda, yapay konukçuların kontrollü koşullarda daha hızlı büyümekte olduğu ve bunların dokularının viroid izolasyonunun yapılmasında kolaylık sağladığı bildirilmektedir (Semancik ve Duran-Vila, 1991).

Datura stramonium, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa* bitkileri genel olarak Solanaceae familyasında zarar yapan viroidler için, biyolojik indekslemede kullanılan indikatör bitkilerdendir (Hadidi ve ark., 2003).

Ayrıca *Gynura aurantiaca*, *Citrus medica*, *Lycopersicon esculentum*, *Chrysanthemum morifolium*, *Petunia hybrida* ve *Solanum melongena* gibi türler CEVd’inin tanısında kullanılan bazı indikatör bitkilerdir (Duran-Vila ve ark, 1988).

Grasmich ve Slack (1985), PSTVd etmeninin tanısı için domates ve patates bitkilerini indikatör bitkiler olarak kullanmış ve bu bitkilerde PSTVd’e ait çeşitli belirtileri gözlemlemiştir.

Shuyuan ve arkadaşları (1996), “*in vitro* callus culture” tekniği ile CEVd’ini kısa sürede tanılamışlardır. Bu yöntemde, *Citrus medica* kallusları şiddetli ve zayıf CEVd izolatları ile bulaştırılmış ve şiddetli izolatların kullanıldığı kallusların 10 gün içinde, zayıf izolatların kullanıldığı kallusların ise 15 gün içinde kahverengileştiği saptanmıştır.

Nükleik asit dizilimlerinin çoğaltılması temeline dayanan RT-PCR tekniği, oldukça duyarlı bir yöntem olarak bitki viroidlerinin teşhisinde gittikçe artan bir yaygınlıkta kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde farklı nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerine dayanan RT-PCR testleri ile, viroidlerin tanılanmaları yapılmaktadır (Sipahioğlu ve ark., 2006).

Bitki viroidlerinin tanısında “PCR” yönteminin kullanılabileceği, ilk olarak 1990 yılında rapor edilmiştir. Ayrıca bitki viroidlerinin PCR ile tanılanmasında, PCR amplifikasyonundan önce bir “ters transkripsiyon” adımı uygulanmasının gerektiği de bildirilmiştir. Bu adımda ise “reverse transcriptase” enzimi ile hedef RNA’ların, cDNA’lara dönüştürülmesinin gerekliliği rapor edilmiştir. Tüm viroid genomlarının PCR ile amplifikasyonu; monokotiledon ve dikotiledon bazı bitki varyetelerinden, odunsu veya odunlaşmış materyalleri de içeren örneklerde başarıyla yürütülebilmektedir (Hadidi ve ark., 1992; Wan Chow Wah ve Symons, 1997).

Hadidi ve Yang (1990), RT-PCR tekniğini viroidlerin tanılanmasında kullanmış ve bu tekniğin cDNA problemleri kullanılarak yürütülen hibridizasyondan 10 – 100 defa, PAGE yöntemlerinden ise 2500 kat daha hassas olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar ayrıca, enfekteli dokulardan ekstrakte edilen toplam 1 – 100 µg RNA miktarındaki viroidlerin bile RT-PCR tekniğiyle saptanabileceğini kanıtlamışlardır.

RT-PCR testleri sayesinde elde edilen sonuçların doğruluk ve netlikleri, bu çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanan nükleik asit ekstraksiyonlarının kalite ve kantitesine bağlıdır. RT-PCR’da kullanılan nükleik asitlerin, olabildiğince saf olmaları gerekmektedir. Ayrıca “reverse transcriptase” enziminin aşırı duyarlılığı, amplifikasyon reaksiyonlarında yer alan maddelerin engelleyici veya düzenleyici özelliklerinin ortaya çıkmasında büyük bir önem taşımaktadır (Wilde ve ark., 1990).

İyi kalitede viroid RNA’sı ekstrakte edilebilmeye başlandığından beri, bitkilerde bulunan viroid etmenleri üzerinde yapılan moleküler biyolojik çalışmalar da, doğru orantılı olarak açıklık kazanmaya başlamıştır. Ayrıca son zamanlarda bitkisel nükleik asit materyallerini uzun süre saklayabilme konusunda yapılan çalışmalar sayesinde de, bitkisel “DNA” ve “RNA” materyalleri RT-PCR analizlerinde kullanılabilmek amacı ile, daha uzun sürelerde saklanabilmektedir (Sipahioğlu ve ark., 2006).

2.2. Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Dünyada Yapılan Bazı Moleküler Çalışmalar

Hollanda’da 2004 yılında, PSTVd, CEVd, TCDVd ve CLVd etmenleri ile doğal olarak enfektelenmiş domates bitkilerinde, bu etmenlerin belirlenmesi için Verhoeven ve arkadaşları tarafından bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmada PSTVd, CEVd ve TCDVd etmenlerinin belirlenmesi için Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE yarı-evrensel primer çiftleri ile, CLVd etmeninin belirlenebilmesi için de bir adet CLVd’e spesifik primer çifti kullanılmıştır (Verhoeven ve ark., 2004).

Rusya’da 2006 yılında, PSTVd izolatlarının çeşitliliğini araştırmak amacıyla başlatılan bir projede, ülkenin farklı bölgelerinden 15 yıl boyunca toplanılmış olan 39 farklı PSTVd izolatı karakterize edilmiş ve sekans analizi çalışmaları sonucunda da, mevcut bu izolatların oldukça düşük bir sekans çeşitliliği gösterdiği belirtilmiştir (Owens ve ark., 2009).

Hollanda’da 2006 yılında, süs bitkilerindeki viroidlerin durumunu araştırmak amacıyla yürütülen sörvey çalışmaları kapsamında, 31 fidan üretim tesisinden çoğu Gesneriaceae ve Solanaceae familyalarına ait bazı bitkilerden 62 adet genç yaprak örneği alınmıştır. *Pospiviroid* cinsi viroidleri belirlemede kullanılan yarı-evrensel primerler Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE (Verhoeven ve ark., 2004) ile yürütülen RT-PCR çalışması sonucu pozitif bulunan örnekler, daha sonra spesifik primerler ile belirlenmiştir. PSTVd etmeni için 3H1/2H1 (Shamloul ve ark., 1997), CEVd etmeni için de CEVd-FW/RE (Önelge, 1997) primer çiftleri kullanılarak kesin sonuçlar bildirilmiştir. Başlangıçta süs bitkilerinin hiçbirinde semptom gözlemlenmediği halde RT-PCR çalışması sonucu, çoğu örnek bulaşık olarak saptanmıştır. CEVd etmeni *Verbena* türlerinde, PSTVd etmeni *Brugmansia suaveolens*, *S. jasminoides*’de, TASVd etmeni ise *Cestrum* türlerinde bildirilmiştir. Çalışma ile elde edilen izolatlar, NCBI veri tabanına (NCBI Erişim Numaraları: EF192396.1, EF192394.1, EF192393.1, EF192395.1) kaydettirilmiştir. Belirlenen viroidlerin bu süs bitkilerinde semptom göstermeden bulunması durumunun da, viroid etmenlerinin ana konukçuları açısından inokulum kaynağı olabileceğini göstermiştir (Verhoeven ve ark., 2008b).

Belçika’da 2006 ve 2007 yıllarında yürütülen bazı sürveyler kapsamında, Solanaceae familyasına bağılı süs bitkilerinden *Brugmansia* türleri ve *S. jasminoides* bitkilerinden alınan örneklerin testlenmesi sonucunda, testlenen bu örneklerin % 28’i PSTVd etmeni açısından bulaşık bulunmuştur. Bunlardan *Brugmansia* türlerinin bazı Avrupa ülkelerinden ithal edildiğı, *S. jasminoides* bitkilerinin ise bir kısmının ithalatla, bir kısmının da Belçika’da yetiştirilerek elde edildiğı bildirilmiştir. Ayrıca 2008 yılında PSTVd etmeninin yetiştirilen bazı domates bitkilerinde de, doğal olarak hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Michelante ve ark., 2009).

Fransa’da 2007 yılında, bir serada yetiştirilen ‘‘Santa’’ domates çeşidinde virüs benzeri simptomlar görölmüş ve bitkinin yaprak ile meyvelerinden teşhis amacıyla bazı örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin bölgede yaygın görölen virüs hastalıklarına karşı testlenmesi sonucu, negatif çıktılar elde edilmiştir. Bu sonuçları takiben de etmenin viroid kaynaklı olduğı düşünölerek bodurlaşma, yapraklarında şiddetli sararma ve yaprak yapısının bozulması simptomları görölen domates bitkileri önce PSTVd ve daha sonra *Pospiviroid* cinsi viroid etmenleri için RT–PCR yöntemi kullanılarak taranmıştır. Çalışmada PSTVd için yarı-spesifik PSTVd-h/c primeri (Shamloul ve ark., 1997), *Pospiviroid* cinsi etmenler için evrensel Vir-1/2 (Mumford ve ark., 2000) ve yarı-evrensel Vid-FW/RE (Verhoeven ve ark., 2004) primer setleri kullanılmıştır. CLVd etmeninin evrensel Vir-1/2 primer çifti ile tespit edilememesi sebebiyle CLVd etmeni için, bu etmene spesifik pCLVF4 /pCLVR4 (Spieker, 1996) primer seti kullanılmıştır. Sonuç olarak, domates bitkilerinin CLVd etmeni açısından bulaşık olduğı saptanmış ve yürütölen BLAST analizleri çalışmalarında da, etmenin daha önce İngiltere’de domates bitkilerinde saptanan CLVd izolatu (NCBI: FJ394070.1) ile % 99.1 sekans benzerliğı gösterdiği ortaya konulmuştur (Nixon ve ark., 2010).

Fransa’nın Bretonya Bölgesi’nde 2007 yılında, bir serada bulunan domates bitkilerinin % 20 – 25’inin yapraklarında epinasti ve yaprak kıvrılması simptomları görölmüş ve yürütölen RT–PCR çalışmaları sonucunda, mevcut hastalık patojeninin TCDVd etmeni olduğı tespit edilmiştir. Daha sonra bu çeşidin elde edildiğı aynı hat, yaklaşık olarak 2500 adet domates tohumunu içerecek şekilde, onlu gruplar halinde tekrar ekilmiş ve TCDVd etmeni açısından aynı yöntemle bir kez daha testlenmiştir.

Sonuç olarak, 250 grup içinde iki örnek TCDVd etmeniyle bulaşık bulunmuş ve bu çalışma ile de tohumla taşınmanın gerçekleşebileceği ortaya konulmuştur. Bu durum ise mevcut salgın kaynağının, tohum kaynaklı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca Fransa’da elde edilen bu TCDVd izolatının Kanada’dan bildirilen izolat ile benzer olduğu da, sekans analizleri sonucu saptanmıştır (Candresse ve ark., 2010).

Çek Cumhuriyeti’nde 2007 ile 2009 yılları arasında, Solanaceae familyası süs bitkilerindeki PSTVd etmenini belirlemek amacıyla yürütülen bir çalışmada 74 bölgeden 600’ün üzerinde alınan örnekler testlenerek, 22 bölgenin bu etmenle bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Bulaşıklık tespit edilen bu 22 bölgenin hepsinde *Solanum jasminoides* bitkileri PSTVd açısından bulaşık bulunurken, üç bölgede *Brugmansia* türleri, bir bölgede *Petunia hybrida* bitkileri ve bir bölgede de *Solanum muricatum* bitkileri PSTVd etmeni ile bulaşık bulunmuştur (Mertelik ve ark., 2009).

Japonya’da 2008 yılında, ‘‘Tarım, Orman Ve Balıkçılık Bakanlığı Bitki Koruma İstasyonu’’ birimleri Fukuşima Bölgesi’nde bulunan Iwaki şehrindeki bir firmaya ait serada, kaya yünü kültürü ile yetiştirilen domates bitkilerinde PSTVd etmenini tespit etmişlerdir. Yapraklarında mora çalan renk değişimleri ve kıvrılma belirtileri gösteren bitkilerden alınan 12 örnekten üç tanesi, yürütülen RT–PCR çalışmaları sonucunda bulaşık bulunmuştur. Çalışmada PSTVd ile bulaşık domates bitkilerinin tohumlarının ithal olarak elde edilmiş olması, domatesin yetiştirildiği serada PSTVd etmenine konukçuluk yapabilecek başka bir kültür bitkisinin bulunmaması ve seranın düzenli olarak zararlı etmenler açısından kontrol ediliyor olması, bu PSTVd salgının tohum kaynaklı olabileceği konusunda bazı şüpheler oluşturmuştur (Matsushita, 2010).

Hollanda’da 2008 yılında, İsrail’den ana üretim materyali olarak ithal edilen *Streptosolen jamesonii* bitkilerinin Hollanda’ya giriş yapmadan önce PSTVd etmenine karşı testlenmesi sonucu, bu bitkilerin PSTVd etmenini simptomsuz olarak taşıdığı belirlenmiş ve bu bitkilerden elde edilen PSTVd izolatı, NCBI veri tabanına (NCBI: EF580923.1) kaydedilmiştir (Verhoeven ve ark., 2008c).

Meksika’nın Meksiko şehrinde 2008 ve 2009 yıllarında, domates yetiştirilen bir seradaki bitkilerde genel bodurluk, yapraklarda daha sonradan rengi mor veya bronz dönen klorozlar ile bazı meyve boyutlarında küçülme belirtileri görülmüştür.

Hastalık başlangıçta 5 hektarlık alanla sınırlı iken, yaz ayı boyunca ikinci 5 hektarlık alana da hızlıca yayılmıştır. 2008 yılı sonunda hastalık yaklaşık olarak % 5 bulaşıklık oranıyla, toplam 35 hektarlık alana yayılmıştır. 2008 ve 2009 yılları itibari ile bulaşık alanlardan yapılan bazı sürveyler sonucunda, testlenen örneklerde TCDVd ve MPVd etmenleri ile karışık enfeksiyonlar gözlemlenmiştir. Ayrıca Meksiko şehrinden elde edilmiş olan TCDVd izolatının, Arizona (ABD) eyaletinden bildirilen TCDVd izolatıyla % 99 oranında sekans benzerliği gösterdiği de saptanmıştır. Bu benzerlik Meksika'dan elde edilen TCDVd izolatı ile ABD'deki TCDVd izolatının ortak kökenli olduğunu ortaya koyarken, bu iki ülke arasındaki olası taşınımın ise domates tohumları ile gerçekleşmiş olduğu hipotezini doğurmuştur (Ling ve ark., 2009).

Yunanistan'da 2009 yılında yürütülen bir sürvey çalışmasında, ülkenin farklı bölgelerinde süs bitkileri üretimi gerçekleştirilen 21 ticari fidanlıktan bazı örnekler alınmıştır. Toplamda alınan bu 391 örneğin 315'i *Solanum jasminoides* bitkilerine ve 76 tanesi de *Brugmansia* türlerine ait olmakla birlikte, bu bitkilerde herhangi bir semptom oluşumu gözlemlenmemiştir. RT-PCR çalışmalarında PSTVd-FW/RE (Kalantidis ve ark., 2007) ile PSTVd-32/33 (Di-Serio, 2007) primer setleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, 315 *Solanum jasminoides* örneğinin ikisinde ve 76 adet *Brugmansia* türlerinin de dördünde olmak üzere, PSTVd etmeni ile bulaşıklık saptanmıştır. Çalışmada ayrıca, elde edilen amplikonların yaklaşık olarak 360 baz çifti içerdiği belirlenmiştir (Malandraki ve ark., 2010).

Avusturya'da 2009 yılında, ticari bir fidanlıktan PSTVd etmenine karşı rutin testlemeler yapmak amacıyla alınan 30 adet semptomsuz *Solanum jasminoides* bitkisi örneklerinde, CEVd etmeninin varlığı tespit edilmiştir. Yürütülen bazı sekans analizi çalışmaları sonucunda, CEVd etmeninin daha önce *Solanum jasminoides* bitkilerinde bildirilen (NCBI: AM920649.1, AM774357.1) izolatlarla, % 97'ye yakın bir oranda sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Gottsberger ve Suarez-Mahecha, 2010).

Avusturya'da 2010 yılında, "Ulusal Bitki Koruma Organizasyonu" birimleri Oberösterreich eyaletinde yürüttükleri bazı sürveyler sonucunda, TASVd etmenini *Solanum jasminoides* bitkilerinde semptomsuz olarak tespit etmiş ayrıca bu durumu da EPPO birimlerine bildirmiştir (Anonymous, 2011a).

İtalya’da 2010 yılında, ‘‘Ulusal Bitki Koruma Organizasyonu’’ birimleri tarafından Lazio Bölgesi Latina şehrinde yürütülen ve ticari olarak süs bitkileri yetiştiriciliği yapılan çeşitli fidanlıklarda, genel *Pospiviroid* taraması çalışmalarını kapsayan sörveylerle *Cestrum* türlerini içeren süs bitkilerinden 25 örnek alınmıştır. Di-Serio’nun dizayn ettiği primer çifti kullanılarak yapılan RT–PCR çalışmalarında, toplanan 25 örnekten 22 tanesinin PSTVd etmeni ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. PSTVd ile bulaşıklığı belirlenen *Cestrum* türlerinden; *C. auricantum*, *C. rubrum*, *C. cultum*, *C. endlicheri* ve *C. nocturnum*’da PSTVd etmeninin symptomsuz olarak bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen bu PSTVd izolatları (NCBI: HQ452399.1, HQ452416.1) NCBI veri tabanına kaydedilerek, izolatlara ait sekans dizilimleri incelenmiş ve daha önce bildirilen PSTVd izolatıyla (NCBI: NC002030.1) % 94 – 98 değişen oranlarında sekans benzerliği gösterdikleri saptanmıştır. Çalışma sonucunda, *Cestrum* türlerinden elde edilen PSTVd izolatlarının daha önce bildirilen bazı diğer PSTVd izolatlarından farklı olduğu, mevcut sekans dizilimleri incelendiğinde ise, bu izolatların nükleotidinin 320. sekansına ‘‘C’’ (sitozin) bazının eklenmiş olduğu bildirilmiştir. Ayrıca testlenen tüm *Cestrum* türlerinden sadece *C. auricantum*’da CEVd etmeni ile bulaşıklık saptanmış ve NCBI veri tabanına (NCBI: HQ452417.1) kaydedilmiştir. Yürütülen sekans analizi çalışmaları sonucunda, *C. auricantum*’dan elde edilmiş olan CEVd izolatının daha önceden bildirilen PSTVd izolatıyla (NCBI: NC001464.1) % 95 oranında sekans benzerliğine sahip olduğu görülmüştür (Luigi ve ark., 2011).

Japonya’nın Hiroşima şehrinde 2010 yılında, yapraklarında kloroz ve genel bodurlaşma belirtileri görülen bazı sanayi domatesi çeşitlerinde yapılan çalışmalar sonucu, TCDVd etmeninin varlığı tespit edilmiştir. Sekans analizleri sonucunda ise TCDVd etmeninin daha önce Kanada’dan rapor edilen bir izolat ile, % 98 oranında sekans benzerliği gösterdiği bildirilmiştir. Etmenin bazı konukçularını ve çeşitli bazı fiziksel özelliklerini belirlemek amacıyla yürütülen sonraki çalışmalarda da, TCDVd etmeniyle mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılan Compositae ve Solanaceae familyalarına dahil bazı bitki türleri, sistemik bazı konukçular olarak belirlenmiştir (Matsushita, 2011).

Slovenya’da 2010 yılında, PSTVd etmeninin farklı türlerdeki konukçularının belirlenmesi amacıyla yürütülen bir çalışma kapsamında, ülkenin 22 farklı üretim alanından *Petunia* türlerine ait olmak üzere simptom göstermeyen 30 farklı yaprak örneği alınmıştır. Yürütülen RT–PCR çalışmaları sonucunda da, testlenen bitkilerden ikisi TCDVd etmeni ile bulaşık bulunmuştur. TCDVd etmeninin *Petunia* türlerinde simptomsuz olarak bulunmasına rağmen domates ve patates bitkilerine potansiyel inolum kaynağı oluşturması açısından, bu bitkiler bulaşık alanlardan uzaklaştırılıp imha edilmiş ve gerekli sanitasyon önlemleri de alınmıştır (Virsecsek ve Plesko, 2010).

Japonya’da 2010 yılında, Tsutsumi ve arkadaşları PSTVd etmeninin belirlenmesinde kullanılan RT–PCR yönteminin yerine, hızlı ve yüksek seçiciliğe sahip olan RT–LAMP yöntemini (Reverse Transcription–Loop Mediated Isothermal Amplification) kullanmışlardır. Araştırmacılar domates (yaprak, tohum) ve patatesten (yaprak, yumru, gerçek tohum) nükleik asit ekstraksiyonundan yaklaşık 60 dakika sonra, RT–LAMP ile PSTVd’i spesifik olarak belirleyebildiklerini ve hassasiyetin ise RT–PCR metodundan yaklaşık olarak 10 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Tsutsumi ve ark., 2010).

Slovenya’da 2010 ve 2011 yıllarında yürütülen bazı çalışmalarda, simptom oluşumu gözlemlenemeyen 14 adet *Solanum jasminoides* bitkisinde, yarı-evrensel Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE (Verhoeven ve ark., 2004) kullanılarak, RT–PCR yöntemiyle üç örnekte CEVd’in, yedi örnekte ise TASVd’in varlığı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, CEVd ile bulaşıklığı tespit edilen *Solanum jasmionides* bitkilerinin ana üretim materyallerinin Hollanda’dan ithalat yoluyla elde edildiği bildirilmiştir (Virsecsek ve Plesko, 2012).

Batı Afrika ülkelerinden Gana ve Mali’de 2011 yılında, domates bitkilerinde virüs benzeri simptomların görülmesi ile başlayan arazi örneklemeleri sonucunda, toplanan hastalıklı domates bitkilerinin CLVd ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen CLVd izolatlarının, daha önce Hollanda’dan bildirilen bir izolatla % 99 oranında sekans benzerliği gösterdiği de belirtilmiştir. Bulunan izolatlarla yürütülen bazı konukçu dizisi çalışmalarında da; *Capsicum annuum*, *Nicotiana benthamiana* ve *Nicotiana tabacum* bitkilerinin, CLVd etmenini simptomsuz olarak taşıdığı belirlenmiştir (Gilbertson ve Batuman, 2012).

EPPO birimleri tarafından 2011 yılında yürütülen bir çalışmada, Yeşil şeftali afidi (*Myzus persicae*), Bombus arısı (*Bombus terrestris*) ve *Macrolophus pygmaeus* zararlılarının, viroidleri taşımasındaki mevcut vektörel kapasiteleri araştırılmıştır. Yürütülen deneysel enfektivite çalışmaları ve RT-PCR testlemeleri sonucunda, *Macrolophus pygmaeus* bireylerinin viroid etmenlerini taşımasında aktif bir rolü gözlenemezken, *Myzus persicae* ve *Bombus terrestris* bireylerinin viroid etmenlerini taşımada vektörel bir kapasiteye sahip oldukları tespit edilmiştir. EPPO birimleri, *Pospiviroid* cinsi bazı viroid etmenlerinin domates bitkilerinin tohumlarında taşınma durumu ile ilgili de bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmada ise, domates bitkileri TASVd, CEVd, CLVd ve PSTVd etmenleri ile mekanik olarak bulaştırıldıktan sonra, bitkilerin meyvelerinden alınan tohumların da viroid etmenleriyle enfekteli olduğu saptanmış ancak bu tohumların ekilmesiyle elde edilen fidelerin hiçbirinde araştırılan viroid etmenleri açısından bir bulaşıklık saptanamamıştır (Anonymous, 2011b).

ABD'nin Kuzey Karolina eyaletinde 2012 yılında, bir domates serasındaki bitkilerde bodurluk, yapraklarda kloroz ve meyve boyutlarında küçülmeler ile dikkat çeken bazı belirtiler görülmüştür. Virüs hastalıklarına karşı ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenen bu bitkiler virüs etmenleri açısından bulaşık bulunamayınca, *Pospiviroid* cinsi viroidlere karşı testlenmiş ve PSTVd etmeni açısından bulaşıklık saptanmıştır. Elde edilen PSTVd izolatının, farklı bölgelerden bildirilen izolatlarla % 96 – 97 oranında sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Ling ve ark., 2012).

2.3. Domates Bitkilerinde Görülen Viroidlerle İlgili Türkiye’de Yapılan Bazı Moleküler Çalışmalar

Önelge'nin 1994 yılında yürüttüğü çalışmalarda, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunç anacı üzerinde yetiştirilen bazı turunçgil çeşitlerinde, belirtiler görülmemekle birlikte CEVd etmeni ile yoğun bulaşıklık saptanmıştır (Önelge, 1994).

Önelge'nin 1997 yılında yürüttüğü çalışmalarda, Çukurova Bölgesi'ndeki bazı turunçgil ağaçlarından elde edilen CEVd izolatı, Etrog citron (*Citrus medica*) ve *Gynura aurantiaca* bitkilerine inokule edilerek, bu bitkilerde CEVd etmeninin 371 nükleotide sahip olduğu ve ayrıca da bu nükleotidlerin dizilimleri belirlenmiştir.

Çalışmada ayrıca Çukurova Bölgesi'nden elde edilen CEVd izolatıyla, daha önceden Kaliforniya eyaletinden (ABD) bildirilen CEVd izolatu karşılaştırılmıştır. Yürütülen sekans analizi çalışmaları sonucunda ise karşılaştırılan bu iki izolatu nükleotid dizilimlerinde bazı farklılıkların olduğu saptanmış, bu durumun da CEVd etmeninin patojenite özelliklerinde bazı farklı değişikliklere sebep olabileceği belirtilmiştir (Önelge, 1997).

