

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yüşra EKER

**TURUNÇGİL AĞAÇLARINDA UR OLUŞUMLARININ TURUNÇGİL
VİROİDLERİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TURUNÇGİL AĞAÇLARINDA UR OLUŞUMLARININ TURUNÇGİL
VİROİDLERİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

YÜŞRA EKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez 28/09/2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof.Dr. Nüket ÖNELGE	Doç.Dr. Yıldız Aka KAÇAR	Yrd.Doç.Dr.Muharrem KAMBEROĞLU
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.**

Proje No: ZF2008YL6

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TURUNÇGİL AĞAÇLARINDA UR OLUŞUMLARININ TURUNÇGİL
VİROİDLERİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

YÜŞRA EKER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Yıl : 2009, **Sayfa:** 63

Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Doç. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Yrd. Doç. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU

Bu çalışma Adana ilinde gövdelerinde ur benzeri yapıya sahip turunçgil ağaçlarında turunçgil viroidleri yönünden bulaşıklık olup olmadığını, bulaşıklık var ise bu ağaçların nasıl bir viroid profiline sahip olduklarını belirlemek amacı ile yürütülmüştür. Biyolojik indeksleme çalışmasında genel viroid belirtileri olan yaprak epinastisi, damar nekrozları, bodurluk, yaprak ucu nekrozu ve düşük yapraklılık belirtileri gözlenmiştir. Biyolojik indeksleme sonuçları ile sPAGE sonuçları benzerlik göstermiştir. Yapılan sPAGE analizleri sonucu seçilen beş portakal ağacının biri hariç hepsinde bir veya birden fazla viroid bandı belirlenmiştir. Bir ağaç temiz olup hiçbir viroid bandına rastlanmamıştır. CEVd dört ağaçta ortak viroid olarak belirlenmiştir. Adana(2) ve Adana (5) portakal ağaçlarında yalnızca CEVd saptanmıştır. Kozan (3) Valensiya ağacında CEVd'e ek olarak CVd-IIa ve CVd-IV, Kozan (4) Valensiya ağacında ise CEVd'e ek olarak CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb ve CVd-IV belirlenmiştir. Çalışma sonucunda gövdelerinde ur benzeri yapılar taşıyan portakal ağaçlarının ortak bir viroid profili içermediği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil viroidleri, sPAGE, Turunçgil, Ur.

ABSTRACT

MSc THESIS

EXAMINING TUMOR FORMATIONS OF CITRUS TREES IN RELATION TO CITRUS VIROIDS

YÜŞRA EKER

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

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Year : 2009, **Pages:** 63

Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Ass. Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Ass. Prof. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU

This study was carried out to find out if tumor-carrying trees were infected by viroids; if so, determining what kind of viroid profile these trees have. During biological indexing method, common viroid symptoms were noticed such as leaf curling, leaf necrosis, dwarfing, petiole necrosis, leaf tip browning and dropping leaf. Results of biological indexing method were consistent with sPAGE results. Five orange trees were chosen as a result of sPAGE analysis. There were at least one or more viroid bands seen in four of these five trees. Only one tree was clean and no viroid band was seen. CEVd was common viroid in all four of them. Adana (2) and Adana (5) orange trees were infected with only CEVd viroid. Kozan (3) Valencia tree was carrying CVd-IIa and CVd-IV in addition to CEVd viroids. Kozan (4) Valencia trees were infected with CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb and CVd-IV as well as CEVd viroids. Results of the study point out that trees carrying tumor like formations do not have any common viroid profile.

Keywords: Citrus viroids, sPAGE, Citrus, Tumor.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bana yardımcı olan, desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye katkılarından dolayı teşekkür ederim. Tez çalışmamın farklı aşamalarında emeği geçen sayın Dr. Orhan BOZAN'a ve laboratuvar çalışmalarımıdaki yardımından dolayı Ziraat Mühendisi Medine GÖK'e teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan maddi manevi yönden desteğini esirgemeyen aileme özellikle anneme, eşime ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bunlara ek olarak çalışmanın yürütülmesinde maddi olanak sağlayan Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyal	22
3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyal	22
3.2. Metod.....	23
3.2.1. Belirlenen Ağaçlardan Materyal Alımı	23
3.2.2. İndikatör Bitkilerin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi	23
3.2.3. Biyolojik İndeksleme Yöntemi	23
3.2.4. Moleküler Çalışmalarla İlgili Yöntemler	24
3.2.4.1. İndikatör Bitkilerden Nükleik Asit Ekstraksiyonu ve Purifikasyon Yöntemi.....	24
3.2.4.2. Nükleik Asitlerin Ardışık Poliakrilamid Jel Elektroforez (sPAGE) Yöntemi ile Analiz Edilmesi	26
3.2.4.3. Elde Edilen Viroid RNA'larının Gümüş Nitrat (AgNO ₃) Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	28
4.1. Arazi Gözlemleri	28
4.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları ile İlgili Bulgular.....	30
4.2.1. Kavlama Hastalığının İndekslemesine Ait Bulgular.....	30
4.2.2. Göçüren Hastalığının İndekslemesine Ait Bulgular	31