Önelge ve Bozan 2005 yılında, Adana ve Nevşehir illerindeki patates dikim alanlarında, PSTVd etmeninin yaygınlığını araştırmak amacıyla bir sörvey çalışması yürütmüştür. Bu çalışmada toplam 1695 dönümlük patates dikim alanı taranarak, başta Van Gogh, Morfena, Felsina, Satina ve Konsul çeşitleri olmak üzere 37.000 adet patates yumrusu incelenmiştir. Bu yumrulardan 680 tanesinin ise makroskopik olarak, PSTVd etmeni simptomlarını sergilediği bildirilmiştir. Yürütülen laboratuvar çalışmaları ve sPAGE analizleri sonucunda PSTVd etmeninin varlığı belirlenerek, incelenen bu örneklerdeki toplam bulaşıklık oranı da % 1.8 olarak bildirilmiştir (Önelge ve Bozan, 2005).

Bostan ve arkadaşları, 2006 ile 2009 yılları arasında başta patates, domates ve bazı süs bitkilerindeki *Pospiviroid* cinsine ait viroid etmenlerinin araştırılması amacı ile, bir sörvey çalışması yürütmüştür. Erzurum'daki çeşitli marketlerden ve arazilerden toplanmakla birlikte patates bitkilerine ait 1047 adet yumru ve yaprak örneği ile, domates bitkilerine ait 258 adet yaprak örneği; Tokat, Amasya, Balıkesir, Bursa, Muğla ve Antalya illerindeki çeşitli arazi ve seralardan temin edilmiştir. Ayrıca Yalova'da bazı seralardan, Erzurum'da bazı çiçekçilerden, Ankara, İzmir ve Trabzon'da ise rekreasyon alanlarından toplanan süs bitkilerine ait 461 adet örnek, bu çalışma da taranarak mevcut süs bitkilerindeki viroidlerin varlığı da araştırılmıştır. Toplanan 1766 örneğin tümü RT-PCR ve R-PAGE analizleri ile testlenerek, 891 adet patates yumrusunun altısında PSTVd, 154 adet kasımpatı bitkisinin ikisinde de CSVd etmenleri açısından bulaşıklık tespit edilmiştir. Testlenen tüm domates bitkileri ve süs bitkilerine ait diğer türlerde ise bu araştırmaya konu olan *Pospiviroid* cinsi viroid etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık durumu tespit edilememiştir (Bostan ve ark., 2010).

Türkiye’de 2007 yılında, bir üreticinin serasında yetiştirdiği altın çilek (*Physalis peruviana*) bitkisinin çeliklerini, çeşitli viroid etmenlerine karşı testletmesi sonucu bazı örnekler de PSTVd etmeniyle bulaşıklık saptanmıştır. Pozitif bulunan örneklerle yürütülen sekans analizi çalışmaları sonucunda tespit edilen bu patojenin, 357 nükleotide sahip PSTVd olduğu (NCBI: EU862230.1) ve “Oceanian strain” (NCBI: AY962324.1) olarak bilinen bir PSTVd ırkı ile % 99.7 oranında sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Etmenin patojenitesinin belirlenmesi amacıyla yürütülen sonraki mekanik inokulasyon çalışmalarında, Moneymaker çeşidi domates fidelerinin bitki özsuyna bulaştırılan PSTVd etmeni, inokulasyondan yaklaşık olarak dört hafta sonra fidelerin genç yapraklarında klorozlar ve bitkilerde genel bodurlaşma belirtileri göstermiştir. Bulaşık domates bitkilerinden ekstrakte edilen nükleik asitlerle tekrarlanan RT-PCR çalışmaları ile de, mevcut PSTVd etmenin varlığı doğrulanmıştır. Araştırmacılar, PSTVd’inin altın çilek bitkisinde latent olarak bulunup herhangi bir simptom oluşturmadığını, bu durumun da patates ve domates gibi pek çok bitki türü için inokulum kaynağı oluşturabileceğini vurgulamışlardır (Verhoeven ve ark., 2009b).

Güner ve arkadaşları 2010 ile 2012 yılları arasında, ülkemizdeki tohumluk patates çeşitlerinden tesadüfi olarak seçilen dormant patates yumrularındaki PSTVd enfeksiyonunu, radyoaktif olmayan dot-blot hibridizasyon ve RT-PCR analizleriyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 27 patates çeşidine ait toplamda 168 adet yumru örneğinin yedisinde PSTVd enfeksiyonunu saptamışlardır. Çalışmada ayrıca PSTVd genomuna spesifik digoksisigenin ile etiketli RNA probu, pSPT18 vektörüne aktarılan PCR ürününden sentezlenmiş ve dormant patates yumrularından izole edilen RNA ekstraktlarında, PSTVd etmeninin varlığı bu araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Seçilen PSTVd-TR (NCBI: HQ456944.1) izolatına ait genomun tamamı klonlanarak etmene ait baz dizilimleri tespit edilmiştir. PSTVd-TR izolatının, İtalya’da *Solanum* türlerinde tespit edilen bir PSTVd izolatıyla (NCBI: EF459700.1) % 99 oranında sekans benzerliği gösterdiği de bildirilmiştir. PSTVd-TR izolatının patojenitesi, Joker çeşidi domates fideleri ile gerçekleştirilen mekanik inokulasyon yöntemiyle belirlenip, oluşan enfeksiyonun varlığı da domates fidelerine uygulanan RT-PCR yöntemi ile doğrulanmıştır (Güner ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal

2014 ile 2015 yıllarında gerçekleştirilen çeşitli sörveyler, bazı fide firmalarına yapılan ziyaretler ve bazı tohum firmaları aracılığı ile toplamda 400 adet olmak üzere elde edilen tüm bitkisel materyaller, bu çalışmanın içerdiği amaç doğrultusunda kullanılmıştır.

Çalışmanın tüm bitkisel materyallerini, domates bitkilerine ait yerli ve ticari çeşitleri içeren bazı tohum, fide ve yaprak örnekleri oluşturmuştur.

Tohum örnekleri, yerli ve ticari çeşit tohumlar olarak ayrılmakla birlikte, bu çalışma için toplamda 150 çeşit tohum örneği toplanmıştır.

Yerli domates tohumları, Türkiye'de yetiştirilen farklı bölge çeşitlerini temsil edecek şekilde toplanan, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. H. Yıldız Daşgan'a ait yerli domates tohum koleksiyonundan temin edilmiştir.

Ticari domates tohumları ise bölgemiz illeri ve farklı illerdeki, bazı tohum firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan domates bitkilerine ait toplamda 250 adet fide ve yaprak örneği, Adana ile Mersin illerinde bulunan bazı üretici seralarından ve ticari üretim yapılan çeşitli seralardan temin edilmiştir.

Yerli ve ticari çeşitleri içeren, domates bitkilerine ait 250 adet fide ve yaprak örneklerine ilişkin bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan, 100 çeşit ticari domates tohum örneklerine ait bilgiler Çizelge 3.2'de ve 50 çeşidi içeren yerli domates tohum örneklerine ilişkin çeşit listesi ise Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan fide ve yaprak örneklerine ilişkin bazı bilgiler

Çeşit	Alındığı Şehir	Adet
Çeri Domates (Standart/F1)	ADANA	15
Oturak Domates (Yerli)	ADANA	40
Sırık Domates (Yerli)	ADANA	20
Asma Domates (Yerli)	ADANA	15
Yükselköy F1	ADANA	10
Kuzeyköy F1	ADANA	10
İskender F1	ADANA	10
Mihrimah F1	ADANA	10
Hünkar F1	ADANA	10
Şimşek F1	MERSİN	10
Jadelo F1	MERSİN	10
Zodiac F1	MERSİN	10
Bambus F1	MERSİN	10
Newton F1	MERSİN	10
Tayfun F1	MERSİN	10
Ayvaz F1	MERSİN	10
Nazal F1	MERSİN	10
Verti F1	MERSİN	10
Anıt F1	MERSİN	10
Onur F1	MERSİN	10
-Toplam-		250

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan ticari domates tohumlarına ilişkin çeşit listesi

Adamset F1	CLX–37284 F1	Haydar F1	Mayıs F1	Sedir F1
Akarsu F1	CLX–37532 F1	Herkül F1	Melody F1	Seval F1
Alcapone F1	CLX–37574 F1	Hünkar F1	Mihrimah F1	Seyit F1
Alida F1	Daylos F1	İhlara F1	Mucize F1	Seyran F1
Allegro F1	Doğuş F1	İkram F1	Naram F1	Şahmat F1
Alsancak F1	Dolphin F1	İskender F1	Narcan F1	Şimşek F1
Anıt F1	DRW–7806 F1	Jabot F1	Nazal F1	Tayfun F1
Argyl F1	Edu F1	Jadelo F1	Newton F1	Toprak F1
Armağan F1	Elegant F1	Jasmine F1	Otranto F1	Torry F1
Aroma F1	Elektra F1	Jest F1	Ömür F1	Troy F1
Atazade F1	Elika F1	Kahraman F1	Özer F1	Tybif F1
Atom F1	Esin F1	Katya F1	Panda F1	Tyfy F1
Aytina F1	Ferman F1	Keita F1	Pehlivan F1	Verty F1
Bambus F1	Festina F1	Kuzeyköy F1	Pinklady F1	Vitello F1
Baydegg F1	Fırtına F1	Lamia F1	Quaresma F1	Yakup F1
Benal F1	Fil F1	Lavinya F1	Rana F1	Yeniçeri F1
Bestona F1	Gamze F1	Logure F1	Rio Grande (Standart)	Yerlim F1
Cansev F1	Gönül F1	Malike F1	Sahra F1	Yükselköy F1
Caracas F1	Gülevşen F1	Manita F1	SC–2121 (Standart)	Zeus F1
Cemile F1	H–2274 (Standart)	Marmande (Standart)	Mayıs F1	Zodiac F1

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan yerli domates tohumlarına ilişkin çeşit listesi

1009-6	TR37277	TR46440	TR49449	TR61658
1009-8	TR40351	TR47815	TR49644	TR61697
1009-9	TR40359	TR47820	TR49646	TR61796
1009-16	TR40361	TR47851	TR52263	TR61870
1009-18	TR40363	TR47865	TR52361	TR62573
1071-31	TR40395	TR47882	TR52376	TR63233
1071-32	TR40397	TR48932	TR52377	TR66330
1071-33	TR40478	TR48937	TR52414	TR68513
1071-34	TR40532	TR48938	TR52428	TR68516
1071-35	TR43484	TR48940	TR55711	TR68517

Domates bitkilerine ait yerli ve ticari tohum örneklerinin yetiştirilmesinde, yetiştirilme amacına göre torf, perlit, steril toprak, çeşitli ebatlardaki plastik saksılar ile viyoller, cam petri kapları, kurutma kağıdı ve çimlendirme kabini gibi ekipmanlar kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen sürveylerle toplanan yaprak örneklerinin muhafazasında ise, buz içeren kutular ve plastik torbalar kullanılmıştır.

3.1.2. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yürütülen total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmalarında; hassas terazi, CTAB tamponu çözeltisi, havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, % 2'lik hipo, kurutma kağıdı, 1,5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, rak, su banyosu, 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 (EK-1).

3.1.3. RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yürütülen RT-PCR çalışmalarında kullanılan materyaller; total nükleik asit ekstraksiyonu ile daha önceden elde edilmiş olan total nükleik asit örnekleri, viroid etmenlerine özgü primerler, dNTP (Promega#U1240), ddH₂O, 5X tampon çözeltisi, DTT, ters transkriptaz (RT) enzimi, Taq polimeraz enzimini içeren GoTaq karışımı (Promega#M3175), değişik hacimlerdeki bazı pipet ve pipet uçları, PCR tüpleri, vorteks karıştırıcı, santrifüj cihazı, buz makinesi ve thermal cycler aletidir.

RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bazı bilgiler Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.4. *Pospiviroid* cinsine giren etmenleri belirlemede kullanılan yarı-evrensel primer çiftlerinin tanıdığı viroidler (Botermans ve ark., 2013)

Yarı-Evrensel Primerler	Primerlerin Tanıdığı Viroid Etmenleri			
	PSTVd	CEVd	TASVd	TCDVd
Posp1-FW/RE	+	+	+	+
Vid-FW/RE	+	–	–	+

Çizelge 3.5. *Pospiviroid* cinsi viroid etmenlerini belirlemede kullanılan yarı-evrensel primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004)

Yarı Evrensel Primerler	Sekans Dizilimi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge (bp)
Posp1-FW	GGGATCCCCGGGGAAAC	59 – 62 °C	86 – 102 bp
Posp1-RE	AGCTTCAGTTGT(T/A)TCCACCGGGT	59 – 62 °C	261 – 283 bp
Vid-FW	TTCCTCGGAATAAACTCGTG	58 – 60 °C	16 – 355 bp
Vid-RE	CCAACTGCGGTTCCAAGGG	58 – 60 °C	336 – 354 bp

Çizelge 3.6. CEVd ve PSTVd etmenlerinin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri (Önelge, 1997; Weidemann ve Buchta, 1998)

Primer Çiftleri	Sekans Dizilimi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge (bp)
CEVd-FW	GTGCTCACCTGACCCTGCAGG	58 °C	371 bp
CEVd-RE	ACCACAGGAACCTCAAGAAAG	58 °C	371 bp
Pr-FW	ATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAAC	54 °C	359 bp
Pr-RE	CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG	54 °C	359 bp

3.1.4. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Amplifikasyon aşamasını takiben gerçekleştirilen elektroforez çalışmalarında; 1X TAE tamponu çözeltisi, agaroz (Sigma#A9539), elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 100 bp'lik DNA markör kullanılmıştır. Elektroforez sonucu jellerde yürütülen örneklerin görüntülenmesi aşamasında ise; UV transillüminatör cihazı, jel yıkama tamponu olarak ise saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür kullanılmıştır (EK-2).

3.1.5. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yürütülen mekanik inokulasyon çalışmaları kapsamında SC-2121, H-2274, Rio Grande ve Marmande standart domates çeşitlerine ait genç fideler kullanılmıştır. Domates bitkilerine aktarılacak olan PSTVd etmenine ait inokulum materyali Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü'nden, CEVd etmenine ait olan inokulum materyali ise Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları esnasında; şırınga ucu, lateks eldiven, % 2'lik hipo, 1X TKM tamponu çözeltisi, saf su, parafilm bantlar, viyoller ve plastik saksılar gibi çeşitli materyaller kullanılmıştır (EK-3).

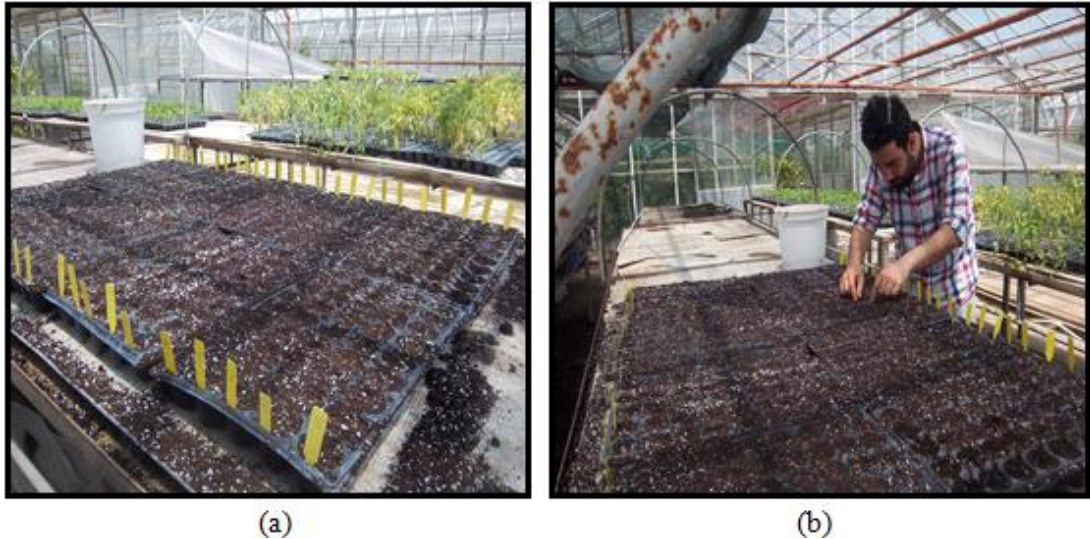
3.2. Metot

3.2.1. Domates Örneklerinin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan 50 domates çeşidine ait tüm yerli tohum örnekleri, 1 : 1 oranındaki perlit ve torf karışımı hazırlandıktan sonra 9 x 5 'lik plastik viyollere ekilmiştir. 50 çeşit domates tohumu örneği için toplamda 10 viyole tohum ekimi yapılarak, gerekli sulama ve bakım işlemleri tüm bitkiler örneklemeye hazır hale gelene kadar yürütülmüştür. Bitkiler tohum ekiminden 20 – 21 gün sonra yaklaşık 8 – 10 cm uzunluğa ulaştınca, her bitkiden 2 – 3 gram yaprak örneği alınıp buz kutuları içindeki plastik torbalarda, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı'na getirilmiştir.

Tohumların ekimi ve çeşitli diğer tüm bakım işlemleri, çalışma bitinceye kadar Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait seralarda yürütülmüştür.

Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü seralarında yürütülen domates tohumu ekim çalışmaları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de, ekilen bu domates tohumlarının çimlenme aşamaları ise Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Yerli domates tohumlarının Bahçe Bitkileri Bölümü seralarında yürütülen ekim çalışmaları: (a), (b)



(a)



(b)

Şekil 3.2. Ekim işlemleri tamamlanan tüm yerli domates tohumlarının sulanması (a) ve çimlenme aşaması için bekletilmesi (b)



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.3. Çimlenen yerli domates tohumları (a), tohumlardan testlemeler yapmak amacıyla örneklerin alınması (b) ve gruplandırılarak paketlenmesi (c)

Farklı bölgelerde ve iklim koşullarında; erkenci veya geççi olarak yetiştirilen, sırık veya bodur, sofralık veya sanayi üretimi amaçlı, açık ya da sera tipi yetiştiricilik için uygun olmak üzere, farklı özelliklere sahip 100 çeşit ticari domates tohum örneği Adana, Mersin, Antalya ile diğer bazı illerdeki tohum firmaları aracılığıyla ve doğrudan satın alım yapılarak temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında, 2014 yılı Kasım ayında Antalya'nın Kumluca ilçesinde düzenlenen "DOMATEXPO – III. Domates Yetiştiriciliği ve Teknoloji Fuarı" ziyaret edilerek, bazı tohum firmalarından tohum temini sağlanmıştır.

Elde edilen ticari domates tohum örnekleri, kurutma kağıtları ve cam petri kapları kullanılarak çimlendirme kabinlerinde çimlendirilmiş ve bu bitkiler yaklaşık olarak 9 – 10 gün sonra 5 – 6 cm uzunluğa ulaştınca, 1 : 1 oranında hazırlanmış perlit ve torf karışımı içeren viyollere şaşırtma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Şaşırtma işleminden sonra 12 – 14 cm uzunluğa ulaşan bitkilerin farklı kısımlarından birer gram örnek alınarak, ekstraksiyon aşamalarında kullanılmıştır. Tohum ekimi ve şaşırtma aşamaları, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turuncgil Virüsleri Laboratuvarı ve klima odalarında yürütülmüştür.

Çalışmada kullanılmak üzere elde edilen domates fide ve yaprak örnekleri, Adana ve Mersin illerinde ticari amaçlı üretim yapan fide üretim tesisleri ile üretici seralarından, toplamda 250 adet örnek içerecek şekilde elde edilmiştir.

Domates bitkilerine ait fide ve yaprak örneklerinin elde edilmesi amacıyla, Adana ve Mersin illerinde bulunan bazı üretim alanlarına, farklı zamanlarda olmak üzere çeşitli ziyaretler gerçekleştirilmiştir.

Fide olarak elde edilen örnekler, ya saksılara şaşırtma işlemi gerçekleştirilip ekstraksiyon aşamalarına kadar klima odalarında bekletilmiş ya da direkt olarak ekstraksiyon için örnek alınmıştır.

Toplanan yaprak örnekleri, plastik torbalarla buz içeren kutularda muhafaza edilip ekstraksiyon için kullanılmıştır.

Elde edilen örnekler, öncelikle viroid etmenlerinin karakteristik bazı hastalık belirtileri sergileme durumlarına göre güdümlü örnekleme yöntemi ile elde edilmiştir (Bora ve Karaca, 1970).

Aşağıda örnekleme çalışmalarında PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenlerine ilişkin saptanılmaya çalışılan bazı belirtiler verilmiştir.

PSTVd etmeni için:

- Yaprak boyutlarında küçülmeler ve aşağı doğru kıvrılmalar
- Yapraklarda mora çalan renk ve yaprak ana damarlarının yeşil kalması
- Yaprak yapısının kırılmaşması
- Koyu yeşil, küçük ve sert meyve oluşumları
- Bitkilerde şekilsiz olgunlaşmalar ve genel bodurlaşmanın görülmesi

CEVd etmeni için:

- Bitkilerin tepe kısımlarında kıvrıcılık ve kabarcıklık belirtileri
- Yaprak ve meyve boyutlarının küçük kalması
- Boğum aralarında kısılma belirtileri
- Bitkilerde genel gelişim geriliği ve bodurlaşma

TASVd etmeni için:

- Yaprakların az gelişmiş ve kıvrılmış bir yapıya sahip olması
- Meyvelerde renksiz ya da çok soluk renkli görünüm
- Meyve boyutlarının küçük kalması ve bitkilerde genel bodurluk

TCDVd etmeni için:

- Bitkilerin tepe kısımlarında demetleşme ve kümeleşme oluşumları
- Bitkilerin uç yapraklarında sararma ve klorozların oluşumu
- Yaprak yapısının kırılmaşması ve yaprakların aşağı doğru kıvrılması
- Meyve boyutlarının küçük kalması, bitkilerde genel gelişim geriliği

3.2.2. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmaları

Domates bitkilerine ait örneklerin kullanıldığı total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

CTAB temelli total nükleik asit ekstraksiyonu için, Murray ve Thompson'un (1980) tanımladığı metot kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları, her bir örnek için aşağıda verilen yönteme göre aşama aşama yürütülmüştür.

- Bitkisel materyal 100 – 300 mg miktarında alınıp, üzerine 1 – 1,5 ml CTAB tamponu çözeltisi eklendikten sonra havanlarda ezilmiştir.
- Yaklaşık 2 ml miktarına ulaşan karışım tüplere alınıp, 65 °C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilmiş ve bir saat bekletilmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifürlenerek üst fazdan 1 ml'lik sıvı kısım yeni tüplere alındıktan sonra, tüplere 1 ml kloroform : izoamil alkol (24 : 1) karışımı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifürlenerek, üst fazdan 750 µl alınıp yeni tüplere aktarılmış ve bu tüplere de 450 µl soğuk izopropanol eklenip yavaşça karıştırılmıştır.
- –20 °C'de yaklaşık bir saat bekletilen örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifürlenip, sıvı faz dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.
- Kalan katı pelet kısım ise 1 ml % 70'lik etil alkolle yıkandıktan sonra örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifürlenerek, % 70'lik etil alkol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
- Örnekler kurutma kağıdı üzerinde iyice kurutulduktan sonra, 100 µl TE tamponu çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.
- Ekstraksiyon aşaması tamamlanan domates örneklerinin etiketlenmesi sağlandıktan sonra PCR çalışmaları için kullanılıncaya kadar, –20 °C sıcaklıktaki derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.

3.2.3. RT-PCR Çalışmaları

RT-PCR (Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmaları Önelge'ye (1997) göre iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada viroid RNA'sı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilmiş ve daha sonra PCR çalışmasına alınmıştır.

Elde edilen total nükleik asit ekstraktlarından cDNA sentezi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adımlarından oluşan RT-PCR testinde, her bir örnek için aşağıdaki yöntemler adım adım olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bütün PCR çalışmalarında, pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril distile su) kullanılmıştır.

3.2.3.1. Ters Transkriptaz Enzimiyle Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, RT-I ve RT-II aşamaları gerçekleştirilerek tamamlanmıştır.

RT-I aşaması:

- Buz üzerindeki, steril PCR tüplerine 6 µl ddH₂O, 1 µl "Reverse" primer (10µM), 1 µl dNTP (10 mM) ve 4 µl total nükleik asit örneği eklenmiştir.
- Daha sonra PCR tüpleri, 65 °C'de 5 dakika süre ile thermal cyler cihazında bekletilmiştir. Cihazdan çıkarılan örnekler buza yerleştirilerek, RT-II aşamasına geçilmiştir.

RT-II aşaması:

- Buz üzerindeki, steril mikrosantrifüj tüplerinde 4 µl 5X tamponu çözeltisi, 2 µl DTT (10 mM), 1 µl ters transkriptaz enzimi ve 1 µl ddH₂O içeren "RT-Master Mix" hazırlanmıştır. Hazırlanan "RT-Master Mix" RT-I aşamasındaki her PCR tüpü için, 8 µl olacak şekilde eklenmiştir.
- Bu adımdan sonra PCR tüpleri 42 °C'de 40 dakika ve 70 °C'de 10 dakika thermo cyler cihazında bekletilerek, cDNA sentezi tamamlanmıştır.

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması

Yürütülen RT-PCR çalışması ‘‘PCR Master Mix’’ karışımının hazırlanması ve sentezlenen cDNA’ların kullanılması ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu aşaması, her bir örnek için aşağıdaki yöntemle göre adım adım olacak şekilde yürütülmüştür.

- Buz üzerindeki, steril mikrosantrifüj tüplerinde 8,5 µl ddH₂O, 1µl ‘‘Forward’’ primer (10 µM), 1 µl ‘‘Reverse’’ primer (10 µM) ve 12,5 µl GoTaq karışımı maddelerini içeren ‘‘PCR Master Mix’’ hazırlanmıştır.
- PCR tüplerine her örnek için, 23 µl ‘‘PCR Master Mix’’ ile RT-I ve RT-II aşamalarıyla elde edilen cDNA örneğinden 2 µl eklenmiştir.
- PCR tüplerinde 25 µl miktarında hazırlanan son hacim, thermal cycler aletine yerleştirilmiştir.
- Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PCR koşulları ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır. Bu çalışmada modifiye edilen PCR koşulları Çizelge 3.7’de verilmiştir.
- Elde edilen tüm PCR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar –20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları

Ayrılma Sıcaklığı	94 °C	5 dakika	1 döngü
Bağlanma Sıcaklığı	94 °C	30 saniye	35 döngü
	58 – 62 °C	30 saniye	35 döngü
	72 °C	1 dakika	35 döngü
Uzama Sıcaklığı	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.2.4. Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi

Yürütülen bu çalışmada “agaroz jel elektroforez yöntemi” kullanılmıştır. Bu yöntem ise Önelge’ye (1997) göre modifiye edilerek yürütülmüştür.

Agaroz jel elektroforez yöntemi için adım adım izlenen aşamalar, aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

- 100 ml 1X TAE tamponu çözeltisi ve 2 gram agaroz maddesi kullanılarak hazırlanan karışım, mikrodalga fırında 2 – 3 dakika süre ile agaroz maddesi iyi bir şekilde eriyinceye kadar ısıtılmıştır.
- Jel tepsisi düz bir zemin üzerinde ayarlanıp, yüklenecek örnek sayısına uygun tarak yerleştirilmiştir. Hazırlanan agaroz karışımı biraz soğuduktan sonra jel tepsisine kabarcık oluşmayacak şekilde dökülerek, agaroz 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 ml 100 bp’lik DNA markör, diğer çukurlara ise 10 ml 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 45 – 60 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez işlemi tamamlanan agaroz jel tepsiden ayrılarak biraz soğuması sağlandıktan sonra, saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür çözeltisi içerisinde yaklaşık 10 dakika süre ile bekletilmiştir.
- Bekleme aşaması tamamlanan agaroz jel, UV transilluminator aleti aracılığı ile görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.5. Sekans Analizi ve Verilerin Karşılaştırılması

RT-PCR ve agaroz jel elektroforez çalışmaları sonucunda pozitif bulunan örnekler, aynı koşullarda RT-PCR uygulanarak 200 ml hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan tüm örnekler saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana ilinde bulunan “Molgentek” firmasına gönderilmiştir. Firmanın nükleotid dizilimleri belirleme çalışmaları, gönderilen etmenlerin “Forward” ve “Reverse” primerlerine göre iki ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir.

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 bazı organizmalar ile karşılaştırılmıştır.

Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri “Mega 6” (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak “Neighbour Joining” metodu ile sınıflandırılmıştır.

3.2.6. Mekanik İnokulasyon Çalışmaları

PSTVd ve CEVd etmenlerinin domates bitkilerinde meydana getirdiği bazı semptomları gözlemlemek amacıyla, mekanik inokulasyon çalışması yürütülmüştür. Çalışmada, indikatör olarak seçilen domates bitkilerine ait bazı fideler ve PSTVd ile CEVd etmenlerine ait inokulumlar kullanılmıştır.

Yürütülen bu mekanik inokulasyon çalışması kapsamında SC-2121, H-2274, Rio Grande ve Marmande standart domates çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır. Bu çeşitlere ait tohumlar yetiştirilmeden önce yürütülen RT-PCR çalışmalarıyla, *Pospiviroid* cinsi viroid etmenleri açısından testlenmiş ve herhangi bir bulaşıklık durumu tespit edilmemiştir.

Bu çeşitlere ait tohumların bir bölümü, 1 : 1 : 1 oranında karıştırılan perlit, toprak ve torf karışımını içeren plastik viyollere ekilmiştir. Viyollerde çimlendirilen bitkiler, 2 – 4 yapraklı oldukları dönemde aynı karışımın bulunduğu 12 cm çapında ve 15 cm yüksekliğindeki plastik saksılara şaşırtılmıştır.

İlk gerçek yaprakları çıkan ve yaklaşık olarak 15 cm uzunluğa ulaşan domates fidelerinden 36 adet fide, dörtlü gruplara ayrılarak (her çeşit için 9 adet fide olacak şekilde) yürütülen mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Fidelere bulaştırılacak olan PSTVd ve CEVd etmenlerine ait inokulumlar, 1X TKM tamponu çözeltisi ile % 10'a kadar seyreltilerek kullanılmıştır.

Her fide için 20 ml hacminde olacak şekilde hazırlanan son karışım, bitkilerin genç gövdelerinde şırınga ucu yardımı ile açılan yara dokularına enjekte edilmiştir.

Enjeksiyon işlemi sonunda oluşan yara dokuları parafilm bantlar ile kapatılıp, bitkiler az miktarda sulanmıştır.

Yürütülen mekanik inokulasyon çalışmalarına ait bazı görseller, Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Domates fideleri ve viroid inokulumları ile gerçekleştirilen mekanik inokulasyon aşaması (a), viroid inokulumları ile bulaştırılan domates fidelerinin klima odalarında simptom gelişimi için muhafaza edilmesi (b)

İnokulasyon çalışmaları sonunda her çeşit için bitkiler; 3 adet kontrol bitkisi, 3 adet CEVd ile bulaşık bitki ve 3 adet de PSTVd ile bulaşık bitki olacak şekilde gruplandırılmıştır. Toplamda 12 adet kontrol bitkisi, 12 adet CEVd ile bulaşık bitki ve 12 adet de PSTVd ile bulaşık bitki örneği elde edilmiştir.

İnokulasyon çalışmalarında kullanılan domates bitkileri 28 – 30 °C sıcaklık, % 70 nem, 16/8 saat (ışık/karanlık) ve 5000 lüks aydınlatma koşullarına sahip kontrollü klima odalarında muhafaza edilmiştir.

Klima odalarındaki tüm bitkilerin bakım çalışmaları, belirli bazı periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Bitkiler ayrıca hastalık, zararlı ve simptom gelişimi açısından da, çalışma tamamlanana kadar düzenli olarak kontrol edilmiştir.

Gerçekleştirilen tüm mekanik inokulasyon çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı ile Viroloji klima odalarında yürütülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

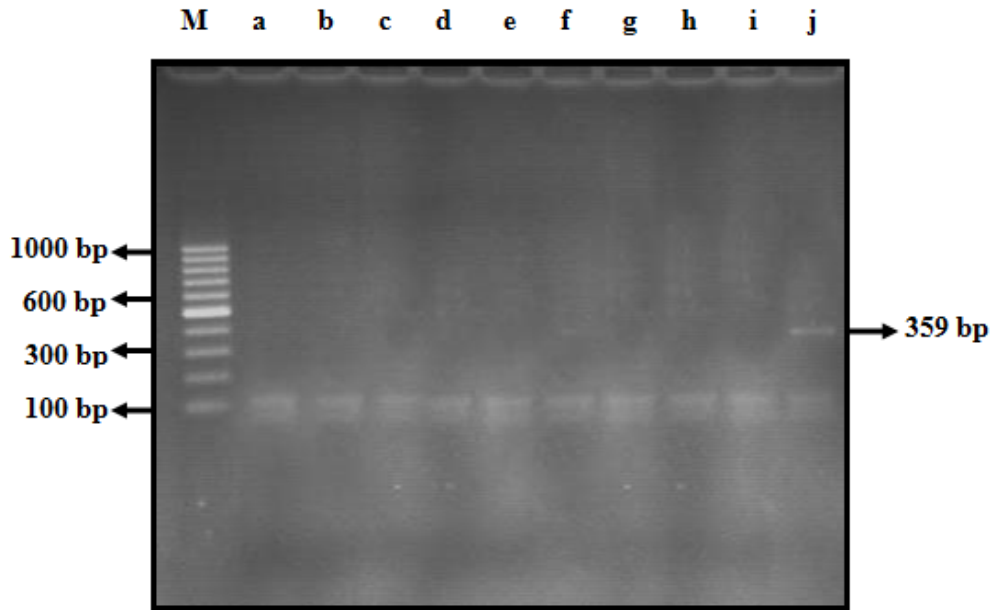
Yürütülen bu tez çalışması kapsamında elde edilen tüm bulgular üç ana başlık ve bu başlıklara ilişkin alt başlıklar şeklinde açıklanmıştır.

4.1. Testlenen Domates Tohum Örneklerine İlişkin Bulgular

RT-PCR yöntemi ile testlenen yerli ve ticari domates tohum örneklerine ilişkin bulgular iki alt başlıkla açıklanmıştır.

4.1.1. Testlenen Yerli Domates Tohum Örnekleri

Çalışmada 50 çeşidi içeren yerli domates tohum örneklerinin tümü PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından, RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. RT-PCR çalışmalarında PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenlerinin tamamını tanıyabilen, yarı-evrensel Posp1-FW (GGGATCCCCGGGGAAAC) ile Posp1-RE (AGCTTCAGTTGT(T/A)TCCACCGGGT) primer çifti (Verhoeven ve ark., 2004) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların doğrulanabilmesi açısından, örneklerin tamamı Vid-FW/RE primer çiftiyle de (Verhoeven ve ark., 2004) yeniden testlenmiştir. Sonuç olarak, testlenen 50 çeşidi içeren yerli domates tohum örneklerinde araştırılan PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık durumu tespit edilmemiş ve bu yerli domates tohum örneklerinin sağlıklı oldukları görülmüştür. Çalışmada RT-PCR metodu ile testlenen yerli domates tohum örneklerinden; TR40361, TR40532, TR43484, TR55711, TR68517, TR61870, TR37277 ve TR49449'a ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



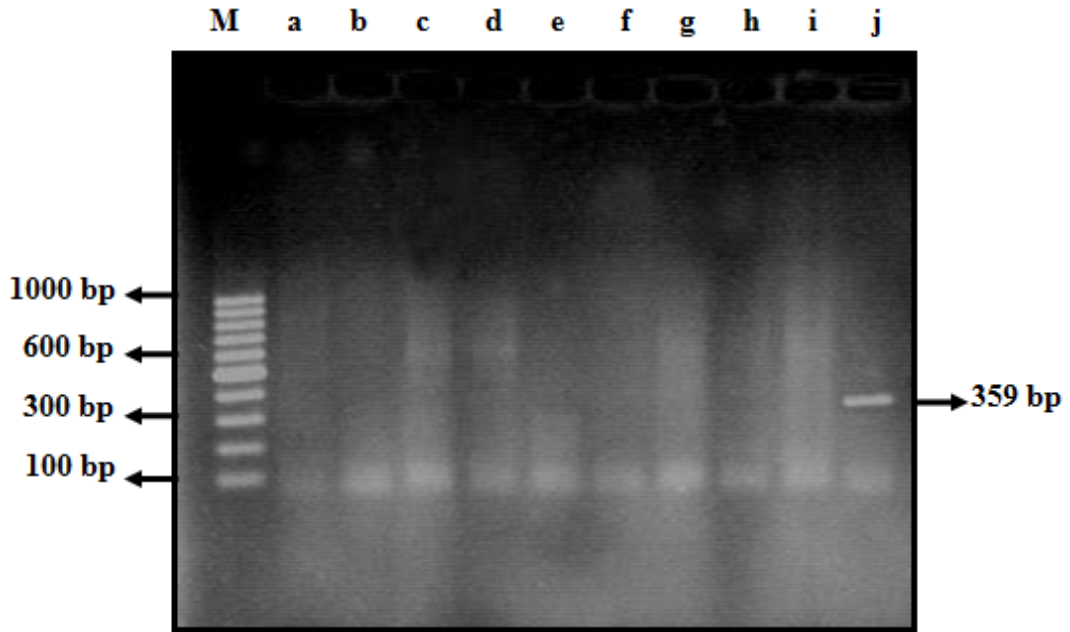
Şekil 4.1. RT–PCR ile testlenen yerli domates tohum örneklerine ait % 2’lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp’lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), b: TR40361, c: TR40532, d: TR43484, e: TR55711, f: TR68517, g: TR61870, h: TR37277, i: TR49449, j: Pozitif kontrol (PSTVd)

PCR düzeninin Pospi1-FW ile Pospi1-RE primer çiftinin uygun bağlanma sıcaklığı olan 59 – 62 °C sıcaklık koşullarına göre modifiye edildiği çalışmada, elektroforez işlemleri yürütülürken PSTVd etmeni pozitif kontrol olarak kullanılmış ve agaroz jelde PSTVd etmenine ait 359 bp’lik DNA fragmenti görüntülenmiştir. Bu sayede, pozitif kontrol olarak kullanılan PSTVd inokulumunun ve Pospi1-FW ile Pospi1-RE primer çiftinin çalışma için uygun koşullarda olduğu görülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan steril distile suyun agaroz jelde bant oluşturmaması ve modifiye edilen PCR düzeninin primerler açısından uygunluğu da, çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliğini sağlamıştır.

4.1.2. Testlenen Ticari Domates Tohum Örnekleri

Çalışmada 100 çeşidi içeren ticari domates tohum örneklerinin tümü PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından, RT–PCR yöntemi ile testlenmiştir. RT–PCR çalışmalarında PSTVd ve TCDVd etmenlerini tanıyabilecek şekilde dizayn edilen, yarı-evrensel Vid-FW (TTCCTCGGAACTAAACTCGTG) ile Vid-RE

(CCAACTGCGGTTCCAAGGG) primer çifti (Verhoeven ve ark., 2004) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların doğrulanabilmesi açısından, örneklerin tamamı Posp1-FW/RE primer çiftiyle de (Verhoeven ve ark., 2004) yeniden testlenmiştir. Sonuç olarak, testlenen 100 çeşidi içeren ticari domates tohum örneklerinde araştırılan PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık durumu tespit edilmemiş ve bu ticari domates tohum örneklerinin sağlıklı oldukları görülmüştür. Çalışmada RT-PCR metodu ile testlenen ticari domates tohum örneklerinden; Bambus, İkrâm, Newton, Verty, Yeniçeri, Şimşek, Aytina, Zeus'a ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. RT-PCR ile testlenen ticari domates tohum örneklerine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), b: Bambus, c: İkrâm, d: Newton, e: Verty, f: Yeniçeri, g: Şimşek, h: Aytina, i: Zeus, j: Pozitif kontrol (PSTVd)

PCR düzeninin Vid-FW ile Vid-RE primer çiftinin uygun bağlanma sıcaklığı olan 58 – 60 °C sıcaklık koşullarına göre modifiye edildiği çalışmada, elektroforez işlemleri yürütülürken PSTVd etmeni pozitif kontrol olarak kullanılmış ve agaroz jelde PSTVd etmenine ait 359 bp'lik DNA fragmenti görüntülenmiştir. Bu sayede, pozitif kontrol olarak kullanılan PSTVd inokulumunun ve Vid-FW

ile Vid-RE primer çiftinin çalışma için uygun koşullarda olduğu görülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan steril distile suyun agaroz jelde bant oluşturmaması ve modifiye edilen PCR düzeninin primerler açısından uygunluğu da, çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliğini sağlamıştır.

PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenlerinin, domates tohumlarıyla taşınabilmesi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde Singh (1970), PSTVd'inin domates tohumlarıyla taşınabildiğini, taşınma oranının da tohumların yetiştirildiği ana ve baba tohum hatlarının bulaşıklık durumuna göre değişebileceğini bildirmiştir. Antignus ve arkadaşları (2007), TASVd etmeninin domates tohumlarıyla % 80'e ulaşan oranlarda taşınabileceğini bildirmişlerdir. Koenraadt ve arkadaşları (2009), PSTVd ve TCDVd etmenleri ile bulaştırdıkları domates tohumlarında, bu viroidlerin fidelere taşınma oranlarını PSTVd için 370 tohumda % 0.27, TCDVd için 2500 tohumda % 0.08 olarak bildirmişlerdir. Faggioli ve arkadaşları (2015), yürüttükleri çalışmalarda PSTVd, CEVd, TASVd ve CLVd ile bulaştırılan 7000 domates bitkisinden alınan tohumlarda da araştırdıkları viroid etmenleri ile mevcut bulaşıklığı tespit edebilmiş, bu tohumlardan yetiştirdikleri tüm fidelerde ise bir bulaşıklık saptayamamışlardır. Yürütülen bu tez çalışması kapsamında, testlenen toplam 150 adet yerli ve ticari domates tohum örneklerinin PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından sağlıklı oldukları görülmüştür. Çalışmada elde edilen sonuçlar, tohumlarda herhangi bir bulaşıklığın saptanmaması yönüyle Faggioli ve arkadaşlarının (2015) çalışması ile uygunluk göstermektedir. Testlenen tüm tohum örneklerinde araştırılan viroid etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklığın tespit edilmemesi olumlu bir sonuçtur, ancak bu durum bölgemizde ya da ülkemizde yetiştirilmekte olan domates bitkilerine ait tohumluk materyalin temiz olduğu anlamını taşımamaktadır. Çalışmanın fazla sayıda tohum örneğinin testlenmesi ve farklı alanları kapsayacak şekilde rutin olarak sürdürülmesi halinde, daha belirgin sonuçların elde edileceği öngörülmektedir.

PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri ile ilgili karantina mevzuatları incelendiğinde, EPPO birimleri tarafından önemli bir karantina patojeni olarak bildirilen PSTVd'inin, bu birimin hazırladığı mevcut karantina düzenlemelerine göre "EPPO – A2 List" listesinde yer aldığı görülmektedir. TASVd ise aynı birimin hazırladığı karantina düzenlemelerine göre "EPPO – Alert List" listesinde yer

almaktadır. EPPO birimlerinin hazırladığı listelerde henüz CEVd ve TCDVd ile ilgili bir karantina düzenlemesi mevcut bulunmamaktadır. Ülkemizdeki güncel karantina düzenlemelerine bakıldığında ise sadece PSTVd etmeni “5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu’na” dayanılarak hazırlanan yönetmeliğin “EK – 4” listesinde önemli bir karantina etmeni olarak belirlenmiştir. Ülkemizdeki karantina birimlerinin hazırlamış olduğu yönetmeliklerde, henüz CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleriyle ilgili bir karantina düzenlemesi bulunmamaktadır.

Ülkemizin tohumluk materyal ithal ettiği İsrail, Hollanda ve Fransa gibi bazı ülkelerde PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenlerinin, domates bitkilerinde rapor edilmiş olmaları, ülkemizdeki mevcut domates üretimi açısından da büyük bir risk oluşturmaktadır. Zaman zaman, üretilen bitkisel materyallerde var olan çeşitli hastalık etmenleri nedeniyle de, bazı bitkisel materyaller ihracattan dönebilmekte ve büyük ekonomik kayıplar oluşabilmektedir. Bu nedenle, ülkemizde hem ithalatı hem de ihracatı yapılan domates bitkilerinin, viroid etmenleri açısından testlenmeleri gerekmektedir. Ancak bu etmenler henüz “Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı”, “Karantina İl Müdürlükleri” , “Enstitü” ve “Araştırma İstasyonlarında” rutin olarak kontrol edilmemektedir.

Bu tez çalışması, temin edilen yerli ve ticari domates tohum örneklerinin viroidler bakımından bulaşıklık durumunu araştırmanın yanı sıra, viroid etmenlerinin farklı bitki gruplarında da testlenmelerinin önemini belirtmek ve ayrıca karantina düzenlemelerinin de gereksinimine dikkat çekebilmek amacı ile yürütülmüştür. Yürütülen çalışma bu yönüyle, bölgemizdeki ve ülkemizdeki domates tohumlarında bulunabilecek viroid etmenlerinin araştırılması açısından da ön bir çalışma olmuştur. Araştırılan literatür bilgilerinin ve moleküler çalışmalarda kullanılan yöntemlerin, bu konularda yapılabilecek birtakım araştırmalar açısından referans oluşturabilmesi, bu çalışmanın değer kazanabilmesi bakımından önem arz etmektedir.

4.2. Testlenen Domates Fide ve Yaprak Örneklerine İlişkin Bulgular

Çalışmada domates bitkilerine ait yerli ve ticari çeşitleri içeren 250 adet fide ve yaprak örneklerinin tümü PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından,

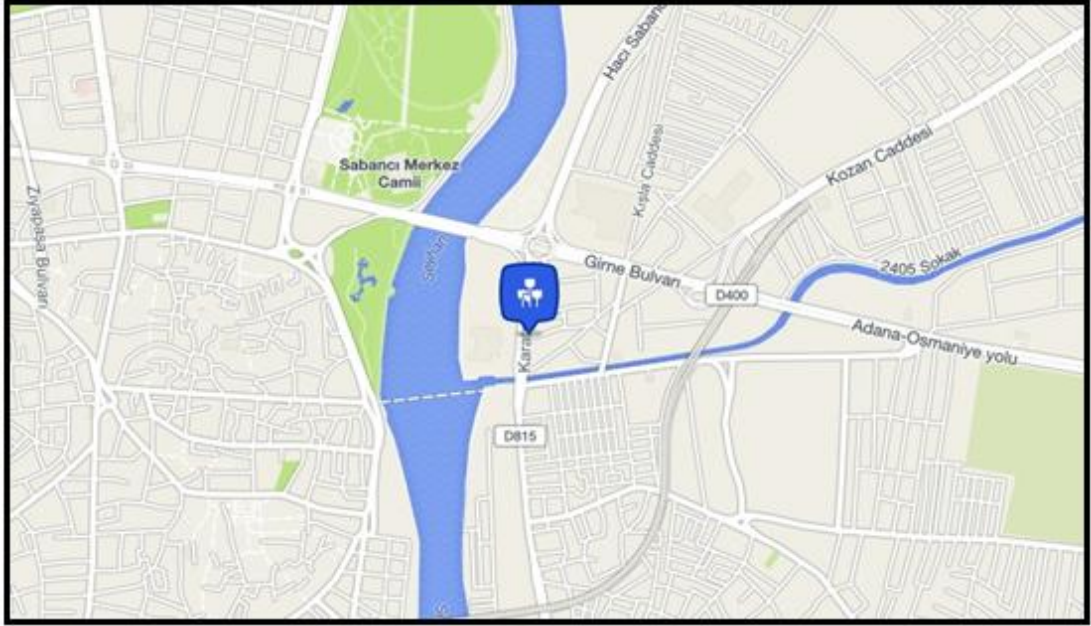
RT–PCR yöntemi ile testlenmiştir. RT–PCR çalışmalarında PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenlerinin tamamını tanıyabilen, yarı-evrensel Posp1-FW/RE primer çifti (Verhoeven ve ark., 2004) kullanılmış, elde edilen sonuçların doğrulanabilmesi için örneklerin tamamı Vid-FW/RE primer çiftiyle de (Verhoeven ve ark., 2004) yeniden testlenmiştir. Sonuç olarak, testlenen 248 örnekte araştırılan viroid etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık tespit edilmemiş ve bu örneklerin sağlıklı oldukları görülmüştür. Saksılı olarak temin edilen “Çeri” çeşidi iki adet domates örneğinde ise CEVd etmeni ile mevcut bulaşıklık saptanmış ve bu örneklerle ilişkin bulgular da, çalışmada alt başlıklar şeklinde ayrı olarak açıklanmıştır.

Ülkemizde *Pospiviroid* cinsine giren viroid türlerinden PSTVd etmeni, Solanaceae familyası bitkilerinden sadece patates (Önelge ve Bozan 2005; Bostan ve ark., 2010; Güner ve ark., 2012) ve altın çilek (Verhoeven ve ark., 2009b) bitkilerinde bildirilmiştir. Bostan ve arkadaşlarının 2006 ile 2009 yılları arasında yürüttükleri çalışmalarda, domates bitkilerine ait 258 adet yaprak örneği PSTVd açısından, RT–PCR ve R–PAGE ile testlenmiş ancak herhangi bir bulaşıklık tespit edilmemiştir. Ülkemizde CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından, domates bitkilerinde yürütülmüş herhangi bir çalışma ise henüz mevcut bulunmamaktadır. Yürütülen bu tez çalışması kapsamında, testlenen toplam 250 adet domates fide ile yaprak örneklerinin PSTVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından sağlıklı oldukları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, fide ve yaprak örneklerinde herhangi bir bulaşıklığın saptanmaması yönüyle Bostan ve arkadaşlarının (2006 – 2009) çalışması ile uygunluk göstermektedir. Fide ve yaprak örneklerinde araştırılan viroid etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklığın tespit edilmemesi olumlu bir sonuçtur, ancak çalışmanın fazla sayıda fide ile yaprak örneğinin testlenmesi ve farklı alanları kapsayacak şekilde rutin olarak sürdürülmesi halinde, daha belirgin sonuçların elde edileceği öngörülmektedir.