4.2.3. Turunçgil Viroidlerinin İndekslenmesine İlişkin Bulgular	31
4.3.Turunçgil Viroidlerinin Ardışık Poliakrilamid Jel Elektroforez (sPAGE)	
Yöntemi ile Araştırılmasına İlişkin Bulgular	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	58
EKLER.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1.	Turunçgil viroidlerinin sınıflandırılması ve turunçgil hastalıklarıyla olan ilişkileri	10
Çizelge 2.2.	Nükleotid Dizilimi Bilinen Viroidlerin Listesi	11
Çizelge 2.3.	Turunçgil Viroidlerinin Etrog citron Bitkisi Üzerinde Geliştirdikleri Değişik Simptom Grupları.....	15
Çizelge 4.1.	İncelenen Portakal Ağaçları ve Kontrollerin Etrog citron İndikatör Bitkisinde Geliştirdikleri Viroid Simptomları	33
Çizelge 4.2.	Biyolojik İndeksleme ve sPAGE Analizleri ile Viroidlerin Tanısında İnokulasyon Sonrası Gerekli Minimum İnkübasyon Peryotları	38
Çizelge 4.3.	sPAGE Analizi Sonucu Jel Üzerinde Oluşan Bandlara Göre Belirlenen Viroidler	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1.	Ur benzeri yapıya sahip Adana (2) (Valensiya) ağacının genel görünüşü	28
Şekil 4.2.	Gövdesinde ince yatay çizgi şeklinde kabarıklıklar gelişmiş Kozan(3) (Valensiya) ağacı	29
Şekil 4.3.	Etrog citron bitkisinde gelişen orta şiddetli yaprak epinastisi semptomu A. Kozan (3), B. Kozan (4).....	34
Şekil 4.4.	Etrog citron bitkisinde gelişen şiddetli yaprak epinastisi semptomu A. Kozan (4), B. Pozitif Kontrol.....	34
Şekil 4.5.	A- Kozan (4) Valensiya ağacının Etrog citronda geliştirdiği epinasti ve yaprak ucu kahverengileşmesi semptomu B- Kozan (3) Valensiya ağacının Etrog citronda geliştirdiği yaprak ucu kahverengileşmesi	35
Şekil 4.6.	Etrog citron üzerinde Kozan (4) (Valensiya) ağacının geliştirdiği yaprak düşüklüğü semptomu.....	36
Şekil 4.7.	Etrog citron yaprak damarı ve gövdesinde genel nekroz semptomu (Kozan (4)).....	36
Şekil 4.8.	Ur benzeri yapı gösteren turuncgil ağaçlarından alınan örneklerin biyolojik indeksleme sonrası sPAGE analizi sonuçları1. Pozitif kontrol CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III, CVd-IV; 2. Negatif kontrol; 3. Kozan (4) CEVd, CVd-I, CVd-IV;4.Kozan (3) CEVd, CVd-IV; 5. Adana (2) CEVd ; 6. Adana (5) CEVd; 7. Adana (1).....	41
Şekil 4.9.	Ur benzeri yapı gösteren turuncgil ağaçlarından alınan materyallerinbiyolojik indekslenmesi sonrası indikatör bitkilerden elde edilen viroid RNA'larının %5'lik poliakrilamid jelde sPAGE yöntemi ile analizi sonuçları. 1. Adana(1); 2. Adana (2) CEVd; 3. Adana (5) CEVd ; 4. Kozan (4) CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb,	

CVd-IIIb, CVd-IV ; 5.Kozan (3) CEVd, CVd-IIa ve CVd-IV; 6. Pozitif kontrol CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb, CVd-IV. 7. Negatif kontrol.....	42
---	----

1. GİRİŞ

Anavatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olan turunçgiller genel olarak tropik ve subtropik iklim alanlarında yetişebilmekte, sıcaklığın -4 °C'nin altına düşmediği yörelerde ise ticari anlamda yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Ülkemizde ise Akdeniz, Ege ve kısmen de Doğu Karadeniz bölgelerinde yetiştirilmektedir.