4.2.1. CEVd Etmeniyle Bulaşık Domates Örneklerinin Alındığı Yere Ait Bilgiler

2015 yılı Nisan ve Haziran ayında yürütülen sörvey çalışmaları kapsamında “Adana” ilinin “Yüreğir” ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden iki adet “Çeri”

çeşidi domates bitkisi örneği temin edilmiş, temin edilen mevcut bu örneklerden Nisan ayında alınan bitki “Örnek-1”, Haziran ayında alınan bitki ise “Örnek-2” olarak isimlendirilmiştir. Domates bitkisi örneklerinin elde edildiği ticari işletmeye ilişkin lokasyon Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3. Domates bitkisi örneklerinin elde edildiği ticari işletmeye ilişkin lokasyon

Domates bitkisi örneklerinin alındığı yer başta bazı süs bitkileri olmak üzere, çeşitli sebze fideleri ile bazı sert ve yumuşak çekirdekli meyve fidanları satışının da gerçekleştiği, küçük çaplı ticari bir işletmedir. İşletmeci ile yapılan görüşmelerde, süs bitkilerinin Tarsus (Mersin) ilçesinden alındığı belirtilirken, bazı sebze fidelerinin Karataş (Adana) ilçesinden alındığı bazılarının ise piyasada satılan ticari tohumlardan yetiştirilerek elde edildiği belirtilmiştir. Domates bitkisi örneklerinin temin edildiği ticari işletmeye ilişkin çeşitli görüntüler Şekil 4.4’te verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.4. İşletmede satışı gerçekleştirilmekte olan bazı süs bitkileri (a), (b) ile çeşitli sebze fideleri ve meyve fidanlarına ilişkin görüntüler (c)

4.2.2. CEVd Etmeniyle Bulaşık Örneklerle Ait Simptomolojik Bulgular

Saksılı bir şekilde temin edilmiş olan ‘‘Çeri’’ çeşidi domates örneklerinde küçük boyutta ve kıvrık yaprak yapılarının görülmesi, bitkilerin tepe kısımlarında kümeleşme oluşumu ve boğum aralarının kısılması belirtilen (Şekil 4.5, Şekil 4.6) ile bitkilerde genel gelişim geriliği ve bodurluk belirtilen (Şekil 4.6, Şekil 4.7) gözlemlenmesi, mevcut örneklerin CEVd ile bulaşık olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 4.5. Örnek-1 domates bitkisinde gözlemlenen genel gelişim geriliği ve bitkinin bodur bir profile sahip olması



(a)



(b)

Şekil 4.6. Örnek-1 domates bitkisinde gözlemlenen yaprak boyutlarının küçük kalması ve boğum aralarının kısalması (a), yaprakların kıvrılarak bitkinin tepe kısmında kümeleşmesi (b)



(a)



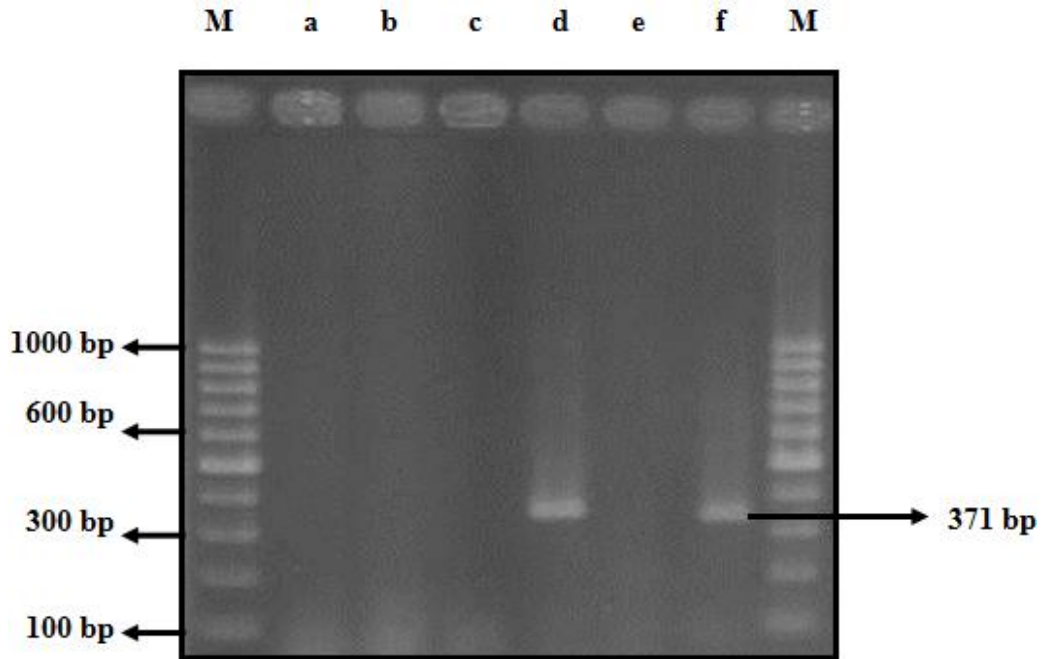
(b)

şekil 4.7. rnek-2 domates bitkisinde gözlemlenen genel gelişim geriliği ve bitkinin bodur bir profile sahip olması (a), yaprak boyutlarının küçük kalması ile boğum aralarının kısılması (b)

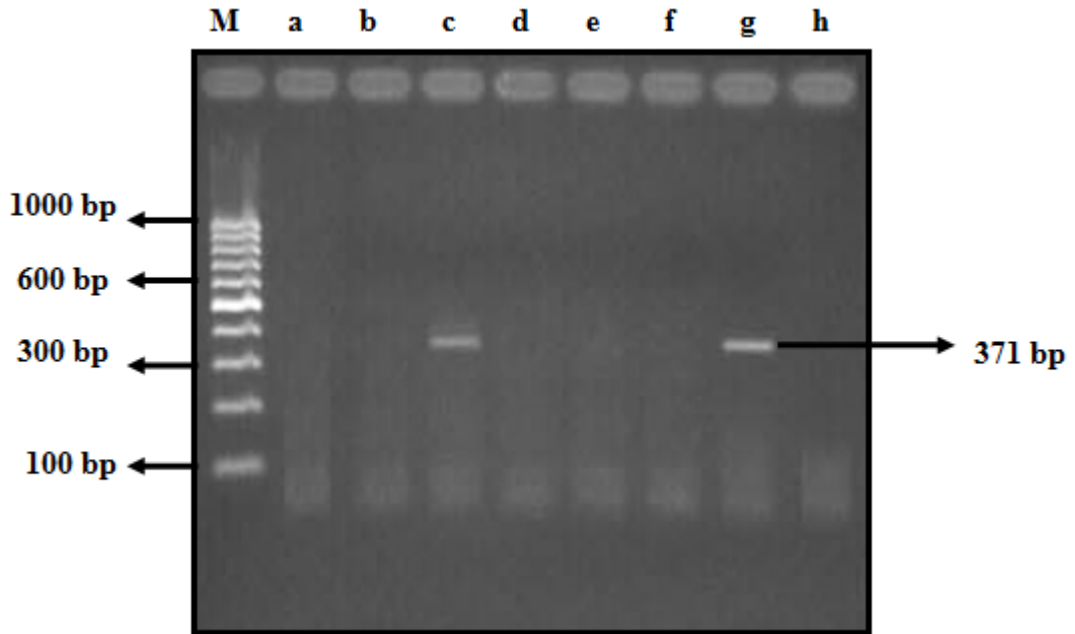
4.2.3. CEVd Etmeniyle Bulaşık Örneklerle Ait Moleküler Bulgular

4.2.3.1. RT-PCR ve Elektroforez Çalışmaları

Simptomolojik bazı gözlemlerin ardından yürütülen RT-PCR çalışmalarında, CEVd etmenine spesifik olan CEVd-FW (GTGCTCACCTGACCCTGCAGG) ile CEVd-RE (ACCACAGGAACCTCAAGAAAG) primer çifti (Önelge, 1997) kullanılarak, Örnek-1 ve Örnek-2 domates bitkilerinin CEVd ile bulaşık oldukları tespit edilmiştir. PCR düzeninin CEVd-FW ile CEVd-RE primer çiftinin uygun bağlanma sıcaklığı olan 58 °C sıcaklık koşullarına göre modifiye edildiği çalışmada, araştırmaya konu olan iki domates örneğine de ilişkin 371 bp'lik DNA fragmentleri, agaroz jeller (Şekil 4.8, Şekil 4.9) üzerinde görüntülenmiştir. Elektroforez işlemleri yürütülürken ‘‘Etrog citron’’ bitkilerinden izole edilmiş olan CEVd etmeni, pozitif kontroller olarak kullanılmış ve agaroz jeller üzerinde bu kontrol örneklerine ait 371 bp'lik DNA fragmentleri de görüntülenmiştir. Bu sayede, bulaşık domates örneklerinin oluşturduğu bant uzunlukları ile pozitif kontroller olarak kullanılan örneklerin aynı seviyelerde bant uzunluklarına sahip oldukları görülmüştür. Negatif kontroller olarak kullanılan steril distile suyun agaroz jeller üzerinde bant oluşturmaması ve modifiye edilen PCR düzeninin primerler açısından uygunluğu da, çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliğini sağlamıştır.



Şekil 4.8. RT-PCR ile testlenen Örnek-1 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), d: Örnek-1, f: Pozitif kontrol (CEVd)



Şekil 4.9. RT-PCR ile testlenen Örnek-2 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril distile su), c: Örnek-2, g: Pozitif kontrol (CEVd)

CEVd etmeninin farklı bitki türlerinden izole edilmiş çeşitli varyantlarının, değişebilen sayılarda nükleotide sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili dünyada yürütülmüş bazı moleküler çalışmalar incelendiğinde CEVd etmeninin patates bitkisinde 371 ve 373 (NCBI: EU877742.1, EU877745.1), *Impatiens walleriana* bitkisinde 373 (NCBI: DQ094296.1), *Scopolia sinensis* bitkisinde 373 (NCBI: EU877746.1), *Gynura aurantiaca* bitkisinde 369, 370, 371 ve 372 (NCBI: S67438.1, AF298178.1, AF298177.1, EU447280.1), Petunya türlerinde 371 ve 372 (NCBI: KC282383.1, KC282381.1), asma bitkisinde 369, 370 ve 371 (NCBI: Y00328.1, DQ471995.1, GU592444.1), *Verbena* türlerinde 372, 373 ve 375 (NCBI: JN872140.1, EF192396.2, DQ094297.1), *Cestrum aurantiacum* bitkisinde 374 (NCBI: HQ452417.1), *Solanum jasmionides* bitkisinde 372, 373 ve 374 (NCBI: AM774356.1, AM920649.1, AM774357.1), *Solanum rantonnetii* bitkisinde 370 (NCBI: HQ667138.1), bakla bitkisinde ise 370, 371, 372 ve 373 (NCBI: EF488068.1, EF488050.1, EF494677.1, S79831.1) gibi sayılarda nükleotid uzunluğa sahip olabildiği görülmektedir (NCBI Genbank). Konu ile ilgili ülkemizde yürütülmüş bazı moleküler çalışmalar incelendiğinde Çukurova Bölgesi'ndeki çeşitli turuncgil ağaçlarından elde edilen CEVd izolatu, *Citrus medica* ile *Gynura aurantiaca* bitkilerine inokule edilerek, bu bitkilerdeki CEVd etmeninin 371 nükleotide sahip olduğu tespit edilmiştir (Önelge, 1997). Doğu Akdeniz Bölgesi Bağ Alanlarındaki Viroidlerin Araştırılması konusunda yürütülmüş bir doktora tezi çalışmasında ise CEVd'inin "CEVd-g" olarak adlandırılan varyantının, çeşitli asma bitkilerinde 369 nükleotide sahip olduğu ortaya konulmuştur (Gazel, 2002).

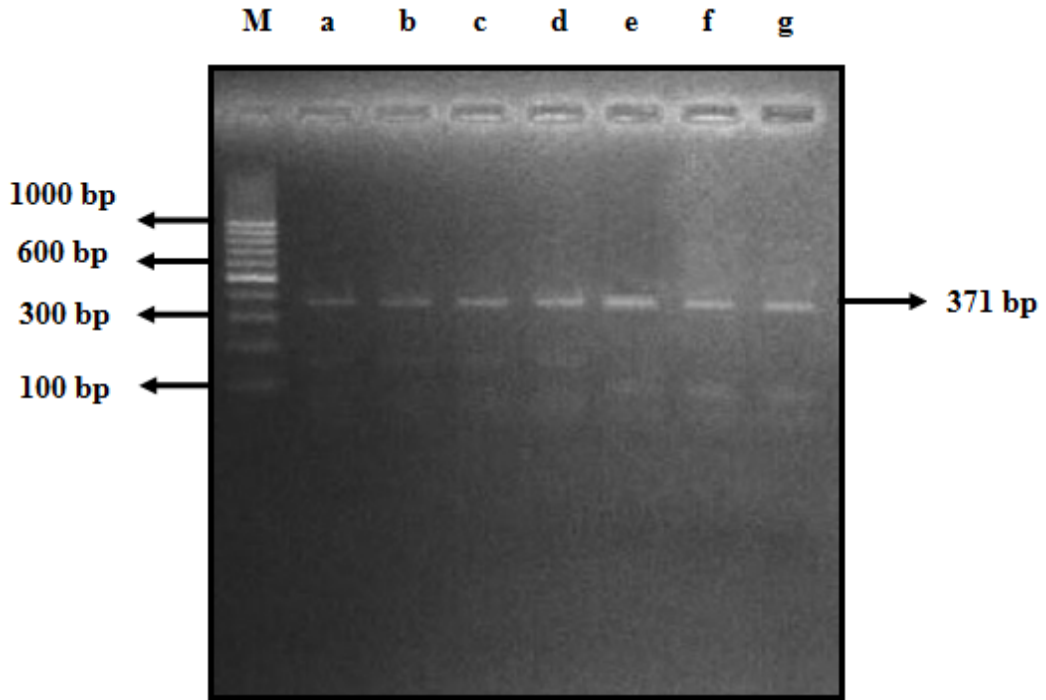
CEVd etmeni nedeni ile domates bitkilerinde meydana gelen çeşitli doğal enfeksiyonlarda, CEVd'inin değişebilen bazı sayılarda nükleotid uzunluklarına sahip olduğu yürütülen moleküler çalışmalar ile belirlenmiştir. Mishra ve arkadaşlarının (1991) yürüttüğü çalışmalarda CEVd'inin 372 nükleotid (NCBI: X53716.1) uzunluğuna sahip olduğu saptanırken, Verhoeven ve arkadaşlarının (2004) yürüttüğü çalışmalarda ise CEVd etmeninin 366 nükleotid (NCBI: AY372390.1) ve 375 nükleotid (NCBI: AY372391.1, AY372393.1) uzunluklarına sahip olduğu saptanmıştır.

CEVd ile deneysel olarak yürütülmüş mekanik inokulasyon çalışmalarında turunçgil türlerinden izole edilip domatese aktarılan CEVd etmeninin bu bitkide 372 nükleotid (NCBI: S67440.1), *Impatiens* türlerinden izole edilip domatese aktarılan CEVd etmeninin bu bitkide 373 nükleotid (NCBI: EU877743.1), *Verbena* türlerinden izole edilip domatese aktarılan CEVd etmeninin bu bitkide 374 nükleotid (NCBI: EU877744.1) ve bakladan izole edilip domatese aktarılan CEVd etmeninin bu bitkide 372 nükleotid (NCBI: EF494683.1) uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir (NCBI Genbank).

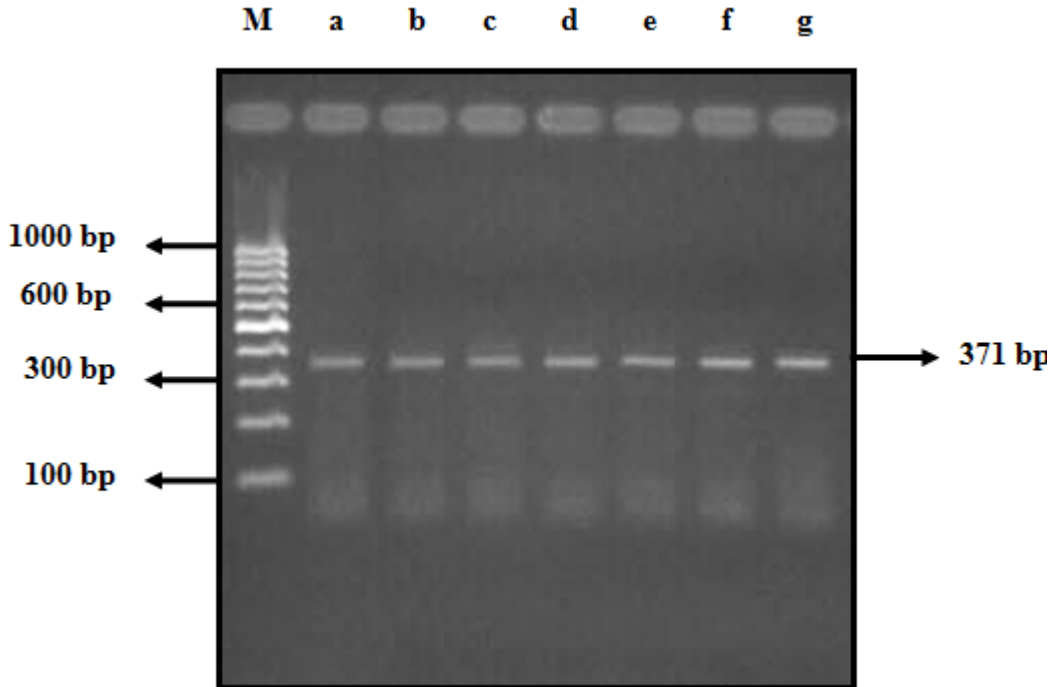
Yürütülen bu tez çalışması kapsamında, CEVd etmeni ile bulaşık oldukları belirlenen Örnek-1 ve Örnek-2 domates bitkilerinde, CEVd'inin 371 nükleotid uzunluğuna sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuç, CEVd'inin saptanan nükleotid uzunluğu bakımından, literatür bilgileri ve dünyada yapılmış çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

4.2.3.2. Bulaşık Bitkilere Ait Total Nükleik Asitlerin RT-PCR'da Çoğaltılması

CEVd etmeninin Rutaceae, Solanaceae, Vitaceae, Fabaceae, Asteraceae, Balsaminaceae, Compositae ve Verbenaceae familyalarını kapsayan, birçok farklı türdeki konukçularında, doğal ya da deneysel olarak enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir. Etmenin bu familyalardaki farklı bitki türlerinden izole edilmiş çeşitli varyantlarının, 366 – 475 arasında değişebilen sayılarda nükleotide sahip olduğu da, yürütülen bazı moleküler çalışmalarla ortaya konulmuştur (Duran-Vila ve Semancik, 2003; Singh ve ark., 2003a; Hammond ve Owens, 2006; Singh ve Dilworth, 2009). Yürütülen bu tez çalışması kapsamında, CEVd etmeninin Solanaceae familyasına ait domates bitkisine ilişkin iki örnekte de, 371 nükleotid uzunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, etmenin “CEVd” olduğunu belirtmekle birlikte, mevcut etmenin varyantı konusunda herhangi bir bilgi vermemektedir. Bu nedenle, CEVd etmeni ile bulaşık olduğu tespit edilen Örnek-1 ve Örnek-2 domates bitkilerine ait total nükleik asit örnekleri, RT-PCR yöntemi ile 200 ml hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu iki örneğe ilişkin agaroz jel görüntüleri de, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10. RT-PCR ile çoğaltılan CEVd'i bulaşık Örnek-1 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a-g: Örnek-1



Şekil 4.11. RT-PCR ile çoğaltılan CEVd'i bulaşık Örnek-2 domates bitkisine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, a-g: Örnek-2

4.2.3.3. Sekanslama İşlemleri ve İzolatların Baz Dizilimlerinin Görüntülenmesi

CEVd etmeni ile bulaşıklığı tespit edilip çoğaltılan izolatların saflaştırılması ve baz dizilimlerinin belirlenmesi, Adana ilinde bulunan ‘‘Molgentek’’ firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Örnek-1 ve Örnek-2 izolatlarına ilişkin baz dizilimleri CEVd etmenine spesifik ‘‘Forward’’ ile ‘‘Reverse’’ primer çiftine göre, iki ayrı şekilde de belirlenmiş ve ‘‘Finch TV’’ programı aracılığı ile görüntülenmiştir. Baz dizilimleri görüntülenen izolatlara ilişkin bilgiler, Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 ’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. CEVd’inin ‘‘Forward’’ ve ‘‘Reverse’’ primer çiftine göre belirlenen Örnek-1 izolatına ilişkin baz dizilimleri

Örnek-1	Baz Dizilimleri
Forward A: 177 G: 162 C: 190 T: 158 Toplam: 687 Nükleotid	TACTGCAGGCTGGCAGCCGGGAGCAGGTGAGCACCACAGGAACCTCA CGAAAGATCCCGAGGGACCCGGTCTAGGGTTCCGAGGGCTTTGACCC TCGCCCCGAGAGCACCTGAGAATCAAAAAAGCGGTACGGGGTTGAAG CTTCAGTTGTATCCACCGGGTAGTAGCCAGAGAGAAGCTCCGGGCGAG GGGCGCGCAGGCCTCAGCGACGATCGGATGTGGAGCCAGCAGCGAAA GGAAGGAGTCGAGCTCCTGTTTCTCCGCTGGACGCCAGTGATCCGCG GCGACCGAGGCGCAGTGCTCCCCCGACCTCGACTTCCTCCAGGTTTT CCAGGGGATCCCCTGAAGGTTTATAAGAACTTCTGTAGAATTAATTTT TTTCCCTTCATTGAGTATGATTTTCTCAACCTTACCTGCGCTTCCCCCT ATCACAGCAATTATTAATATACAACTGCTCCAATAACTCAGGATCTCCA TACATAAAATAAAGAGACATGGTTGGTTTCTGCCACCTTCGTTTCTTTT TCCTCCAGTCCACGAGGGAGGCGTCACTATCTCAATCACAGAACGATC TAGAATACTACTTTCTTGATACTGCGGGTCGAGGACATCCCCAAAAAAA AGAACCATACTGACTTATTGGTCCTTACAAAACTTAATCCTGCTCAACT CTTTTACTC
Reverse A: 111 G: 112 C: 154 T: 149 Toplam: 526 Nükleotid	CACAGTGGCGTCCAGCGGATAAACAGGACCTCGACTCCTTCCTTTTCGC TGCTGGCTCCGCATCCGATCGGCGCTGAGGCCTGCGCGCCCCCTCGCC CGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACTGAAGCTTCAA CCCCGTACCGCTTTTCTTGATTCTCAGCTGCTCTCCGGGCGAGGGTGA AAGCCCTCGGAACCCTAGAGAGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAGGTT CCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAGAAAAAAGAGGCG GGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGAATTTATTTTAGCTTACG AATTTTTTTTGTGTTGTGAAGATCTCCCCACTTATCTTATTTTTCGAACA ACTTGACCTGGGCCCCCTTTTCTCATCCATTATTAATTTCCATTCT CAATCATTCATGGTATACATATAAAAAATAAACACAAAGGCGTTGTCT TGCGACCACTTCTCTCTATTTTCTTCACTCCCGCTCA

Çizelge 4.2. CEVd'inin "Forward" ve "Reverse" primer çiftine göre belirlenen Örnek-2 izolatına ilişkin baz dizilimleri

Örnek-2	Baz Dizilimleri
Forward A: 281 G: 159 C: 250 T: 340 Toplam: 1030 Nükleotid	CTTATGCTTACACGATCCTGCACATCCCCCCTGTGACTTCAACCTTGTC CGAAGAGTCCAAGGAATGTCATTTATCACAAGTGGTGCAGTAGATAGAC CACAGAGTTCCATGCTACTACCCATGAGAACAAAAAGGAACTATC ATGAGAAGTTTTGATTTTGGTCCCATGTATACTTTATGCCATATATTAAT AATGGGTAAATTTTTCTGATCAATGAACTAACCAATTCTTATTATGGAC CAAAGAGGATCATGCCGAATTAATATAAAACCAAAGGAGTAAAATATTGG GAAGTGTGTCCTATTCATGTTGGTACCAGAGACTTAAACAAGCTCTACAA TTCAAATTTGAACTATTTTGCATTAAGTAGGAAATGTATAAATTGGTTAAA GACATGTCTCAATGGTGTTCGACTTCCTCCAGGTTTCCCTTCGACAAAAAT TAAGGTCCTCAAACACTGAGAATATATCATCTGGATTGGAGGTTTCATAA GTGAACCTCACTGATATCACGAATATTCACCGAAGCAGCTTCCTGTTTGA GTTGCTCAGCTCTTTCGATCACTTCCTCGTCGGGGTTCATACCTCTAGA ACTTAGGAAAGACTCTAACTCTGCAATTAGTCTATTCTTTGGGAATACT TTCTCTTCGAGTGTACCTTAGCATCAACTAGTTTCATCTGAACCCGTTT CTCACGCCAAACCTCAGCCATCTGCAACATCTTTCTTTCTTCATCTACTT CCTCCCTGAGTGAATGTGATTCTCTCTTCAATGCCTCGACTTCAGCCTTG TCTTCACCAATTTCTTGGCTAATTCTTCACACACTTTCTCTATCAACTC TCTACCCCTTTCTTTCTTTTTTCGTAATCCTTGCAAATAGCGCTTTTGCCT GATAACTTGGCATCAGCCACCTCATTAACCTAAGTGGCAGTTAACTATT TCCAGCCTCTGTCGGTTTTCTTCTCTTCTGGACAGTCGAGCTTTCTCATC CATCTATAATTGCTACCGATTTATCCTCA
Reverse A: 271 G: 190 C: 242 T: 334 Toplam: 1037 Nükleotid	GTACGCGCAACTTTCTTCTACCGGCTTTTGTCTTCACGTTCTGGTTTCT TTCGCATCTTCTGCCTATGTGGCATTGTCTCATGTCGTCTCTTGCTGTTT TTTTGTCTCAGTCCTAATAAGTTTGACATTAGGTTTTCATATATATTTGCC ATGATCTTCTTTGGACCTTAATAAATTTGGTTAGTTTCATTCTGAAA ATATTTACCCATTATTAATATATGTCTATATTCTTATACATGGGCCCCCTTA TCGATACTTCTCATGATATTTTCTTTTTTTGTTTCGACATGGCGTCACTAG CATGGAACCTGTCTGTGTCGACCTACTGCACCACTTGTGATTAATGACATT CCTGTGATTCTGAAAGCTTTGCCTTCATAGGGGATTTTGTCTTGA TTTTGATCAGCAGAACTTACTTGGTCCTTTGCCTGCCTTCAAGGATCCCC GGAAGTCAGTATCTCAACCTCCAATAGCACTCTCATCGACATGAATAATA CGATGTGTTGCCGCATCTTAAACAGCCTCTGAAGCATCGACGTCTTCTT CCTCAGATGTACACACAGACTGTGCGACGACAAGACATGTCATCGTTAC TTCTGACCAATTGAAGGGATGACTTAATACATGATCCACTGATGAATAGG AAAGATTCTGTGAACGAATCTCATACGTTGATAAGGAAAAGAGCTAATTC TTCTACACCCACGGCTACACCTCGTGGTTTTCAGTGGCACAAGATGATT GTCTGATAACGATCTCACCGGGATTCTCTATTGAAGAGGACAAGTACAC TGGGATACTGACTTATGGGAGAACTCCCAACGTCATAGGCATCTAAGCT GCACTGATCCCGCTGCATCCATGATAGTTTCGCTGATGAAAACGGAGCTA CAAGGAAGCATCATGGGCACCTTCCCCGATGTGTCTAGAAGGCAATCAT CCTCGGGACCCAGAAATCATATTTATTACAATGATATTATCACGTCAGT CAGTTATAACTAAGAACCACAATTCCTACTATAATCGAAT

DNA dizi belirleme ya da sekanslama işlemleri, DNA'nın birincil yapılarının tayin edilmesinde ve baz dizilimlerinin belirlenmesinde birçok araştırmacı tarafından etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da, domates bitkisinden izole edilen CEVd'e ait baz dizilimleri sekanslama işlemleri sonucunda belirlenmiştir. Örnek-1 izolatının CEVd-FW primerine göre belirlenen baz sayısının 687 olduğu (A: 177, G: 162, C: 190, T: 158) görülürken, CEVd-RE primerine göre belirlenen baz sayısının ise 526 olduğu (A: 111, G: 112, C: 154, T: 149) görülmüştür. Örnek-2 izolatının CEVd-FW primerine göre belirlenen baz sayısının 1030 olduğu (A: 281, G: 159, C: 250, T: 340) görülürken, CEVd-RE primerine göre belirlenen baz sayısının ise 1037 olduğu (A: 271, G: 190, C: 242, T: 334) görülmüştür.

4.2.3.4. İzolatların NCBI Veri Tabanındaki Organizmalarla Karşılaştırılması

Baz dizilimleri belirlenen Örnek-1 ve Örnek-2 izolatları, NCBI veri tabanında kayıtlı bazı organizmalar ile "BLAST" yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Örnek-2 izolatına ilişkin baz dizilimlerinin NCBI veri tabanında kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılması sonucunda, bu örneğin sadece domates bitkilerine ait genomlar ile eşleştiği görülmüştür. Firma tarafından yürütülen viroid saflaştırma işlemlerinin bu örnek açısından sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilememesinin, böyle bir sonuca yol açtığı düşünülmektedir. Örnek-2 izolatına ait bitkisel materyalin yeniden tedarik edilememesi sebebi ile de, viroid saflaştırma çalışmaları bir daha tekrarlanamamıştır. Sonuç olarak, Örnek-2 izolatının NCBI veri tabanında karşılaştırılan organizmalar açısından bazı yanıltıcı sonuçlar içerdiği göz önünde bulundurulmuş ve yürütülen mevcut karşılaştırma çalışması sadece Örnek-1 izolatı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Örnek-1 izolatının "Forward" primerine göre sentezlenen baz diziliminin esas alındığı karşılaştırmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Örnek-1 izolatu ile NCBI veri tabanında kayıtlı bazı CEVd izolatlarının karşılaştırılması

Açıklama	Benzerlik Oranı (%)	Erişim Numarası
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-tun/cl4	% 98	AF540963.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-tun/cl1	% 97	AF540960.1
Citrus exocortis viroid isolate EK4-CEVd	% 97	JX885867.1
Citrus exocortis viroid isolate 14-1.13-CEVd	% 97	JX259392.1
Citrus exocortis viroid isolate GB14	% 97	GQ260199.1
Citrus exocortis viroid CEVd-225	% 96	U21126.1
Citrus exocortis viroid isolate b	% 96	FJ626864.1
Citrus exocortis viroid isolate a	% 96	FJ626863.1
Citrus exocortis viroid isolate EK3-CEVd	% 96	JX885866.1
Citrus exocortis viroid clone CEVd-1	% 96	KJ538554.1
Citrus exocortis viroid clone CEVd-2	% 96	KJ538555.1
Citrus exocortis viroid clone CEVd-2.8	% 96	GU825890.1
Citrus exocortis viroid isolate d	% 96	FJ626866.1
Citrus exocortis viroid isolate BSE	% 96	EF186991.1
Citrus exocortis viroid isolate LMPE7	% 96	EF126047.1
Citrus exocortis viroid clone CEVd-2.1	% 96	GU825981.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.Sy1	% 96	LN681196.1
Citrus exocortis viroid isolate LMPE3	% 96	EF186989.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-tun/cl3	% 95	AF540962.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-tun/cl2	% 95	AF540961.1
Citrus exocortis viroid variant KA genomic RNA	% 95	AB054598.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.012	% 94	HQ284022.1
Citrus exocortis viroid isolate Hn-G1	% 94	GU592444.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.018	% 94	HQ284028.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.008	% 94	HQ284018.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.005	% 94	HQ284015.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.004	% 94	HQ284014.1
Citrus exocortis viroid isolate CSC10	% 94	DQ471995.1
Citrus exocortis viroid isolate CSC11	% 94	DQ471996.1
Citrus exocortis viroid isolate ISA 8-NA-I	% 94	DQ400342.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.015	% 94	HQ284025.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.013	% 94	HQ284023.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.011	% 94	HQ284021.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.010	% 94	HQ284020.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.007	% 94	HQ284017.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.006	% 94	HQ284016.1
Citrus exocortis viroid isolate TL5	% 94	EU564172.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-19	% 94	EF488050.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-20	% 94	EF488049.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.017	% 94	HQ284027.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-HB	% 94	AY456136.1
Citrus exocortis viroid isolate Severe clone 1	% 93	EU382202.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-ZGS-ZK China	% 93	DQ431996.1
Citrus exocortis viroid isolate 1	% 93	EU512994.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd.003	% 93	HQ284013.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-18	% 93	EF488051.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-Italy-BL China	% 93	DQ431994.1

Çizelge 4.3. (Devamı)

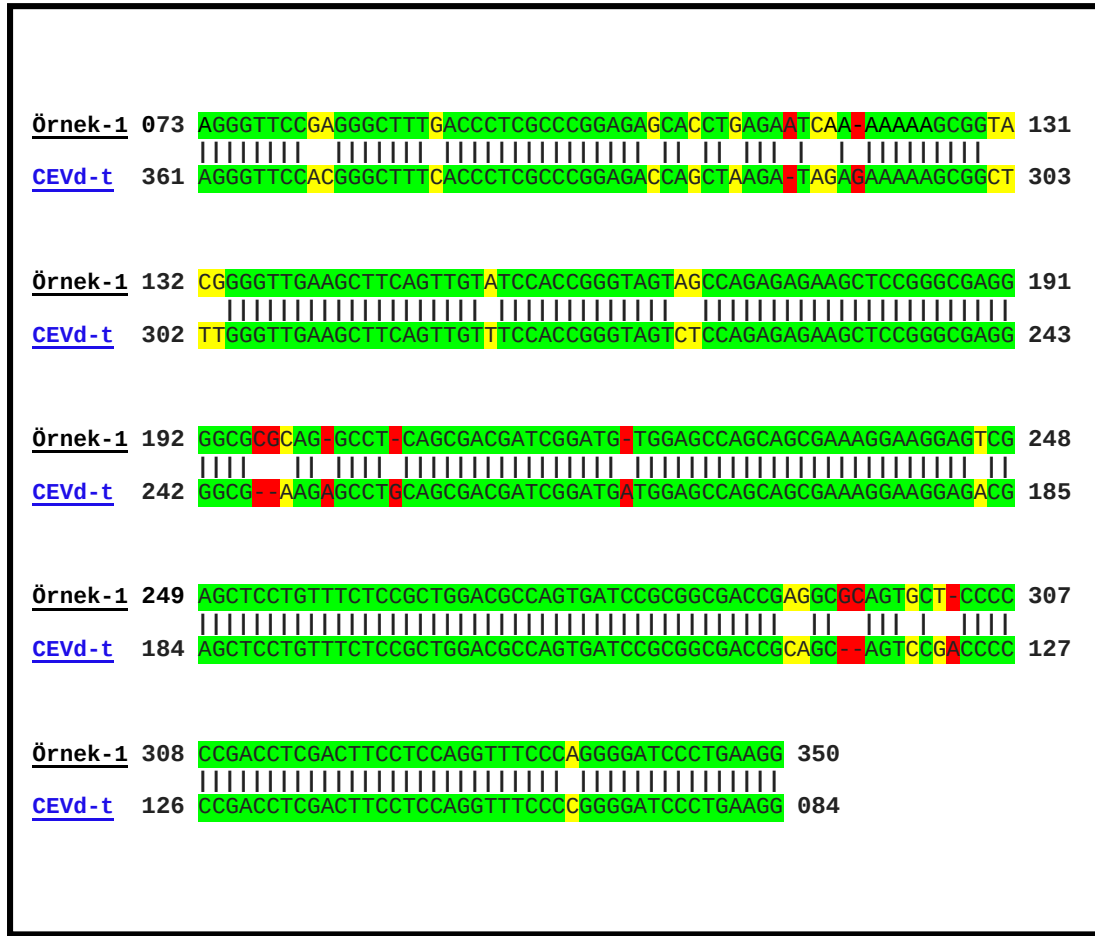
Citrus exocortis viroid strain severe CEVd-YN	% 93	DQ831486.1
Citrus exocortis viroid isolate S3	% 93	GQ246191.1
Citrus exocortis viroid isolate S1	% 93	GQ246192.1
Citrus exocortis viroid isolate 1 from murcott	% 93	KJ956799.1
Citrus exocortis viroid, strain de26	% 93	K00965.1
Citrus exocortis viroid isolate 159-1	% 93	KF973205.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-XNM-ZK	% 93	DQ431991.1
Citrus exocortis viroid (CEVd-JB)	% 93	M30870.1
Citrus exocortis viroid isolate 2 from kumquat	% 93	KJ956802.1
Citrus exocortis viroid isolate 1 Exo100-9	% 93	JX237457.1
Citrus exocortis viroid isolate18-1.29-CEVd	% 93	JX259396.1
Citrus exocortis viroid isolate S2	% 93	GQ246194.1
Citrus exocortis viroid clone A2-C-2	% 93	FJ773254.1
Citrus exocortis viroid clone A2-C-1	% 93	FJ773253.1
Citrus exocortis viroid isolate TL2	% 93	EU564170.1
Citrus exocortis viroid isolate ISA 3-RC-I	% 93	AY523584.1
Citrus exocortis viroid isolate 205-E-2 Uy	% 93	AF428059.1
Citrus exocortis viroid variant E127 genomic RNA	% 93	AB054595.1
Citrus exocortis viroid isolate 205-E-5 Uy	% 93	AF428060.1
Citrus exocortis viroid isolate 205-E-1 Uy	% 93	AF428058.1
Citrus exocortis viroid clone MO-D6-m	% 93	KJ810546.1
Citrus exocortis viroid clone A2-C-5	% 93	FJ773257.1
Citrus exocortis viroid isolate 2 from Colombia	% 93	EU517117.1
Citrus exocortis viroid isolate ISA 2-SR-I	% 93	AY523583.1
Citrus exocortis viroid isolate 054-13uy	% 93	AY514445.1
Citrus exocortis viroid isolate 206-2	% 93	AF458771.1
Citrus exocortis viroid(CEV-DE30)	% 93	M30871.1
Citrus exocortis viroid isolate 1 from kumquat	% 93	KJ956801.1
Citrus exocortis viroid (CEVdg-S)	% 93	AF298177.1
Citrus exocortis viroid (CEVdg-M)	% 93	AF298178.1
Citrus exocortis viroid isolate NiagD11	% 92	DQ444474.1
Citrus exocortis viroid variant AD genomic RNA	% 92	AB054592.1
Citrus exocortis viroid isolate imp3	% 92	EU877746.1
Citrus exocortis viroid isolate 8900808	% 92	AY372390.1
Citrus exocortis viroid isolate 89002600	% 92	AY372393.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-f-1	% 92	EF494677.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-3	% 92	EF488066.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-7	% 92	EF488062.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-i-12	% 92	EF488057.1
Citrus exocortis viroid isolate ISA 1-CT-I	% 92	AY523582.1
Citrus exocortis viroid, complete genome	% 92	J02053.1
Citrus exocortis viroid (CEV-JA)	% 92	M30869.1
Citrus exocortis viroid RNA sequence	% 92	M34917.1
Citrus exocortis viroid isolate 54-E-18 Uy	% 92	AF428064.1
Citrus exocortis viroid isolate imp1	% 92	EU877742.1
Citrus exocortis viroid isolate 89002594	% 91	AY372391.1
Citrus exocortis viroid strain 4-25	% 91	KC282381.1
Citrus exocortis viroid strain 4-35	% 91	KC282382.1
Citrus exocortis viroid isolate ver2	% 91	EU877745.1
Citrus exocortis viroid isolate sr 1	% 91	HQ667138.1
Citrus exocortis viroid Sj 2	% 91	AM774357.1
Citrus exocortis viroid isolate CEVd-DI 56	% 91	DQ094296.1
Citrus exocortis viroid isolate 3123575	% 91	EF192396.2

Örnek-1 izolatının “Forward” primerine göre sentezlenen baz diziliminin esas alındığı karşılaştırmalarda, karşılaştırılan ilk 100 CEVd’i izolatı içinde Örnek-1 NCBI veri tabanında kayıtlı CEVd’i izolatlarına % 91’den % 98’e varan oranlarda sekans benzerliği göstermiştir. Bu veriler incelendiğinde Örnek-1 izolatı ile sekans benzerliği gösteren çoğu CEVd’i izolatının, çeşitli ülkelerdeki “*Citrus*” cinsine ait türlerden bildirildiği görülmüştür. Örnek-1’e en yüksek oranda sekans benzerliği gösteren ve bu benzerlik oranının da % 97 ile % 98 olduğu, ilk beş CEVd’i izolatının ise Mandarin (*C. reticulata*), Portakal (*C. sinensis*) ve Greyfurt (*C. paradisi*) türlerinden bildirildiği görülmüştür. “*Citrus*” cinsine dahil olan türlerin dışında, farklı bitki türlerinden bildirilmiş CEVd’i izolatları da Çizelge 4.3’te belirtilmiştir. Aynı türe ait bitkilerin aynı renklerle belirtildiği çizelgede; asma (●), bakla (●), patates (●), domates (●), *Gynura aurantiaca* (●), *Scopolia sinensis* (●), *Petunia hybrida* (●), *Solanum rantonnetii* (●), *Solanum jasmionides* (●), *Impatiens walleriana* (●) ve *Verbena* türleri (●) gibi farklı bitkilerden bildirilmiş, CEVd’i izolatları da bulunmaktadır.

Çalışmada domates bitkilerinde doğal şekilde enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiş çeşitli CEVd’i izolatları ile Örnek-1 izolatı baz dizilimleri açısından ayrı olarak karşılaştırılmış, bu karşılaştırma sonuçlarına ilişkin veriler de Çizelge 4.4, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’te şematize edilmiştir.

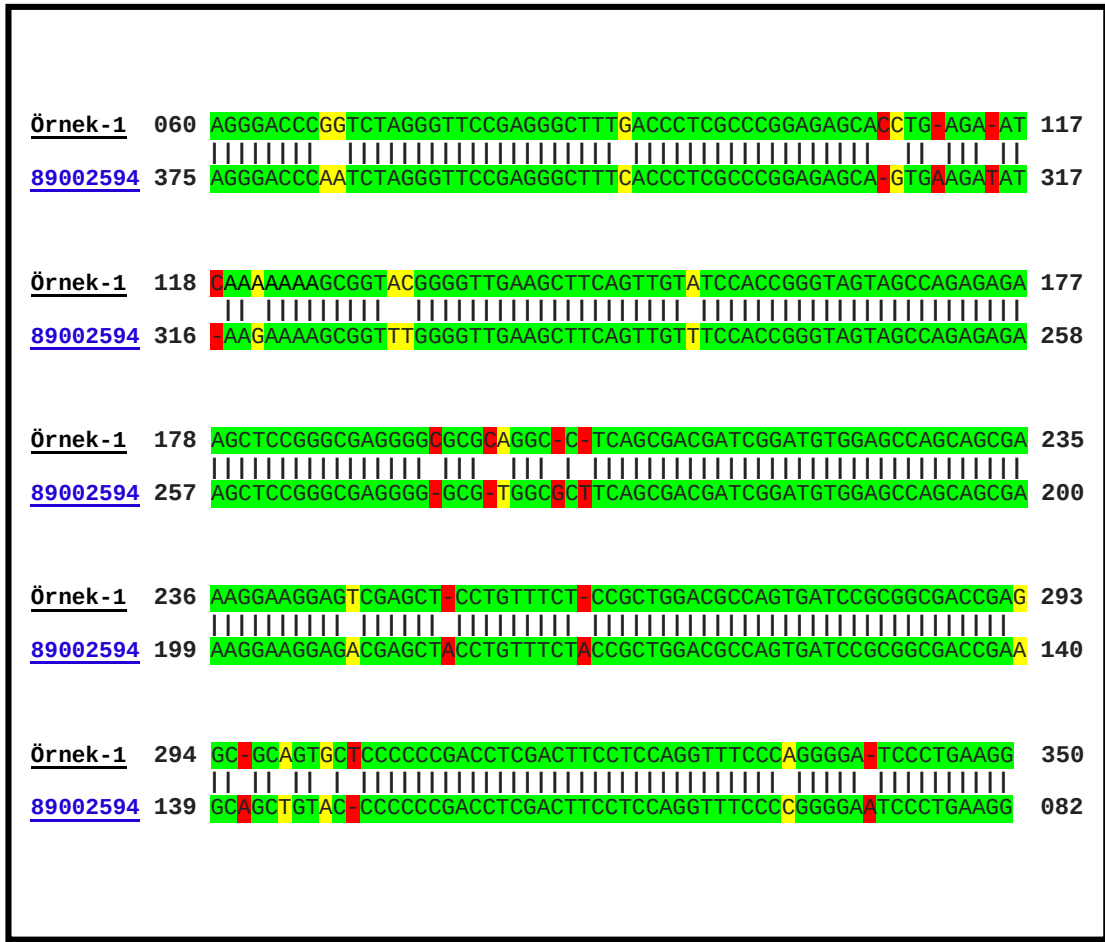
Çizelge 4.4. Örnek-1 izolatıyla domates bitkilerinden bildirilmiş CEVd’i izolatlarının baz dizilimleri açısından karşılaştırılması

İzolat Adı	Erişim Numarası	Orjin	Nükleotid Sayısı	Benzerlik Oranı (%)	Referans
CEVd-t	X53716.1	Hindistan	372	% 89	Mishra ve ark., 1991
89002594	AY372391.1	Hollanda	375	% 91	Verhoeven ve ark., 2004
8900808	AY372390.1	Hollanda	366	% 92	Verhoeven ve ark., 2004
89002600	AY372393.1	Hollanda	375	% 92	Verhoeven ve ark., 2004



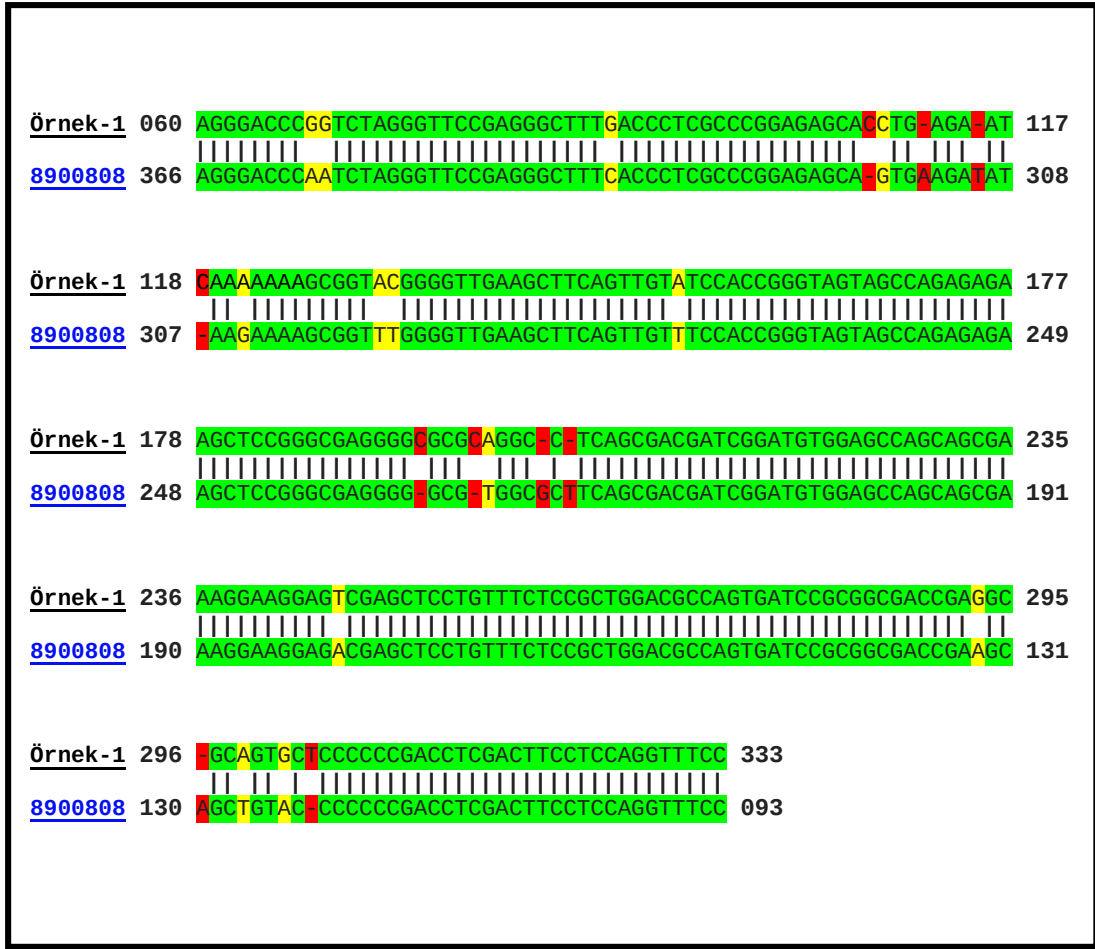
Şekil 4.12. Örnek-1 ve CEVd-t izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması

1979 yılında Hindistan’da, arazi koşullarında yetiştirilen domates bitkilerinde hastalık oluşturan ve CEVd etmeninin domates bitkisindeki bir ırkı olduğu belirlenen CEVd-t izolatının, 372 nükleotide sahip olduğu Mishra ve arkadaşlarının (1991) yürüttüğü moleküler çalışmalar ile ortaya konulmuştur. CEVd-t izolatı ile Örnek-1 izolatı karşılaştırıldığında, izolatların nükleotidlerinin eşleşen bazı kısımlarındaki benzerlik oranının % 89 (251/283) olduğu belirlenmiştir. İzolatların karşılaştırdığı 283 adet baz çifti incelendiğinde de, bu izolatlara ait 251 adet baz çiftinin birebir eşleştiği görülmüştür. Eşleşmenin gerçekleşmediği geri kalan 32 adet baz çiftinden 22’sinde bazı yer değişimlerinin olduğu görülürken, diğer 10 adet bazın yerlerinde ise çeşitli baz eksikliklerinin olduğu belirlenmiştir.



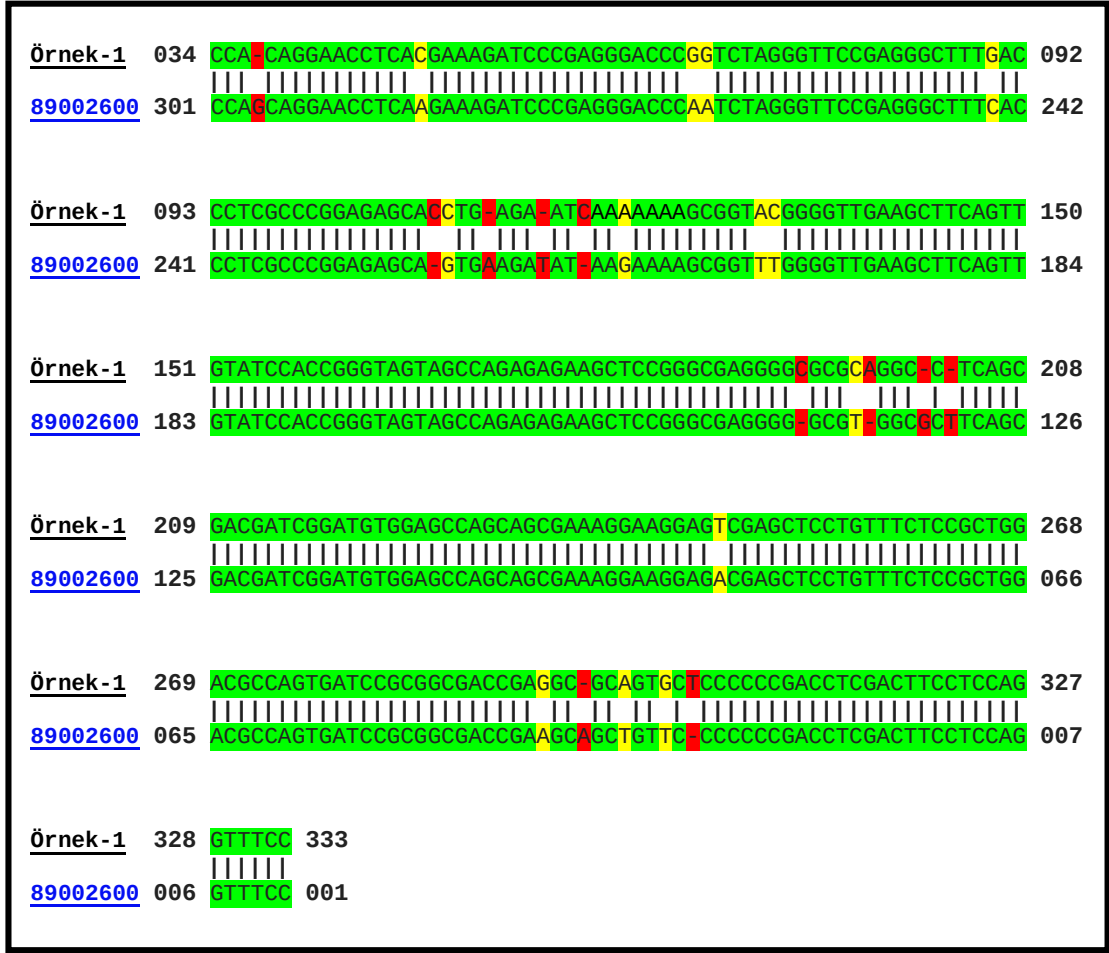
Şekil 4.13. Örnek-1 ve 89002594 izolatlarının baz dizimlerinin karşılaştırılması

2002 yılında Hollanda’da, seralarda yetiştirilen ‘‘Dombito’’ çeşidi domates bitkilerinde hastalık oluşturan CEVd etmeninin 89002594 izolatının, 375 nükleotide sahip olduğu Verhoeven ve arkadaşlarının (2004) yürüttüğü moleküler çalışmalar ile ortaya konulmuştur. 89002594 izolatı ile Örnek-1 izolatı karşılaştırıldığında, mevcut izolatların nükleotidlerinin eşleşen bazı kısımlarındaki benzerlik oranının % 91 (272/299) olduğu belirlenmiştir. İzolatların karşılaştıran 299 adet baz çifti incelendiğinde de, bu izolatlara ait 272 adet baz çiftinin birebir eşleştiği görülmüştür. Eşleşmenin gerçekleşmediği geri kalan 27 adet baz çiftinden 14’ünde bazı yer değişimlerinin olduğu görülürken, diğer 13 adet bazın yerlerinde ise çeşitli baz eksikliklerinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Örnek-1 ve 8900808 izolatlarının baz dizilimlerinin karşılaştırılması

2002 yılında Hollanda’da, seralarda yetiştirilen “Rondella” çeşidi domates bitkilerinde hastalık oluşturan CEVd etmeninin 8900808 izolatının, 366 nükleotide sahip olduğu Verhoeven ve arkadaşlarının (2004) yürüttüğü moleküler çalışmalar ile ortaya konulmuştur. 8900808 izolatı ile Örnek-1 izolatı karşılaştırıldığında, mevcut izolatların nükleotidlerinin eşleşen bazı kısımlarındaki benzerlik oranının % 92 (256/279) olduğu belirlenmiştir. İzolatların karşılaştıran 279 adet baz çifti incelendiğinde de, bu izolatlara ait 256 adet baz çiftinin birebir eşleştiği görülmüştür. Eşleşmenin gerçekleşmediği geri kalan 23 adet baz çiftinden 13’ünde bazı yer değişimlerinin olduğu görülürken, diğer 10 adet bazın yerlerinde ise çeşitli baz eksikliklerinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Örnek-1 ve 89002600 izolatlarının baz dizimlerinin karşılaştırılması

2002 yılında Hollanda’da, seralarda yetiştirilen “Criterium” çeşidi domates bitkilerinde hastalık oluşturan CEVd etmeninin 89002600 izolatının, 375 nükleotide sahip olduğu Verhoeven ve arkadaşlarının (2004) yürüttüğü moleküler çalışmalar ile ortaya konulmuştur. 8900600 izolatı ile Örnek-1 izolatı karşılaştırıldığında, mevcut izolatların nükleotidlerinin eşleşen bazı kısımlarındaki benzerlik oranının % 92 (282/306) olduğu belirlenmiştir. İzolatların karşılaşılan 306 adet baz çifti incelendiğinde de, bu izolatlara ait 282 adet baz çiftinin birebir eşleştiği görülmüştür. Eşleşmenin gerçekleşmediği geri kalan 24 adet baz çiftinden 13’ünde bazı yer değişimlerinin olduğu görülürken, diğer 11 adet bazın yerlerinde ise çeşitli baz eksikliklerinin olduğu belirlenmiştir.