Dünyadaki en büyük turunçgil üreticisi ülkeler; Brezilya, Çin ve ABD'dir. Türkiye ise üretim miktarı yönünden dünyada ilk 10 üretici arasında yer almaktadır. Turunçgil yetiştiriciliği ülkemiz tarımında ve dışsatımında oldukça önemli bir tarım kolunu oluşturmaktadır. FAO verilerine göre Türkiye'nin turunçgil üretimi 2.972.000 tondur (Anonymous, 2007a).

Türkiye'de illere göre turunçgil üretimi incelendiğinde üretimin %29'unun Adana'da, %27'sinin Mersin'de, %14'ünün Antalya'da ve %5'inin ise Muğla'da gerçekleştiği görülmektedir (Anonymous, 2006a).

Dış ticarete son üç yılda Türkiye'nin yaş meyve ve sebze ihracatının yarısının turunçgillerden karşılanıyor olması ve en çok ihracatı yapılan meyve olması turunçgil üretiminin Türkiye açısından önemini ortaya koymaktadır. (Anonymous, 2006b).

İç tüketimimizin ve dış ticaretimizin önemli tarımsal ürünü olan turunçgillerde, ürün kaybına neden olan birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Bu sorunların en başında da, ağacın potansiyel gücünü ve verimliliğini azaltan, hatta bazı durumlarda ağacın yok olmasına sebep olan viroid, virüs ve virüs benzeri hastalıklar gelmektedir.

Viroid, virüs ve virüs benzeri hastalıkların turunçgil teknolojisi gelişmemiş ülkelerde verimi %10-50 oranında azalttığı belirtilmiştir (Futch ve Brlansky, 2004).

Kültür bitkilerinde ekonomik zarar oluşturan viroidler 20. yy. ortalarına kadar birçok araştırmacı tarafından klasik olarak bitki virüsleri olarak düşünülmekteydi (Bitters, 1952; Salibe, 1965; Weathers ve ark, 1967). Ancak 1967 yılında patates iç yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığı ve yeni bir patojen grubu olan viroidler tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir (Diener ve Raymer, 1967). Bu araştırmacılar hastalıklı patateslerde yaptıkları çalışmalarda virüs partikülleri yerine, hücrede serbest olarak bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip RNA'lar izole

etmişlerdir. Böylece ilk defa protein mantoya sahip olmayan, virüslerden farklı, küçük molekül, tek sarmallı RNA’lardan oluşan patojenleri tanımlamak için viroid terimi kullanılmaya başlanmıştır.

Viroidler çoğaltma materyali ile taşınan, ısıya son derece dayanıklı olan RNA’dan meydana gelen en küçük bitki patojenleridir. En küçük virüs genomundan daha küçük olan viroidlerin 246-375 nükleotide sahip olup, canlılar aleminde sadece çiçekli bitkilerde zarar oluşturduğu bildirilmektedir (Riesner ve Gross, 1985). Ancak insanlarda karaciğer enfeksiyonlarına neden olan ve Hepatit B virüsünün varlığında meydana gelen Hepatit D hastalığı etmeninin orijini netlik kazanmamış olup viroid olduğu yönünde görüşler mevcuttur (Anonymous, 2007b).

Viroidler çok sayıda ekonomik önemde hastalığa neden olmaları dolayısıyla önemlidirler ve infektiföz hastalık etmeni olarak en küçük patojen grubunu oluşturmaları nedeni ile de biyolojik olarak 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. Ayrıca genel olarak bitkinin büyümesinde ve gelişmesinde bazı değişikliklere neden oldukları veya latent olarak konukçu hücreleri içinde bulundukları bildirilmiştir. Viroidlerden bazısının bitkilerde hastalık oluşturduğu saptanmış olmasına rağmen henüz hastalık etmeni olarak tanımlanmamış viroidlerin de bulunduğu belirtilmektedir (Semancik ve Szychowski, 1992).

Viroidler özel bir manto proteinine sahip olmadıkları için bunların teşhisinde enzyme– linked immunosorbent assay (ELISA) gibi hızlı immunolojik yöntemlerden yararlanma olanağı yoktur. Bu nedenle bunların tanısında indikatör bitkilerin yer aldığı biyolojik indeksleme yöntemi kullanılmaktadır. Son yıllarda viroidlerin teşhisi için bazı moleküler biyoloji tekniklerinden yararlanılmaya başlanmıştır. Özellikle poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ve hibridizasyon teknikleri ile daha doğru ve detaylı viroid teşhisleri yapılmaktadır (Riesner ve Gross, 1985; Semancik, 1987). Ayrıca bu iki teşhis yöntemi birbirlerini tamamlar şekilde de kullanılabilmektedir (Semancik, 1987). Bitki viroidlerinin teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin kullanılabileceği de ilk kez 1990 da rapor edilmiştir (Hadidi ve Yang, 1990).