4.2.3.5. Filogenetik Analiz Çalışmaları

Yürütülen filogenetik analiz çalışmaları kapsamında bazı ülkelerden bildirilen CEVd etmeninin, farklı konukçularından elde edilmiş varyantları ile Örnek-1 izolatu karşılaştırılmış ve soyağacı tablosu oluşturulmuştur. Örnek-1 izolatinin “Forward” primerine göre sentezlenen baz diziliminin esas alındığı karşılaştırma çalışmalarında, karşılaştırılan bazı CEVd’i varyantlarına ilişkin baz dizimleri NCBI veri tabanında kayıtlı bulunan çeşitli izolatlardan seçilmiştir. Örnek-1 izolatu ile karşılaştırılan DNA dizileri ise “Mega 6” programı kullanılarak, “Neighbour Joining” metodu ile sınıflandırılmıştır. Karşılaştırma çalışmalarına ilişkin elde edilen bazı sonuçlar Çizelge 4.5’te, karşılaştırılan CEVd’i varyantları ile Örnek-1 izolatinin filogenetik yakınlıklarını gösteren soyağacı tablosu ise Şekil 4.16’da şematize edilmiştir.

Çizelge 4.5. Örnek-1 izolatıyla bildirilen bazı CEVd’i varyantlarının karşılaştırılması

Varyant Adı	Erişim Numarası	Konukçu Bitki Türü	Bildirilen Ülke	Nükleotid Sayısı	Benzerlik Oranı (%)
CEVd-tun/cl4	AF540963.1	Mandarin (<i>C. reticulata</i>)	Tunus	371	% 98
EK4-CEVd	JX885867.1	Portakal (<i>C. sinensis</i>)	Yunanistan	370	% 97
BSE	EF186991.1	Turunç (<i>C. aurantium</i>)	İran	370	% 96
CEVd-225	U21126.1	Greyfurt (<i>C. paradisi</i>)	İsrail	368	% 96
LMPE3	EF186989.1	Üç Yaprak (<i>P. trifoliata</i>)	İran	370	% 96
Variant KA	AB054598.1	Ağaç Kavunu (<i>C. medica</i>)	Japonya	372	% 95
ISA 8-NA-I	DQ400342.1	Limon (<i>C. limon</i>)	İtalya	371	% 94
CEVd-i-20	EF488049.1	Bakla (<i>Vicia faba</i>)	İspanya	371	% 94
Hn-G1	GU592444.1	Asma (<i>Vitis vinifera</i>)	Çin	371	% 94
CEVdg-S	AF298177.1	Mor Kadife Çiçeği (<i>G. aurantiaca</i>)	ABD	371	% 93
CEVd 2	KJ956802.1	Kamkat (<i>C. japonica</i>)	Çin	382	% 93
8900808	AY372390.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	366	% 92
89002600	AY372393.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	375	% 92
89002594	AY372391.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	375	% 91
CEVd-t	X53716.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hindistan	372	% 89



“Çeri” çeşidi domates bitkisinden elde edilmiş olan Örnek-1 izolatıyla farklı ülkelerden ve farklı bitki türlerinden bildirilmiş bazı CEVd’i varyantlarından seçilen çeşitli izolatların, nükleotid düzeyinde karşılaştırılması sonucunda % 89 – 98 arasında değişen bazı oranlarda sekans benzerliklerinin bulunduğu saptanmıştır. % 98 oran ile Örnek-1’e en fazla sekans benzerliği sergileyen izolatin Tunus izolatu (AF540963.1) olduğu görülürken, Hindistan izolatinin (X53716.1) ise % 89 oran ile Örnek-1’e daha düşük bir sekans benzerliği sergilediği görülmüştür. Örnek-1 izolatinin Çizelge 4.5’te çeşitli bilgileri verilmiş bazı dünya izolatlarıyla filogenetik yakınlıklarının karşılaştırılabilmesi için oluşturulan Şekil 4.16’daki soyağacında ise, farklı bitkilerden bildirilen CEVd’i izolatlarının birbirilerine olan filogenetik yakınlık dereceleri görülebilmektedir. Sözü edilen filogenetik soyağacı incelendiğinde ağacın genel olarak iki ana kol, bu iki ana kola bağlı alt kollar ve alt kolların da dallanarak oluşturduğu çeşitli grup ile alt gruplardan meydana geldiği görülmektedir. Mevcut bu soyağacında izolatların birbirileri ile bağlantısını sağlayan kollar üzerindeki rakamlar ise, izolatların birbirilerine olan filogenetik yakınlık derecelerini belirtmektedir.

Sonuç olarak, Örnek-1 izolatu filogenetik soyağacında bu izolata % 96 – 98 arasında değişen oranlarda sekans benzerliği sergileyen AF540963.1, JX885867.1, U21126.1, EF186989.1 ve EF986991.1 izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Bu grup, çeşitli bazı turuncgil türlerinden bildirilen CEVd’i izolatlarından olmakla birlikte Tunus, Yunanistan, İsrail ve İran izolatlarından oluşmuştur. Örnek-1’e % 98 oranında sekans benzerliği sergileyen ve mandarin bitkisinden bildirilmiş olan, Tunus izolatu (AF540963.1) ise Örnek-1’e daha yakın bir filogenetik benzerlik sergilemiş ve bu izolatla oluşturduğu bir alt grupta bir arada yer almıştır. Örnek-1’e % 89 – 92 arasında değişen bazı oranlarda sekans benzerliği sergileyen ve domates bitkilerinden bildirilmiş olan, Hollanda (AY372390.1, AY372391.1 ve AY372393.1) ile Hindistan (X53716.1) izolatlarının ise aynı grupta ve farklı dallarda yer aldığı görülmüştür. Bu izolatlar soyağacında, Örnek-1 izolatına daha uzak bir filogenetik benzerlik sergilemiş ve ayrı bir grupta yer almıştır.

4.2.4. Domates Örneklerindeki CEVd Etmeninin Kaynağına Ait Olasılıklar

Yürütülen bu tez çalışması ile, saksılı olarak temin edilmiş “Çeri” çeşidi domates örneklerinde saptanan CEVd etmeninin kaynağına ilişkin bazı olasılıklar aşağıda sıralanmıştır.

Bitkilerin ana üretim materyalinin bulaşık olması: CEVd etmeni ile bulaşık “Çeri” çeşidi domates bitkisi örneklerinin alındığı işletme sahibiyle yapılan görüşmelerde; işletmeci satışını gerçekleştirdiği bu bitkileri, piyasada Standart ve F1 olarak satılmakta olan bazı ticari tohumlardan yetiştirerek elde ettiğini bildirmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, 231 adet virüs ve viroid hastalığının bazı farklı bitki türlerinin tohumları ile taşınabildikleri bilinmektedir (King ve ark., 2011). CEVd etmeni bilinen bu patojenler arasında yer almamakla birlikte, etmenin domates bitkilerinin tohumları ile taşınabildiğine yönelik de kesin bir veri bulunmamaktadır. Yürütülen mekanik inokulasyon denemelerinde ise, CEVd’inin tohumlardan fidelere taşınımının gözlemlenemediği belirtilmiştir (Faggioli ve ark., 2015). Bu çalışma ile elde edilen CEVd etmeninin asıl kaynağının, domates bitkilerinin yetiştirildiği tohumlar olması, mevcut literatürlere göre düşük bir ihtimal olarak düşünülmektedir.

Vektörel yollarla taşınma durumu: CEVd etmeninin henüz, bilinen doğal bir vektör zararlısı bulunmamaktadır (Hardy ve ark., 2008). Yürütülen bazı deneysel çalışmalarda da, bu etmenin *Toxoptera aurantii* (Turunçgil Siyah Yaprak Biti) ve *Aphis gossypii* (Pamuk Yaprak Biti) ile taşınmadığı belirtilmiştir (Norman, 1963). Tam parazit bir yabancı ot olarak bilinen küsküt cinsine ait “*Cuscuta subinclusa*” türünün CEVd etmenine vektörlük edebileceği ise, yürütülen bir çalışma ile ortaya konulmuştur (Weathers, 1965). CEVd etmeni ile bulaşıklığı tespit edilen domates örneklerinin saksılı olarak temin edilmiş olması, saksılarda herhangi bir yabancı otun bulunmaması ve CEVd etmeninin vektör zararlılarla taşınabilme durumları göz önüne alındığında, vektörel bir taşınımın düşük bir olasılıkla gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Gen aktarımı: Son yıllarda oldukça popüler bir uğraşı haline gelen süs sebzeciliğinde; bodur, saksıda kolaylıkla yetişen ve çabuk olgunlaşabilen bitki türleri kullanılmaktadır. Bu bitkilerin bir kısmı geleneksel ıslah yöntemleriyle elde edilirken

gen aktarımı yolu ile elde edilen, çeşitli bitki örnekleri de mevcut bulunmaktadır. Domates bitkisi 1994 yılından beri, istenilen çeşitli özelliklerin kazandırılması amacı ile gen aktarımı çalışmalarında kullanılmaktadır. Viroidler bakımından yürütülmüş bir çalışmada ise, ribozimin hedef RNA'ya bağlanma yeteneği kullanılarak CEVd'e dayanıklı transgenik domates bitkisi yetiştirilmiştir (Atkins ve ark., 1995). Ülkemizde üretilmekte olan domates bitkilerinin ebeveyn tohumlarının büyük oranda ithal edildiği ve ithalatın gerçekleştiği birçok ülkede de, transgenik domates üretiminin yaygın durumda olduğu bilinmektedir. Bu durum, saksılı olarak temin edilen "Çeri" çeşidi domates bitkilerine de gen aktarımı yolu ile bodurluk özelliğinin kazandırılmış olabileceğini düşündürmektedir.

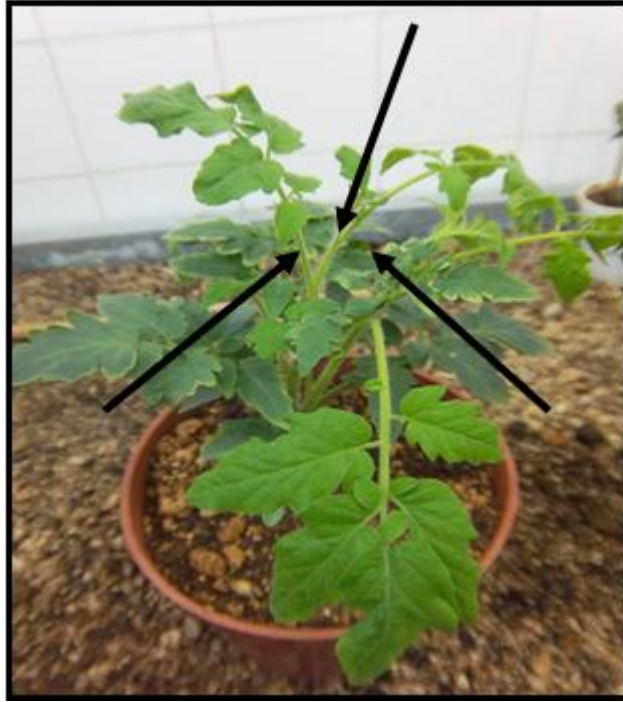
Mekanik yollarla taşınma durumu: Mekanik taşınma, arazi koşullarında viroidlerin enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere aşı bıçakları, budama makasları ve çeşitli tarımsal ekipmanlar ile bulaşmasıyla gerçekleşmektedir (Roistacher, 1991). Viroidlerin çeşitli bazı maddelerin yüzeylerine bağlanarak, canlılıklarını uzun süre koruyabildikleri de bilinmektedir (Spence, 2004). Arazide semptomlu/semptomsuz olarak bulunabilen bazı konukçuların ise, kültürü yapılan bitkiler açısından kaynak oluşturabildiği bildirilmiştir (Flores ve Owens, 2010; Di-Serio ve ark., 2014). CEVd ile bulaşık domates bitkisi örneklerinin alındığı ticari işletmede süs bitkileri, sebze fideleri ve çeşitli meyve fidanları satışı da gerçekleştirilmektedir. CEVd etmeninin satışı gerçekleştirilen bu bitkilerde semptomlu ya da semptomsuz durumda bulunup, domates bitkisi örneklerine mekanik bir yolla taşınmış olabileceği düşünülmektedir. Yürütülen sekans analizleri ve filogenetik analizlerde elde edilen sonuçlarda "Çeri" çeşidi domates bitkisinden izole edilen Örnek-1 izolatının, bazı turuncgil türlerinden bildirilmiş izolatlara daha yakın bir benzerlik sergilemesi, düşünülen mekanik taşınma ihtimalini destekler niteliktedir.

4.3. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

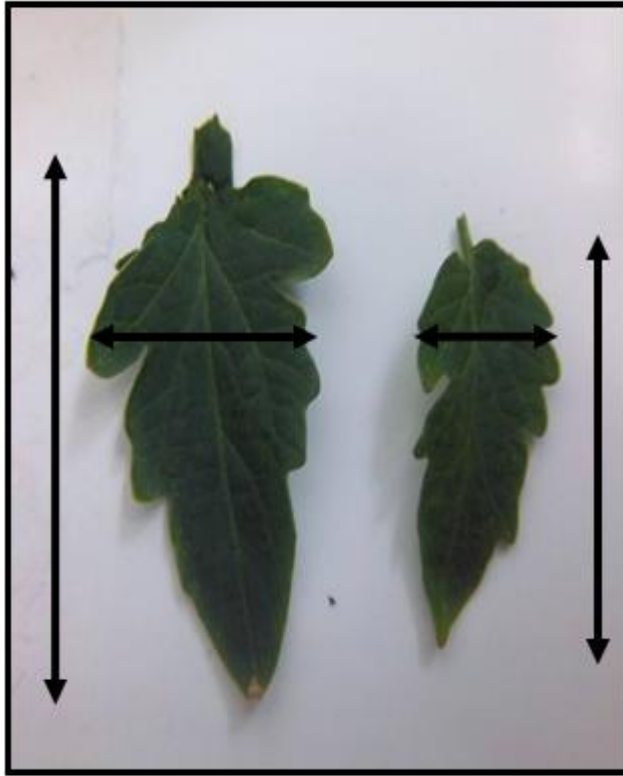
Bu tez çalışması kapsamında yürütülen mekanik inokulasyon uygulamalarıyla PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) ve CEVd (*Citrus exocortis viroid*) etmenlerinin, bazı farklı domates çeşitlerinde oluşturabileceği çeşitli semptomların gözlemlenmesi

amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan SC-2121, H-2274, Rio Grande ve Marmande standart domates çeşitlerine ait genç fidelerin bir kısmı, PSTVd ve CEVd etmenleri ile mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak bulaştırılmıştır. Simptom gelişimleri açısından klima odasında bekletilen fidelerin bir kısmı, elektrik kesintisi sebebiyle değişen klima ayarındaki ani bir sıcaklık farkından etkilenerek kurumıştır. Klimanın olduğu kısma biraz daha uzak mesafede bulunan Marmande çeşidini içeren fideler ise bu durumdan etkilenmemiş ve symptom gelişimi çalışmaları, Marmande çeşidini içeren fideler üzerinden yürütülerek tamamlanmıştır. Sonuç olarak, PSTVd ve CEVd etmenlerinin bazı farklı domates çeşitleri üzerinde amaçlanan symptom gelişimleri incelenememiş ancak Marmande çeşidi üzerinde iki etmene de ilişkin çeşitli symptom gelişimleri gözlemlenmiştir. Simptom gelişimleri açısından izlenen CEVd ve PSTVd etmenleri ile bulaşık bitkiler 60 gün süreyle klima odasında bekletilmiş, bitkilerdeki ilk symptomlar ise inokulasyondan 30 – 35 gün sonra gözlemlenmeye başlanmıştır.

CEVd etmeni ile bulaşık bitkilerin özellikle üst kısımlarındaki yapraklarında, kıvrıkcık bir yapının oluştuğu ve bu kısımlarda kümeleşme/demetleşme symptomları (Şekil 4.17) gözlemlenmiştir. Bulaşık bitkilerin yaprak boyutlarının sağlıklı bitkilere oranla daha küçük boyutlu olması (Şekil 4.18), bitkilerin boğum aralarının kısalması ve bodurluk symptomları da (Şekil 4.19, Şekil 4.20) gözlemlenen symptomlardır. PSTVd etmeni ile bulaşık bitkilerde üst yaprakların kıvrılarak, aşağı doğru uzadıkları (epinasti) ve ayrıca da bu yaprakların kırılğan bir yapıya sahip oldukları (Şekil 4.21) gözlemlenmiştir. İleri dönemde ise bulaşık yapraklarda, besin elementi noksanlığına benzeyen çeşitli sararmaların oluştuğu (Şekil 4.22) görülmüştür. Bulaşık bitkilerdeki, bodurluk (Şekil 4.23) ve boğum aralarının kısalması (Şekil 4.24) gözlemlenen diğer symptomlardır. Yaprak boyutlarının küçük kalması, bodurluk ve boğum aralarının kısalması PSTVd ve CEVd'inin oluşturduğu ortak symptomlardır. Bu symptomlar, CEVd ile bulaşık domates bitkilerinde daha belirgin olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.17. CEVd'i ile bulaşık domates bitkisinde gözlemlenen tepe kıvrıcıklığı ve bitkinin üst kısımlarındaki kümeleşme/demetleşme belirtileri



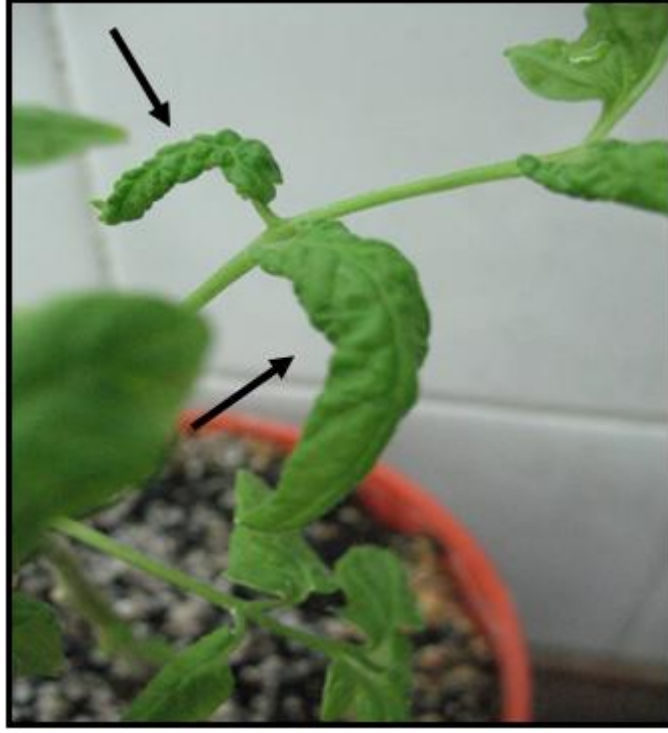
Şekil 4.18. CEVd'i ile bulaşık domates bitkisi yaprak örneği (sağda) ve sağlıklı domates bitkisi yaprak örneğinin (solda) boyutlarının karşılaştırılması



şekil 4.19. CEVd'i ile bulaşık domates bitkisinde (sağda) gözlemlenen boğum aralarının kısılması ve bodurluk belirtileri



şekil 4.20. Mekanik inokulasyondan 50 gün sonra yapılan uzunluk ölçümünde sağlıklı domates bitkisinin (solda) boyu 24 cm iken CEVd'i ile bulaşık domates bitkisinin (sağda) boyu 15 cm olarak belirlenmiştir



Şekil 4.21. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde üst yaprakların kıvrılarak aşağı doğru uzaması (epinasti) ve kırılkan bir yapı alması simptomları



(a)



(b)

Şekil 4.22. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisi (solda) yaprak örneğinde ileri dönemde gözlemlenen ve besin elementi noksanlığına benzer sararma simptomu (a), sağlıklı domates bitkisi (sağda) yaprak örneği (b)



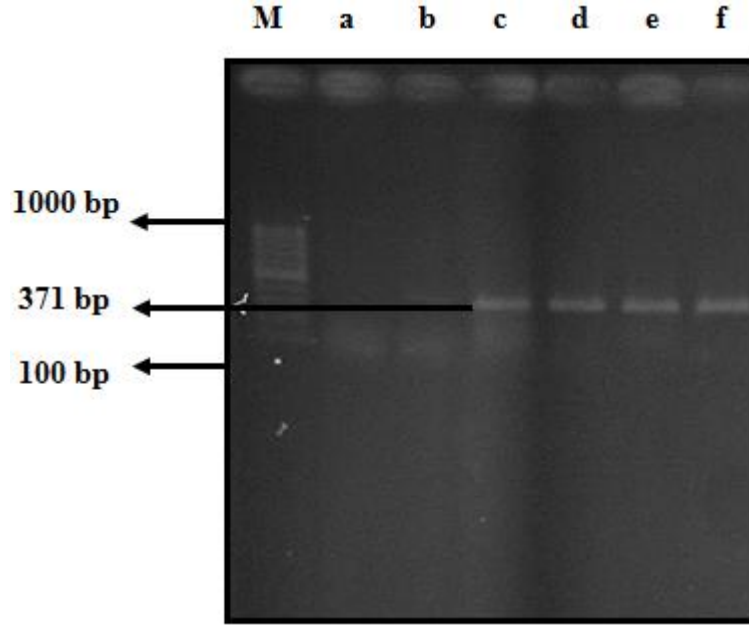
şekil 4.23. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde (sağda) gözlemlenen bodurluk simptome



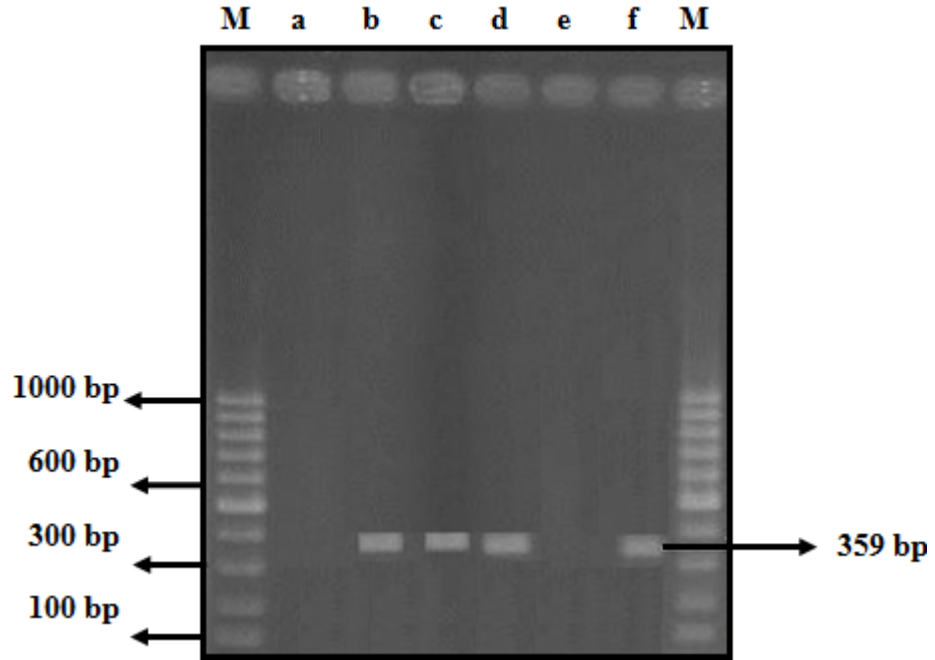
şekil 4.24. PSTVd'i ile bulaşık domates bitkisinde gözlemlenen boğum aralarının kısalması simptome

CEVd ile PSTVd etmenlerinin domates bitkilerinde oluşturdukları bazı simptomlar, yürütülen çeşitli çalışmalar ile gözlemlenebilmiştir. CEVd etmeninin domates bitkilerinde; yapraklarda epinasti, bitkinin tepe kısımlarında kümeleşme ve demetleşme oluşumu, büyüme ve gelişmede gerileme, boğum aralarında kısılma ve bitkilerde genel bodurluk gibi bazı simptomlara neden olabildiği, yürütülen çeşitli mekanik inokulasyon çalışmaları ile gözlemlenmiştir (Duran-Vila ve ark., 1988; Fonscea, 1993; Gandia ve ark., 2000; Verhoeven ve ark., 2004; Singh ve ark., 2009). PSTVd etmeninin ise domates bitkilerinde; yapraklarda kloroz ve nekroz oluşumu, yaprak renginin mor veya bronz bir renge dönüşmesi, yan yaprakçıklarda kıvrılma ve bu yaprakçıklarda buruşuk bir görünümün oluşması, üst yapraklarda epinasti, yaprakların gevrek ve kırılğan bir yapı halini alması, boğum aralarında kısılma ve bitkilerde genel bodurluk gibi bazı simptomlara neden olabildiği, yürütülen çeşitli mekanik inokulasyon çalışmaları ile gözlemlenmiştir (Grasmich ve Slack, 1985; Mackie ve ark., 2002; Hailstones ve ark., 2003; Lebas ve ark., 2005). Yürütülen bu tez çalışması kapsamındaki mekanik inokulasyon uygulamalarından elde edilen sonuçlar, gözlemlenen bazı simptom oluşumları açısından daha önceden yürütülen çeşitli mekanik inokulasyon çalışmaları ile uygunluk göstermektedir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda, CEVd ile PSTVd etmenlerinin domates bitkilerinde oluşturdukları enfeksiyonların varlığı, yürütülen RT-PCR çalışmasıyla doğrulanmaya çalışılmıştır. CEVd için CEVd-FW/RE (Önelge, 1997) ve PSTVd için Pr-FW/RE (Weidemann ve Buchta, 1998) spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı RT-PCR çalışmalarının devamında yürütülen elektroforez işlemleriyle, CEVd ile PSTVd'e ilişkin sırasıyla 371 bp'lik ve 359 bp'lik DNA fragmentleri, agaroz jeller (Şekil 4.25, Şekil 4.26) üzerinde görüntülenmiştir. Sonuç olarak, elektroforez işlemleri ile agaroz jeller üzerinde görüntülenenen iki etmene de ilişkin mevcut bant uzunlukları, domates bitkilerinde yürütülmüş olan mekanik inokulasyon işleminin başarılı olarak gerçekleştiğini ve domates bitkilerindeki CEVd ile PSTVd enfeksiyonlarının varlığını doğrulamıştır.



Şekil 4.25. RT-PCR ile testlenen CEVd'i bulaşık Marmande çeşidi domates fidelerine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, c-e: Marmande, f: Pozitif kontrol (CEVd)



Şekil 4.26. RT-PCR ile testlenen PSTVd'i bulaşık Marmande çeşidi domates fidelerine ait % 2'lik agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lik DNA markör, b-d: Marmande, f: Pozitif kontrol (PSTVd)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Yürütülen bu tez çalışması kapsamında testlenen çeşitli domates örneklerine ve mekanik inokulasyon bulgularına ilişkin bazı sonuçlar, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. H. Yıldız Daşgan'a ait yerli domates tohum koleksiyonundan 50 çeşit örnek; yarı-evrensel Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiş, araştırılan PSTVd, CEVd, TCDVd ve TASVd etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık tespit edilmemiştir.
2. Adana, Mersin, Antalya ve diğer bazı illerdeki tohum firmaları aracılığıyla ve doğrudan satın alım yapılarak temin edilen 100 çeşit ticari domates tohum örneği; yarı-evrensel Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiş, araştırılan PSTVd, CEVd, TCDVd ve TASVd etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık tespit edilmemiştir.
3. Gerçekleştirilen sorvey çalışmalarıyla Adana ile Mersin illerinde bulunan bazı üretici seralarından ve ticari amaçlı üretim yapılan seralardan temin edilen 248 adet fide ve yaprak örneği; yarı-evrensel Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlenmiş, araştırılan PSTVd, CEVd, TCDVd ve TASVd etmenleri açısından herhangi bir bulaşıklık tespit edilmemiştir.
4. "Adana" ilinin "Yüreğir" ilçesinde bulunan bir ticari işletmeden, saksılı olarak temin edilen iki adet "Çeri" çeşidi domates bitkisi örneklerinde ise CEVd etmeni ile bulaşıklık tespit edilmiştir. Bu örneklerdeki CEVd etmeninin varlığı, CEVd etmenine spesifik olan CEVd-FW/RE primer çiftinin kullanıldığı RT-PCR yöntemi ve agaroz jel elektroforez

çalışmalarıyla belirlenmiş, bu örneklerin 371 bp'lik DNA fragmentleri de agaroz jeller üzerinde görüntülenmiştir.

5. CEVd etmeniyle bulaşık oldukları tespit edilen domates bitkisi örneklerinden Örnek-1'in, NCBI veri tabanında kayıtlı CEVd izolatlarına % 91'den % 98'e varan oranlarda sekans benzerliği sergilediği belirlenmiştir. Domates bitkilerinde bazı doğal salgınlara neden oldukları bildirilen, Hindistan ve Hollanda izolatlarının ise Örnek-1'e % 89 – 92 arasında değişen oranlarla sekans benzerliği sergiledikleri görülmüştür.

6. Filogenetik analiz çalışmalarında, CEVd etmeninin farklı konukçularından elde edilmiş bazı varyantları ile Örnek-1 izolatı karşılaştırılmış ve bir soyağacı tablosu oluşturulmuştur. Örnek-1 izolatının mevcut bu soyağacında, bazı turuncgil türlerinden bildirilen Tunus, Yunanistan, İsrail ve İran izolatları ile aynı grupta yer aldığı görülürken, domates bitkilerinden bildirilen Hindistan ve Hollanda izolatları ile ayrı bir grupta yer aldığı belirlenmiştir.

7. Mekanik inokulasyon çalışmalarında, *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ve *Citrus exocortis viroid* (CEVd) etmenlerinin domates bitkilerinde oluşturdukları bodurlaşma, boğum aralarının kısılması ve yaprak boyutlarının küçük kalması gibi bazı ortak semptomlar ile, her iki etmene de ilişkin çeşitli bazı spesifik semptomlar gözlemlenmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda, PSTVd ve CEVd etmenlerinin domates bitkilerinde oluşturdukları mevcut enfeksiyonların varlığı, gerçekleştirilen RT-PCR çalışması ile de doğrulanmıştır. Elde edilen semptomolojik ve moleküler bulguların, daha önce bu konularda yapılan bazı çalışmalarla ve mevcut literatür bilgileriyle uygunluk gösterdiği görülmüştür.

8. Bu tez çalışması, 400 adet domates örneğinin bazı viroid etmenleri açısından testlenmesi ve mekanik inokulasyon çalışmasının gerçekleştirilmesi ile tamamlanmıştır. Testlenen örneklerin ikisi CEVd etmeniyle bulaşık bulunurken, mekanik inokulasyon çalışması ile de domates bitkilerinde çeşitli semptomlar gözlemlenmiştir. Bu çalışma, bölgemizdeki ve ülkemizdeki domates bitkilerinde bulunabilecek viroid etmenlerinin araştırılması açısından

ön bir çalışma olmuştur. Araştırılan çeşitli literatür bilgilerinin ve moleküler çalışmalarda kullanılan bazı yöntemlerin, daha sonra yapılabilecek çalışmalar açısından referans oluşturması, bu çalışmanın değer kazanabilmesi bakımından önemlidir.

5.2. Öneriler

Domates bitkisinde fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu bitkide hastalık oluşturan önemli bir patojen grubu da, sub-viral etmenler olarak bilinen viroidlerdir. Viroid enfeksiyonları sebebiyle, domates bitkilerinde değişen oranlarda meydana gelen verim kayıplarının ve bazen de bitkilerin ölümü ile sonuçlanan durumların gerçekleştiği bilinmektedir.

Viroidler, enfeksiyöz hastalık etmenleri olarak en küçük patojen grubunu oluşturmaları ve ekonomik öneme sahip olan çok sayıda hastalığa neden olmaları açısından önemlidir. Viroidlerin çeşitli bazı yollarla taşınıp yayılabilmesi, üreticilerin viroidler hakkında yeterli bilgiye sahip olmaması ve viroid etmenlerine karşı etkili kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması, bu patojenlerin önemini arttırmaktadır.

Viroidlerin kontrolü ve mücadelesi, konukçularında enfeksiyonlar oluştuktan sonra oldukça güç olmaktadır. Bugüne kadar bu patojenlere karşı herhangi bir tedavi yöntemi de geliştirilemediği için viroid hastalıklarına karşı alınabilecek tedbirlerin en önemlisi, olası enfeksiyonlardan korunma şeklindedir. Bu doğrultuda, viroidlerle mücadelede alınabilecek bazı önlemler, aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

1. Viroid etmenlerine karşı mücadelede, sağlıklı ve temiz üretim materyallerinin kullanılması alınabilecek ilk ve en önemli önlemlerdendir. Günümüzde temiz üretim materyallerinin eldesi amacıyla, bazı doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Meristem uç kültürü tekniği ve soğuk terapi gibi yöntemler, viroidlere karşı temiz üretim materyali elde edilmesinde en fazla bilinen yöntemlerin başında gelmektedir. Bu gibi yöntemlerin geliştirilerek, sağlıklı ve temiz üretim materyallerinin üretilmesi

sağlanmalı, bununla birlikte “viroid etmenlerinden ari olduğuna dair sertifikalı” materyallerin kullanımı da yaygınlaştırılmalıdır.

2. Viroidlere karşı mücadelede etkili yöntemlerden biri de dayanıklı bitkilerin kullanılmasıdır. Islah çalışmaları, çapraz koruma (cross protection), ribozim esaslı dayanıklılık ve gen aktarımıyla, viroid etmenlerine karşı bazı dayanıklı çeşitler elde edilmektedir. Bu çeşitlerin geliştirilip, pratikte de kullanılabilir olması sağlanmalıdır.

3. Karantina önlemleri, viroidler ile mücadelede önemli hususlardandır. Ülkeler arasında gerçekleştirilen ticari faaliyetlerle elde edilen bitkisel materyallerin viroidler ile bulaşık olması, bu etmenlerin temiz alanlara taşınıp yayılmasında önemli olduğu için gerekli tüm karantina önlemleri alınmalıdır. İthalat yapılan ülkelerin denetim mekanizmalarının işlerliği ve sertifikasyon programlarındaki uygulamalara bağlı olarak da, bazı durumlarda önemli derecede zararlar ortaya çıkabilmektedir. Özellikle de “Üçüncü Dünya Ülkeleri” olarak tabir edilen bazı ülkelere yapılan bitkisel materyallerin ithalatı konusunda, hassas önlemler alınmalıdır. Bu ülkelerdeki karantina faaliyetlerinin yetersiz ve gelişmemiş olması, bitkisel materyallerin ithalatı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Viroidlerin ithalat yolu ile taşınabilmelerinin önlenmesi için mevcut bitkisel materyallerin ithal edilmeden önce, viroid etmenleri açısından testlenmiş ve sertifikalandırılmış olması gerekmektedir. Ülkemizdeki tüm karantina kuruluşları, bakanlık birimleri ve sınır kontrol noktalarındaki görevlilerin de, bu konularda gereken hassasiyeti göstermeleri gerekmektedir.

4. Viroid etmenlerinden bazıları karantina listelerinde yer almalarına rağmen ülkemizdeki ilgili kurum ve kuruluşlarca, henüz rutin olarak kontrol edilmemektedir. Viroidlerle ilgili güvenilir kontrol protokollerinin oluşturularak karantina hizmeti veren kurum ile kuruluşlarca, bu etmenlerin rutin kontrolü ve sertifikasyonda taranır hale gelmeleri sağlanmalıdır. Bitkisel materyallerde olası herhangi bir bulaşıklığın saptanılması durumunda ise ilgili tüm karantina ve sertifikasyon kurumlarının bilgilendirilerek, mevcut durumdaki etmenlerin ülke içinde yayılmaları önlenmelidir. Bunun yanı sıra,

gelebilecek çeşitli bazı şikayetler ve geri bildirimler doğrultusunda ülkemizdeki mevcut karantina yönetmeliklerinin de gözden geçirilip, yeniden revize edilmesi sağlanmalıdır.

5. Viroid hastalıkları besin elementi eksikliği, gelişim geriliği, fizyolojik stres faktörleri ve virüs etmenlerinin meydana getirdiği belirtiler ile karıştırıldığı için, üreticilerin yazılı ve görsel bazı materyallerle viroid etmenleri ve bu etmenlere karşı alınabilecek çeşitli önlemler hakkında bilgilendirilmeleri sağlanmalıdır. Bu sayede, viroidlerin tespiti daha erken sağlanabilecek ve ayrıca geniş alanlara yayılmaları da önlenilecektir.

6. Viroid etmenleri ile bulaşıklığı tespit edilen alanlarda, etmenlerin mevcut bulunduğu alanlardan sağlıklı bir şekilde uzaklaştırılması sağlanarak, bu alanlar da düzenli olarak kontrol edilmelidir.

7. Viroid etmenlerinin farklı birçok bitki familyasında zarar yapmaları, bazı familyalara ait çeşitli bitkilerde ise belirsiz olarak bulunup potansiyel kaynak oluşturmaları nedeniyle, üretim faaliyetlerinde polikültür yetiştiricilikten kaçınılmalıdır.

8. Sera ya da tarla koşullarında, viroid etmenlerinin mekanik taşınmalarına karşı bazı çeşitli kültürel önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu doğrultuda, hasat artıkları ve yabancı otların üretim yapılan alanlardan temizlenmesi, bakım işlemleri için kullanılan alet ve ekipmanların da % 2'lik sodyum hipokloritle dezenfekte edilmesi sağlanmalıdır.

9. Viroid etmenlerinin konukçu tercihleri ve vektörel taşınma mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlı düzeydedir. Bu konuların daha detaylı olarak araştırılması, viroidler ile mücadelede yeni yöntemlerin ortaya çıkması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- AGRIOS, G. N., 1997. Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida, Academic Press, p 635.
- ANONİM, 2010. Patates hastalık ve zararlıları ile mücadele. Bitki Hastalıkları Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara, 112s.
- ANONYMOUS, 2011a. First report of *Tomato apical stunt viroid* in Austria. EPPO Reporting Service, NPPO of Austria, 217: 11.
- ANONYMOUS, 2011b. Detection and epidemiology of pospiviroids. Final Report of DEP Project, p 70.
- ANTIGNUS, Y., LACHMAN, O., PEARLSMAN, M., GOFMAN, R. and BAR- JOSEPH, M., 2002. A new disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain of *Tomato apical stunt viroid* (TASVd). *Phytoparasitica*, 30: 502-510.
- ANTIGNUS, Y., LACHMAN, O. and PEARLSMAN, M., 2007. Spread of *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Disease*, 91: 47-50.
- ATKINS, D., YOUNG, M., UZZELL, S., KELLY, L., FILLATTI, J. and GERLACH, W. L., 1995. The expression of antisense and ribozyme genes targeting *Citrus exocortis viroid* in transgenic plants. *Journal of General Virology*, 16: 1781-1790.
- BADILLA, R., 1999. First report of *Potato spindle tuber viroid* in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.
- BEHJATNIA, S. A. A., DRY, I. B., KRAKE, L. R., CONDE, B. D., CONNELLY, M. J., RANGLES J. W. and REZAIAN, M. A., 1996. New *Potato spindle tuber viroid* and Tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology*, 86: 880-886.
- BENTON, R. J., BOWMAN, F. T., FRASER, L. and KEBBY, R. G., 1949. Selection of citrus budwood to control scallybutt in trifoliata rootstock. *Agricultural Gazette, New South Wales*, 60: 31-34.

- BENTON, R. J., BOWMAN, F. T., FRASER, L. and KEBBY, R. G., 1950. Stunting and scalybutt associated with *Poncirus trifoliata* rootstock. *Agricultural Gazette, New South Wales*, 70: 1-20.
- BORA, T. ve KARACA, İ., 1970. Bitki hastalıklarının sörveyi. *Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir, 167: 8-43.
- BOSTAN, H. ve ÇORUH, İ., 2004. Moleküler bitki hastalık etmenleri olarak viroidlerin yapısı, tanı yöntemleri ve mücadelesi için öneriler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (2): 125-129.
- BOSTAN, H., GAZEL, M., ELİBÜYÜK, İ. Ö. ve ÇAĞLAYAN, K., 2010. Occurrence of *Pospiviroid* in potato, tomato and some ornamental plants in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9 (18): 2613-2617.
- BOTERMANS, M., VAN DE VOSSENBERG, B. T. L. H., VERHOEVEN, J. TH. J., DEKTER, R. and MEEKES, E. T. M., 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43-50.
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J., BAROUDY, B. M., WELLS, F. V., GERIN, J. L. and ROBERTSON, H. D., 1989. An ultraviolet-sensitive RNA structural element in viroid-like domain of hepatitis delta virus. *Science*, 243: 649-652.
- BUSSIERE, F., OULLET, J., COTE, F., LEVESQUE, D. and PERREAULT, J. P., 2000. Mapping in solutions shows the *Peach latent mosaic viroid* to possess a new pseudoknot in complex branched secondary structure. *Journal of Virology*, 74: 2647-2654.
- CANDRESSE, T., MARAIS, A., TASSUS, X., SUHARD, P., RENAUDIN, I., LEGUAY, A., POLIAKOFF, F. and BLANCARD, D., 2010. First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* in tomato in France. *Plant Disease*, 94 (5): 633.
- ÇANDAR, A., 2014. Ege Bölgesi bağ alanlarında saptanan Grapevine yellow speckle viroid-1 ve 2 (GYSVd-1 ve 2)'nin moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 61s. (Yayınlanmamış).

- ÇOPUL, S., 2012. Ege Bölgesi bağ alanlarında viroidlerin belirlenmesi üzerinde çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 49s. (Yayınlanmamış).
- DIENER, T. O. and RAYMER, W. B., 1967. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of nucleic acids. *Science*, 158: 378-381.
- DIENER, T. O., 1971. Potato spindle tuber virus: A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45: 411-428.
- DIENER, T. O. and LAWSON, R. H., 1973. Chrysanthemum stunt: A viroid disease. *Virology*, 51: 94-101.
- DIENER, T. O., 1987. The Viroids. Plenum Publishing Corporation, New York, USA, p 344.
- DING, B. and OWENS, R. A., 2003. Movement (A. HADIDI, R. FLORES, J. W. RANGLES and J. S. SEMANCIK, editors). Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 49-55.
- DI-SERIO, F., 2007. Identification and characterization of *Potato spindle tuber viroid* infecting *Solanum jasminoides* and *Solanum rantonnetii* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89: 297-300.
- DI-SERIO, F., FLORES, R., VERHOEVEN, J. TH. J., LI, S., PALLAS, V., RANGLES, J. W., SANO, T., VIDALAKIS, G. and OWENS, R. A., 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159: 3467-3478.
- DONGHIA, A. M., FAHMY, H., BRANDONISIO, R. and DJELOUAH, K., 2007. Proceedings of the International Organization of Citrus Virologist, IOCV.
- DUMAN, K., 2008. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında görülen *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) ve *Hop stunt viroid* (HSVd)'lerinin RT-PCR yöntemi ile tanımlanmasına yönelik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 39s. (Yayınlanmamış).
- DURAN-VILA, N., PINA, J. A., BALLESTA, J. F., JUAREZ, J., ROISTACHER, C. N., RIVERA-BUSTAMENTA, R. and SEMANCIK, J. S., 1988. The citrus exocortis disease: A complex of viroid-RNAs. Proc. 10th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 152-165.

- DURAN-VILA, N. and SEMANCIK, J. S., 2003. Citrus Viroids (A. HADIDI, R. FLORES, J. W. RANGLES and J. S. SEMANCIK, editors). Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 178-194.
- EKER, Y., 2009. Turunçgil ağaçlarında ur oluşumlarının turunçgil viroidleri açısından incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 63s. (Yayınlanmamış).
- ELLEUCH, A., MARRAKCHI, M., LEVESQUE, D., BESSAIS, N., PERREAULT, J. P. and FAKHFAKH, H., 2003. Molecular variability of *Citrus exocortis viroid* in a single naturally infected citrus tree. *Plant Protection Science*, 39 (4): 139-145.
- ERCAN, N., AYAR, F., ŞENSOY, A. S. ve TEMİRKAYNAK, M., 2002. Bazı domates çeşitlerinin Antalya koşullarında açıkta yetiştirme olanakları üzerinde bir araştırma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15 (2): 101-105.
- FADDA, S., 2003. Impacts des cultures anciens sur les communautés de coleopteres et d'orthopteres de la plaine de Crau. M. S. Thesis, Universite d'Axis, Marseille, France. (Yayınlanmamış).
- FAGGIOLI, F., LORETI, S. and BARBA, M., 1997. Occurrence of *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease*, 81: 423.
- FAGGIOLI, F., LUIGI, M., SVEIKAUSKAS, V., OLIVIER, T., VIRSCEK-MARN, M., MAVRIC-PLESKO, I., DE-JONGHE, K., VAN-BOGAERT, N. and GRAUSGRUBER-GROGER, S., 2015. An assesment of the transmission rate of four *Pospiviroid* species through tomato seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 3.
- FAGOAGA, C. and DURAN-VILA, N., 1996. Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetable crops. *Plant Pathology*, 45: 45-53.
- FAO, 2013. Faostat Agricultural Statistical Databases. (<http://www.faostat.org>), (Erişim Tarihi: 17.02.2015).
- FAWCETT, H. S. and KLOTZ, L. J., 1948. Exocortis on trifoliate orange. *Citrus Leaves*, 28: 8.

- FLORES, R., RANGLES, J. W., BAR-JOSEPH, M. and DIENER, T. O., 2000. Subviral agents: Viroids in virus taxonomy. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, California, USA, 1009-1024.
- FLORES, R., DELGADO, S., GAS, M. E., CARBONELL, A., MOLINA, D., GAGO, S. and PENA, M., 2004. The minimal non-coding RNAs with autonomous replication (B. W. J. MAHY, M. H. V. REGENMORTEL, editors). Viroids, Academic Press, San Diego, California, USA, p 12.
- FLORES, R., HERNANDEZ, C., MARTINEZ, E., DAROS, J. A. and DI-SERIO, F., 2005a. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 117-139.
- FLORES, R., RANGLES, J. W., BAR-JOSEPH, M. and DIENER, T. O., 2005b. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology*, 143 (3): 623-629.
- FLORES, R. and OWENS, R. A., 2010. Desk encyclopedia of plant and fungal virology (B. W. J. MAHY, M. H. V. REGENMORTEL, editors). Viroids, Academic Press, San Diego, 71-81.
- FLORES, R., GRUBB, D., ELLEUCH, A., NOHALES, M. A., DELGADO, S. and GAGO, S., 2011. Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: Variations on a theme. digital.csic.es/.../RNABiol_8_200_2011.pdf.
- FONSCEA, M. E. N., 1993. French marigold (*Tagetes patula*): A new experimental host of *Citrus exocortis viroid*. *Plant Disease*, 77: 953.
- GALINDO, J., SMITH, D. R. and DIENER, T. O., 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49-54.
- GANDIA, M., DURAN-VILA, N. and PALACIO, A., 2000. Variability of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Proc. 14th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 265-272.
- GANDIA, M. and DURAN-VILA, N., 2002. Effect of sequence variation on the biological properties of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Proc. 15th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 213-218.

- GANDIA, M., DURAN-VILA, N. and BERNAD, L., 2005. Host effect on the genetic variability of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). Proc. 16th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 291-299.
- GAZEL, M., 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi bağ alanlarındaki viroidlerin araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 90s. (Yayınlanmamış).
- GIERSON, D., 1982. Gel electrophoresis of RNA. A Practical Approach, IRL Press, 1-38.
- GILBERTSON, R. L. and BATUMAN, O., 2012. The first report of *Columnea latent viroid* in tomato in West Africa. University of California-Davis, USA, p 441.
- GORA-SOCHAKA, A., 2004. Viroids: Unusal small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica*, 3 (5): 87-607.
- GOTTSBERGER, R. A. and SUAREZ-MAHECHA, B., 2010. Detection of *Citrus exocortis viroid* on *Solanum jasminoides* plantlets from an Austrian nursery. *Plant Pathology*, 59: 1159.
- GÖÇMEN, M., TAŞDEMİR, T., GÜNEŞ, S., POLAT, İ. ve KELTEN, M., 2003. Turunçgil exocortis viroidinin RT-PCR ve dot-blot hibridizasyon yöntemi ile tanısı. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16 (2): 221-228.
- GÖKÇEK, B., 2007. Gaziantep ili bağ alanlarında Bağ sarı benek (GYSVd-1 ve 2) hastalığının araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 94s. (Yayınlanmamış).
- GRASMICH, M. E. and SLACK, S. A., 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of *Potato spindle tuber viroid* amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49-51.
- GROSS, H. J., DOMDEY, H., LOSSOW, D., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H. and SANGER, H. L., 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of *Potato spindle tuber viroid*. *Nature New Biology*, 273: 203-308.
- GROSS, H. J., DOMDEY, H., LOSSOW, D., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H. and SANGER, H. L., 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of *Citrus exocortis viroid* and *Chrysanthemum stunt viroid*. *European Journal of Biochemistry*, 121: 249-257.