Viroidlerin Dünya’da yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir. Özellikle hindistan cevizi, avokado ve patatesten viroid etkisi nedeni ile önemli verim kayıplarının meydana geldiği bildirilmiştir. En küçük viroid olan, 246 nükleotide sahip Coconut Cadang Cadang Viroidi (CCCVd)’nin 1982 yılında Filipinler’de 30 milyondan fazla hindistan cevizi ağacını öldürdüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 ağacın viroid enfeksiyonları nedeni ile yok olduğu rapor edilmiştir (Hanold ve Randles, 1991).

Şerbetçiotu Cüceleşme Viroidi (HSVd)’nin 1968 yılında Japonya’da şerbetçiotu yetiştirilen alanların %17’sinde bulunduğu, bazı bahçelerde %60 enfeksiyon oranlarına ulaştığı ve verimde büyük kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark, 1973).

Çınar ve arkadaşlarının (1993) bildirdiğine göre, ülkemiz turuncgil yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına neden olan toplam 15 viroid, virüs ve virüs benzeri hastalık bulunmaktadır. Bunlardan gözenekleşme (Turuncgil Cachexia Viroidi) ve cüceleşme (Turuncgil Exocortis Viroidi) hastalıkları viroid karakterlidir (Semancik ve Weathers, 1972; Semancik ve ark, 1988). Ülkemizde yapılan bir survey çalışmasında, mevcut ağaçların çoğunun bu patojenlerden biri veya birkaçı ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Güllü, 1989).

1964 yılında Antalya Turuncgiller Araştırma Enstitüsü’nde turuncgil virüs ve virüs benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla başlatılan çalışmada çalışmaya alınan ağaçların %30’unun cachexia-xyloporosis hastalığı ile, %72.7’sinin ise exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Hızal ve Göral, 1987).

Üç yapraklı anacının kullanıldığı Ege bölgesinde 1964-1965 yılları arasında yapılan bir çalışmada, yaklaşık 2,5 milyon turuncgil ağacının bulunduğu bu bölgede ağaçların %23’ünün cachexia-xyloporosis hastalığı ile, %10’unun exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Özalp ve Azeri, 1967).

Azeri ve Heper (1973), Ege bölgesinde yetiştirilen Satsuma mandarin ağaçlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla yaptıkları sorvey ve indeksleme çalışmaları sonucunda satsuma ağaçlarının %4.26’sının exocortis, %1.58’inin cachexia-xyloporosis hastalıklarıyla bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

1988 yılında Doğu Akdeniz bölgesinde navel grubu portakal ve Satsuma ağaçlarında yaygın virüs ve virüs benzeri hastalıkların saptanması amacıyla yapılan survey ve indeksleme çalışmalarında, Satsuma mandarinlerinin %37 oranında gözenekleşme hastalığı ile bulaşık olduğu ve indekslenen 16 Vaşington navel ağacının da 13'ünün CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Güllü, 1989).

Turunęillerde viroid hastalıkları olarak yukarda belirtilen iki hastalık isimlendirilmiş olmasına karşın, bugün turunęillerde birbirinden farklı 12 adet viroidin tanısı yapılmıştır (Semancik ve Duran-Vila, 1991) ve bunlardan yalnızca ikisinin hastalık oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak turunęil ağaçlarında pek çok hastalık görüntüsü mevcut olup bunlar üzerinde henüz araştırma yapılmamıştır ve ur benzeri belirtiler de bunlardan biri olduğu için bu çalışma gövdelerinde ur benzeri gelişim gösteren turunęil ağaçlarını turunęil viroidleri açısından incelemek ve bu ağaçların Etrog citron bitkisi üzerindeki simptom tablosunu ortaya koymak amacıyla yürütölmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kültür bitkilerinde ekonomik zarar meydana getiren ve günümüzde viroid olarak adlandırılan nedensel etmenin yakın zamana kadar virüs olarak değerlendirildiği ile ilgili birçok rapor bulunmaktadır (Hadidi ve ark, 2003).