- GROSS, R. W., 1924. Effect of environment on potato degeneration diseases. Univ. Nebraska Agr. Exp. Sta. Res. Bull., 26-40.
- 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 Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 266s. (Yayınlanmamış).
- GÜNAY, A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği. Meta Basımevi, İzmir, 530s.
- GÜNER, U., SİPAHİOĞLU, H. M. ve USTA, M., 2012. Türkiye’de tohumluk patates yumrularında Patates iç yumru viroidi (PSTVd)’nin saptanması ve genetik stabilitesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36: 353-363.
- HADIDI, A. and YANG, X., 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 30: 261-270.
- HADIDI, A., TERAL, Y., POWEL, L. A., SCOTT, S. W. and DESVIGNES, J. C., 1992. Enzymatic cDNA amplification of HSVd variants from naturally infected fruit crops. *Acta Horticulture*, 309: 339-344.
- HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J. W. and SEMANCIK, J. S., 2003. Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, p 392.
- HAILSTONES, D. L., TESORIERO, L. A., TERRAS, M. A. and DEPHOFF, C., 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317-318.
- HAMMOND, R. W., SMITH, D. R. and DIENER, T. O., 1989. Nucleotid sequence and proposed secondary structure of *Columnnea latent viroid*: A natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.*, 17: 10083-10094.
- HAMMOND, R. W. and OWENS, R. A., 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. USDA, Molecular Plant Laboratory, Plant Sciences Institute.
- HANOLD, D. and RANGLES, J. W., 1991. Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Disease*, 75: 330.
- HARDY, S., DONOVAN, N. and BARKLEY, P., 2008. Citrus exocortis. Primefact, Department of Primary Industries, New South Wales, p 772.

- HERNANDEZ, C. and FLORES, R., 1992. Plus and minus RNAs of *Peach latent mosaic viroid* self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 3711-3715.
- HULL, R., 2002. Matthews Plant Virology 4th Edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- HUTCHINS, C. J., RATHJEN, P. D., FORSTER, A. C. and SYMONS, R. H., 1986. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of *Avocado sunblotch viroid*. *Nucleic Acids Res.*, 14: 3627-3640.
- IGLOI, G. L., 1983. A silver strain for the detection of nanogram amounts of RNA following two-dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 134: 184-188.
- JEFFRIES, C., 1998. FAO/IPGRI Technical guidelines for safe movement of germplasm. Potato, No: 19.
- JONES, J. B., JONES, J. P., STALL, R. E. and ZITTER, T. A., 1991. Compendium of tomato diseases. *American Phytopathological Society*, USA, 42-43.
- KALANTIDIS, K., DENTI, M. A., TZORTZAKAKI, S., MARINOU, E., TABLER, M. and TSAGRIS, M., 2007. Virp1 is a host protein with a major role in *Potato spindle tuber viroid* infection in *Nicotiana* plants. *Journal of Virology*, 81: 12872-12880.
- KEESE, P. and SYMONS, R. H., 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangement and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 4582-4586.
- KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. and CARTENS, E. B., 2011. Virus taxonomy: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier*, 1221-1234.
- KOENRAADT, H. M. S., JODLOWSKA, A., VAN-VLIET, A. and VERHOEVEN, J. TH. J., 2009. Detection of *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) and *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in seeds of tomato. *Phytopathology*, 99: 566.
- KOLTUNOW, A. M., and REZAIAN, M. A., 1989. A scheme for viroid classification, *Intervirology*, 30: 194.

- KRYCZYNSKI, S., PADUCH-CICHAL, E. and SKRECZKOWSKI, L. J., 1988. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *Journal of Plant Pathology*, 121: 51-57.
- KURTİNİ, F. G., 2011. KSÜ Sekamer’de şeftali ağaçlarında Şeftali latent mozayik viroid (PLMVd) ve Hop stunt viroid (HSVd) enfeksiyonlarının moleküler tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 25s. (Yayınlanmamış).
- KYRIAKOPOULOU, P. E., GIUNCHEDI, L. and HADIDI, A., 2001. *Peach latent mosaic viroid* and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *Pyrus amygdaliformis*: Implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. *Journal of Plant Pathology*, 83: 51-62.
- LEBAS, B. S. M., CLOVER, G. R. G., OCHOA-CORONA, F. M., ELLIOTT, D. R., TANG, Z. and ALEXANDER, B. J. R., 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129-133.
- LEONTYEVA, J. A., 1980. Tomatoes and *Potato spindle tuber viroid*. *Zashchita Rastenii*, 8: 22.
- LING, K. S. and BLEDSOE, M. E., 2008. First report of *Mexican papita viroid* infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93 (8): 839.
- LING, K. S. and ZHANG, W., 2009. First report of a natural infection by *Mexican papita viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid* on greenhouse tomatoes in Mexico. *Plant Disease*, 93 (11): 1216.
- LING, K. S., PANTHEE, D. R., LI, R. and GARDNER, R. G., 2012. Identification of *Potato spindle tuber viroid* naturally infecting greenhouse tomatoes in North Carolina and its potential in seed transmission. Tomato Disease Workshop, p 27.
- LORETI, S., FAGGIOLI, F., CARDONI, M., MORDENTI, G., BANINI, A. R., POGGIOLLINI, C. and BARBA, M., 1999. Comparison of different diagnostic methods for the detection of *Peach latent mosaic viroid*. OEPP/EPPO Bulletin, 29: 433-438.

- LUIGI, M., LUISON, D., TOMASSOLI, L. and FAGGIOLI, F., 2011. First report of *Potato spindle tuber viroid* and *Citrus exocortis viroid* in *Cestrum* spp. in Italy. *New Disease Reports*, 23: 4.
- MACKIE, A., KIRDY, S. J., RODONI, B. and KUMAR, S., 2002. *Potato spindle tuber viroid* eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311-312.
- MACKIE, A. and JONES, R., 2009. *Potato spindle tuber viroid*. Department of Agriculture and Food, Note: 162.
- MALANDRAKI, I., PAPACHRISTOPOLOU, M. and VASSILAKOS, N., 2010. First report of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in ornamental plants in Greece. *New Disease Reports*, 21: 9.
- MANDIC, S. M., AL-RWAHNIH, M., MYRTA, A., GOMEZ, G. and PALLAS, V., 2008. Incidence and genetic diversity of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in stone fruits in Serbia, *Eur. J. Plant Pathol.*, 120: 167-176.
- MARTINEZ-SORIANO, J. P., GALINDO-ALONSO, J., MAROON, J. M., YUCEL, I., SMITH, D. R. and DIENER, T. O., 1996. *Mexican papita viroid*: Putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 9397- 9401.
- MATSUSHITA, Y., 2010. Report on *Potato spindle tuber viroid* in Japan. (Yayınlanmamış).
- MATSUSHITA, Y., 2011. Distribution of viroid variants and their infectivity in horticultural plants in Japan. *Bull. Natl. Inst. Flor. Sci.*, 11: 9-48.
- MERTELIK, J., KLOUDOVA, K., CERVENA, G., NECEKALOVA, J., MIKULKOVA, H., LEVKANICOVA, Z., DEDIC, P. and PTACEK, J., 2009. First report of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in *Brugmansia* spp., *Solanum jasminoides*, *Solanum muricatum* and *Petunia* spp. in the Czech Republic. *Plant Pathology*, 59: 392.
- MICHELANTE, D., LEICHER, J., HUYSHAUWER, V., SWILLENS, L., BRAGARD, C. and STEYER, S., 2009. *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) situation in Belgium and experience on managing monitoring and eradication in ornamental and tomato productions. *OEPP/EPPO Bulletin*, 39 (1): 81.

- MISHRA, M. D., HAMMOND, R. W., OWENS, R. A., SMITH, D. R. and DIENER, T. O., 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology*, 72: 1-5.
- MONGERA, W., TOMLINSONA, J., BOONHAMA, N., MARNB, M. V., PLESKOB, I. M., MOLINERO-DEMILLYC, V., TASSUS, X., MEEKESD, E., TOONEND, M. and PAPAYIANNISE, L., 2010. Development and inter laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207-210.
- MOREIRA, S., 1965. Cachexia and Xyloporosis: Are they caused by the same virus. Proc. 3rd IOCV Conference, Univ. of Fla., Press Gainesville, 52-56.
- MUMFORD, R. A., WALSH, K. and BOONHAM. N., 2000. A comparison of molecular methods for routine detection of viroids. OEPP/EPPO Bulletin, 30 (6): 431.
- MUMFORD, R. A., JARVIS, B. and SKELTON, A., 2003. The first report of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in commercial tomatoes in the UK. *Plant Pathology*. 53: 242.
- MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8 (19): 4321-4325.
- NAVARRO, B. and FLORES, R., 1997. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 94: 11262-11267.
- NCBI GENBANK. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), (Erişim Tarihi: 11.10.2015).
- NIE, X., 2012. Analysis of sequence polymorphism and population structure of *Tomato chlorotic dwarf viroid* and *Potato spindle tuber viroid* in viroid infected tomato plants. *Viruses*, 4: 940-953.
- NIXON, T., HOBDEN, E., STEYER, S., OLIVIER, T. and SKELTON, A., 2010. *Columnnea latent viroid* (CLVd) in tomato: The first report in the France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- NORMAN, P. A., 1963. Report to the government of Turkey on citrus virus diseases. FAO Report No: 1641, p 16.

- OEPP/EPPO, 2004. Normes OEPP/EPPO standards of *Potato spindle tuber pospiviroid*. OEPP/EPPO Bulletin, 34: 257-269.
- OLIVIER, E., DEMONTY, J., GOVERS, K. and STEYER, S., 2011. First report of a *Brugmansia* sp. infected by *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) in Belgium. *Plant Disease*, 95: 495.
- OWENS, R. A. and VERHOEVEN, J. TH. J., 2009. Potato spindle tuber. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01.
- OWENS, R. A., GIRSOVA, N. V., KROMINA, K. A., LEE, I. M., MOZHAEVA, K. A. and KASTALYEVA, T., 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93 (7): 752-759.
- ÖNELGE, N., 1994. Turunçgillerde hastalık oluşturan viroidlerin biyolojik ve biyokimyasal tanısı (PAGE) üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 93s. (Yayınlanmamış).
- ÖNELGE, N., 1997. Direct nucleotide sequencing of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 21: 419-422.
- ÖNELGE, N. ve BOZAN, O., 2005. Patates tohumlarında Patates iç yumru viroidinin araştırılması. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi Bildiriler Kitabı, Adana, 378-378.
- PALUKAITIS, P. and SYMONS, R. H., 1980. Purification and characterization of the circular form of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd). *Journal of General Virology*, 46: 477-489.
- PUCHTA, H., HEROLD, T., VERHOEVEN, K., ROENHORST, A., RAMM, K., SCHMIDT-PUCHTA, W. and SANGER, H. L., 1990. A new strain of *Potato spindle tuber viroid* exhibits major sequence differences as compared to all other strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15: 509-511.
- QUERCI, M., OWENS, R. A., BARTOLINI, I., LAZERTE, V. and SALAZAR, L. F., 1997. Evidence for heterologous encapsulation of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in particles of Potato leafroll virus (PLRV). *Journal of General Virology*, 78: 1207-1211.
- RAGOZZINO, E. and FAGGIOLI, F., 2002. Detection of pome fruit viroids by RT-PCR using a single primer pair. *Journal of Plant Pathology*, 84 (2): 125-128.

- RAGOZZINO, E., FAGGIOLI, F. and BARBA, M., 2004. Development of an one-tube RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. *Journal of Virological Methods*, 121: 25-29.
- RANDLES, J. W., 2003. Economic impact of viroid diseases (A. HADIDI, R. FLORES, J. W. RANDLES and J. S. SEMANCIK, editors). Viroids, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 3-15.
- REANWARAKORN, K., KLINGKONG, S. and PORSOONGNURN, J., 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.
- RIESNER, D. and GROSS, H. J., 1985. Viroids. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 531-564.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R. F., GIN, R. and SEMANCIK, J. S., 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal. Biochem.*, 156 (1): 91-5.
- ROISTACHER, C. N., SEMANCIK, J. S. and DURAN-VILA, N., 1988. A viroid RNA associated with Cachexia (Xyloporosis) disease of citrus. Proc. 10th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 126-136.
- ROISTACHER, C. N., 1991. Graft transmissible diseases of citrus. Handbook for Detection and Diagnosis, Publ. Div., FAO, Rome, Italy, 1-151.
- SALAZAR, L. F., 1989. *Potato spindle tuber viroid* (R. P. KAHN, editor). Selected Pests and Pathogens of Quarantine Significance, CRC Press, 155-167.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- SAMMONS, D. W., ADAMS, L. P. and NISHAZAVA, E. E., 1981. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2: 135-141.
- SANGER, H. L., KLOTZ, G., RIESNER, D., GROSS, H. J. and KLEINSCHMIDT, A. K., 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as a highly base-paired structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 3852-3856.

- SANO, T., UYEDA, I. and SHIKATA, E., 1984. Comparative studies of *Hop stunt viroid* and *Cucumber pale fruit viroid* by PAGE analysis and electron microscopic examination. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 50: 339-345.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R. W., DIENER, T. O. and OWENS, R. A., 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89: 10104-10108.
- SCHULTZ, E. S. and FOLSOM, D., 1923. Transmission, variation and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *Journal of Agricultural Research*, 25: 43-117.
- SCHUMACHER, J., RANGLES, J. W. and RIESNER, D., 1983. A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Analytical Biochemistry*, 135: 288-295.
- SEMANCIK, J. S. and WEATHERS, L. G., 1972. Exocortis disease: Evidence for new species of infectious low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology*, 237: 242-244.
- SEMANCIK, J. S., 1987. Viroids and viroid-like pathogens. CRC Press, Florida, USA, 127-161.
- SEMANCIK, J. S. and DURAN-VILA, N., 1991. The grouping of citrus viroids: Additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. Proc. 11th IOCV Conference, Riverside, California, USA, 171-178.
- SEMANCIK, J. S. and SZYCHOWSKI, J. A., 1992. Relationships among the viroids derived from grapevines. *Journal of General Virology*, 73: 1465-1469.
- SHAMLOUL, A. M., MINAFRA, A., HADIDI, A., GIUNCHEDI, L., WATERWORTH, H. E. and ALLAM, E. K., 1995. *Peach latent mosaic viroid*: Nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution, *Acta Horticulture*, 386: 522-530.
- SHAMLOUL, A. M., HADIDI, A., ZHU, S. F., SINGH, R. P. and SAGREDO, B., 1997. Sensitive detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89-96.

- SHUYUAN, W., WEIRONG, H., CHUNXIAN, C. and DAORONG, F., 1996. Detection of *Citrus exocortis viroid* by *in vitro* inoculation of callus culture. Proceedings of the International Organization of Citrus Virologist, IOCV.
- SINGH, R. P., 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225-227.
- SINGH, R. P. and CLARK, M. C., 1971. Infectious low-molecular weight nucleic acid from tomato. *Biochemical and Biophysical Researches*, 44: 1077-1083.
- SINGH, R. P., BOUCHER, A. and SOMERVILLE, T. H., 1992. Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76 (9): 951-953.
- SINGH, R. P., NIE, X. and SINGH, M., 1999. *Tomato chlorotic dwarf viroid*: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823-2828.
- SINGH, R. P. and READY, K. F. M., 2003. Biological indexing (A. HADIDI, R. FLORES, J. W. RANGLES and J. S. SEMANCIK, editors). *Viroids*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 89-94.
- SINGH, R. P., READY, K. F. M. and NIE, X., 2003. Biology (A. HADIDI, R. FLORES, J. W. RANGLES and J. S. SEMANCIK, editors). *Viroids*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 30-49.
- SINGH, R. P. and DILWORTH, A. D., 2009. *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) in the ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 111-116.
- SINGH, R. P., DILWORTH, A. D., XIAOPING, A., SINGH, M. and BARANWAL, V. K., 2009. *Citrus exocortis viroid* (CEVd) transmission through commercially-distributed seeds of *Impatiens* and *Verbena* plants. *European Journal of Plant Pathology*, 124 (4): 691-694.
- SİPAHİOĞLU, H. M., USTA, M. ve OCAK, M., 2006. Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods. *Journal of Virological Methods*, 137 (1): 120.
- SİPAHİOĞLU, H. M., ERKAN, S. ve GÜMÜŞ, M., 2011. Viroidlerde çoğalma. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (2): 13-24.

- SPENCE, N., 2004. Protected tomato: Sources, survival, spread and disinfection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Report, Project Number: PC 212, Horticultural Development Council, East Malling, Kent, UK.
- SPIEKER, R. L., 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnnea latent viroid*. *Archives of Virology*, 141: 1823-32.
- SPIEKER, R. L., MARINKOVIC, S. and SANGER, H. L., 1996. A viroid from *Solanum pseudocapsicum* closely related to the *Tomato apical stunt viroid*. *Archives of Virology*, 141: 1387-1395.
- SYMONS, R. H., 1981. *Avocado sunblotch viroid*: Primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, 9: 6527-6537.
- ŞENİZ, V., 1992. Domates, biber ve patlıcan yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, İstanbul, 26: 174.
- ŞEVİK, M. A., 2015. Viroidler ve Türkiye’de saptanan viroid hastalık etmenleri. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 2 (1): 63-68.
- TIMMERMAN, C., MUHLBACH, H. P., BANDTE, M. and BUTTNER, C., 2001. Control of mechanical viroid transmission by the disinfection of tables and tools. Proceedings of the 53rd International Symposium on Crop Protection, Gent, Belgium, 66 (2): 151-156.
- TSUTSUMI, N., YANAGISAVA, H., FUJIWARA, Y. and OHARA, T., 2010. Detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Res. Bull. Pl. Prot. Jpn.*, 46: 61-67.
- TÜİK, 2014. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı. (<http://www.tuik.gov.tr>), (Erişim Tarihi: 12.02.2015).
- TÜZEL, Y., GÜL, A., DAŞGAN, H. Y., ÖZGÜR, M., ÇELİK, N., BOYACI, H. F. ve ERSOY, A., 2005. Örtüaltı yetiştiriciliğinde gelişmeler. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı, Ankara, 551-563.
- VERHOEVEN, J. TH. J., JANSEN, C. C. C., WILLEMEN, T. M., KOX, L. F. F., OWENS, R. A. and ROENHORST, J. W., 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823-831.

- VERHOEVEN, J. TH. J., JANSEN, C. C. C. and ROENHORST, J. W., 2006. First report of *Tomato apical stunt viroid* in tomato in Tunisia. 90 (4): 528-528.
- VERHOEVEN, J. TH. J., JANSEN, C. C. C., ROENHORST, J. W., STEYER, S., SCWIND, N. and WASSENGER, M., 2008a. First report of *Solanum jasminoides* infected by *Citrus exocortis viroid* in Germany and Netherlands and *Tomato apical stunt viroid* in Belgium and Germany. *Plant Disease*, 92: 973.
- VERHOEVEN, J. TH. J., JANSEN, C. C. C. and ROENHORST, J. W., 2008b. First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: *Citrus exocortis viroid* in *Verbena* sp., *Potato spindle tuber viroid* in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, *Tomato apical stunt viroid* in *Cestrum* sp. *Plant Pathology*, 57: 399.
- VERHOEVEN, J. TH. J., JANSEN, C. C. C. and ROENHORST, J. W., 2008c. *Streptosolen jamesonii* 'Yellow', a new host plant of *Potato spindle tuber viroid*. *Plant Pathology*, 57: 399.
- VERHOEVEN, J. TH. J., FLORES, R., ROENHORST, J. W. and PENA, M., 2009a. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. *Virus Research*, 144: 209-214.
- VERHOEVEN, J. TH. J., BOTERMANS, M., ROENHORST, J. W., WESTERHOF, J. and MEEKES, E. T. M., 2009b. First report of *Potato spindle tuber viroid* in cape gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. *Plant disease*, 93 (3): 316.
- VERHOEVEN, J. TH. J., 2010. Identification and epidemiology of pospiviroids. PhD Thesis, Wageningen University, Netherlands. (Yayınlanmamış).
- VERHOEVEN, J. TH. J., BOTTERMANS, M., JANSEN, C. C. C. and ROENHORST, J. W., 2010. First report of *Tomato apical stunt viroid* in the symptomless hosts *Lycianthes rantonnetii* and *Streptosolen jamesonii* in Netherlands. *Plant Disease*, 94 (6): 791.
- VIRSCEK-MARN, M. and MAVRIC-PLESKO, I., 2010. First report of *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) in *Petunia* spp. in Slovenia. *Plant Disease*, 94 (9): 1171.

- VIRSCEK-MARN, M. and MAVRIC-PLESKO, I., 2012. First report of *Tomato apical stunt viroid* (TASVd) in *Solanum jasminoides* in Slovenia. *New Disease Reports*, 26: 7.
- VURAL, H., EŞİYOK, D. ve DUMAN, İ., 2000. Kültür sebzeleri. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 440s.
- WALLACE, J. M., 1978. Virus and virus-like diseases. The Citrus Industry, Univ. Caf. Div. Agr. Sel., 67-184.
- WALTER, B., THOUVENAL, J. C. and FAUQUET, C., 1980. Les virus de la tomate en Cote d'Ivoire. *Annales de Phytopathologie*, 12: 259-275.
- WALTER, B., 1987. Tomato apical stunt (T. O. DIENER, editor). The Viroids, Plenum Publishing Corporation, New York, USA, 321-328.
- WAN CHOW WAH, Y. F. and SYMONS, R. H., 1997. A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of viroids in grapevines in the field and tissue culture. *Journal of Virological Methods*, 63: 57-69.
- WANG, Y., SHIBUYA, M., TANEDA, A., KURAUCHI, T., SENDA, M., OWENS, R. A. and SANO, T., 2011. Accumulation of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. *Virology*, 413: 72-83.
- WEATHERS, L. G. and CALAVAN, E. C., 1961. Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus. *Phytopathology*, 51: 262-264.
- WEATHERS, L. G., 1965. Petunia: A herbaceous host of exocortis virus of citrus. *Phytopathology*, 55: 1081.
- WEIDEMANN, H. L. and BUCHTA, U., 1998. A simple rapid method for detection of *Potato spindle tuber viroid* by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1-8.
- WILDE, L., EIDEN, J. and YOLKEN, R., 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimen for detection of group a rotaviruses by RT-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1300-1307.
- YILMAZ, S., FIRAT, A. F., SAYIN, B., ÇELİKYURT, M. A. ve KAYA, N., 2008. Örtüaltı domates yetiştiriciliğinde iyi tarım uygulamaları. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya, 3s.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlköğrenimini Diyarbakır'da, ortaöğrenimini ise İstanbul'da tamamladı. 2009 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2014-2016 yılları arasında yapmış olduğu bu tez çalışmasının sona ermesi ile yüksek lisans öğrenimini tamamlamış bulunmakta.

EKLER

EK-1. TOTAL NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. CTAB Tamponu (Ekstraksiyon Tamponu)

CTAB	:	2,00 gr
PVP-40	:	2,00 gr
100 mM Tris-HCl	:	1,57 gr
20 mM EDTA	:	0,58 gr
1,4 M NaCl	:	8,17 gr

100 ml son hacimde hazırlamak için; yukarıda belirtilen miktarlar 80 ml steril saf su içerisinde çözündürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,0 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, ekstraksiyon çalışmaları yürütülürken % 0,1 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilerek kullanılmıştır.

2. 1X TE Tamponu

10 mM Tris-HCl	:	0,157 gr
1 mM EDTA	:	0,037 gr

100 ml son hacimde hazırlamak için; yukarıda belirtilen miktarlar 80 ml steril saf su içerisinde çözündürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,0 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3. İzopropanol (2-Propanol)

Direkt olarak kullanılmış ve daima +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4. Kloroform : İzoamil Alkol (24 : 1)

Hem kloroform hem de izoamil alkol, direkt olarak kullanılmıştır. 100 ml son hacimde hazırlamak için; 96 ml kloroform ve 4 ml izoamil alkol karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım, ağzı kapalı cam bir kap içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5. % 70'lik Etil Alkol (Etanol)

100 ml son hacimde hazırlamak için; 73,68 ml % 95 oranındaki etil alkol ve 26,32 ml steril distile su karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım, ağzı kapalı cam bir kap içerisinde –20 °C’de muhafaza edilmiştir.

EK-2. ELEKTROFOREZ ÇALIŞMALARI ESNASINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. 1X TAE Tamponu

10 mM Tris-Base	:	1,211 gr
0,5 mM EDTA	:	0,186 gr
5 mM Sodium acetate	:	0,680 gr

1000 ml son hacimde hazırlamak için; yukarıda belirtilen miktarlar 800 ml steril saf su içerisinde çözündürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, otoklavda steril edilerek cam bir kap içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2. %2'lik Agaroz Çözeltisi

100 ml 1X TAE tamponu içerisinde, 2 gram agaroz maddesi çözündürülerek hazırlanmıştır.

3. Etidyum Bromür Çözeltisi

1 ml saf su içerisinde 10 mg etidyum bromür maddesi çözündürülerek, stok çözelti elde edildikten sonra 100 ml saf suya 30 µl stok çözeltisi eklenerek kullanılmıştır. Hazırlanan bu karışım, koyu renkli bir kap içerisinde karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

EK-3. MEKANİK İNOKULASYON ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. 1X TKM Tamponu

10 mM Tris-HCl	:	1,211 gr
10 mM KCl	:	0,745 gr
1 mM MgCl ₂	:	0,203 gr

1000 ml son hacimde hazırlamak için; yukarıda belirtilen miktarlar 800 ml steril saf su içerisinde çözdürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 7,4 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, otoklavda steril edilerek cam bir kap içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2. %2'lik Hipo Çözeltisi (Sodyum Hipoklorit)

100 ml son hacimde hazırlamak için; 13,3 ml % 15 oranındaki piyasada ticari olarak satılan çamaşır suyu ve 86,7 ml steril saf su karıştırılmıştır. Yürütülen mekanik inokulasyon çalışmaları esnasında, kullanılan çeşitli ekipmanların sterilizasyonu amacı ile kullanılmıştır.