Diener ve Raymer (1967), patates iğ yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığını ve yeni bir patojen grubu olan viroidler tarafından oluşturulduğunu belirlemiştir. Bu araştırmacılar hastalıklı patateslerde yaptıkları çalışmalarda virüs partikülleri yerine, hücrede serbest olarak bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip RNA'lar izole etmişler ve patates iğ yumru hastalığına viroid olarak tanımlanan ilk patojen olma özelliğini kazandırmışlardır. Böylelikle ilk defa protein mantoya sahip olmayan, virüslerden farklı, küçük molekülü, tek sarmallı RNA'lardan oluşan patojenleri tanımlamak için viroid terimi kullanılmaya başlanmıştır.

Viroidlerin Dünya'da yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir. Ekonomik anlamda önemli kayıpların meydana geldiği bitkilerden bazıları patates, asma, turunçgil, hindistan cevizi, şerbetçi otu, domates, avokado, şeftali, elma, armut, patlıcan, ve krizantemdir. Viroidlerin öldürücü, şiddetli, orta şiddetli, değişebilen, bodurluk oluşumu gibi zarar şekillerinin bulunduğu, bunların da ürün ve kalite kaybına neden olduğu tespit edilmiştir (Randles, 2003).

Özellikle hindistan cevizi, avokado ve patateste viroid etkisi nedeni ile önemli verim kayıplarının meydana geldiği bildirilmiştir. En küçük viroid olan, 246 nükleotide sahip Coconut Cadang Cadang Viroidi (CCCVd)'nin 1982 yılında Filipinler'de 30 milyondan fazla hindistan cevizi ağacını öldürdüğü ve her yıl yaklaşık 500.000 ağacın viroid enfeksiyonları nedeni ile yok olduğu rapor edilmiştir (Hanold ve Randles,1991).

Şerbetçiotu Cüceleşme Viroidi (HSVd)'nin 1968 yılında Japonya'da şerbetçi otu yetiştirilen alanların %17'sinde bulunduğu, bazı bahçelerde %60 enfeksiyon oranlarına ulaştığı ve verimde büyük kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark, 1973).

Gözle görülür bir zararın gözlemlendiği bu viroid hastalıklarının yanında simptomsuz olarak taşınan birçok viroid bulunmaktadır. Simptomsuz taşınan bu viroidlerin bazıları yüksek oranda enfeksiyon meydana getirmektedir. Gözlenebilir belirtilerin yokluğunda hastalıklı bitkiler simptomolojik olarak teşhis edilememekte ve yetiştirildikleri alanlardan uzaklaştırılamamaktadır. Bu bitkiler viroidlerin daha çok yayılması için kaynak oluşturmaktadır (Randles, 2003)

Şerbetçiotu Latent Viroidi (HLVd)'nin dünyadaki tüm şerbetçiotu çeşitlerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir (Puchta ve ark, 1988a). İngiltere'de bazı ticari şerbetçiotu alanlarında bitkilerin %89'unda HLVd belirlenmiştir. Şerbetçiotu Latent Viroidi latent bir viroid olarak tanımlanmışsa da potansiyel olarak ciddi bir patojen olarak düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir (Barbara ve ark, 1990).

PSTVd'den sonra viroid olarak bildirilen ikinci bitki patojeni, turuncgil ağaçlarında hastalık oluşturan Turuncgil Exocortis Viroidi (CEVd) olup, 1972 yılında Semancik ve Weathers (1972) tarafından viroid olarak tanımlanmıştır.

Turuncgil Exocortis Viroidi (CEVd), tek iplikçikli, circular veya linear formda, yaklaşık 105.000 dalton ağırlığında, RNA zincir uzunluğu 371 nükleotid olup *Rutaceae*, *Solanacea* ve *Compositae* familyalarında hastalık oluşturmaktadır (Rivera-Bustamente ve Semancik, 1986; Roistacher ve ark, 1978; Semancik ve Weathers, 1972; Semancik, 1987).

Exocortis hastalığı ilk kez Fawcett ve Klotz tarafından 1948 yılında Kaliforniya'da tanımlanmış ve hastalığın aşısı gözü ile taşındığı ortaya konmuştur (Benton ve ark, 1949,1950). Hastalık Amerika'nın turuncgil yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerinde mevcuttur ve üç yapraklı üzerinde Avustralya'da (Benton ve ark, 1949) ve Rangpur laym (*Citrus limonia*) üzerinde de Brezilya'da (Moreira 1955, 1959) rapor edilmiştir.

Portakal, altıntop, mandarin ve özellikle de turunc üzerinde herhangi bir semptom geliştirmeksizin, latent halde bulunmaktadır. Turunc patojeni simptomsuz taşınması ve yaygın anaç olarak kullanılması nedeniyle, hastalığın turuncgil alanlarındaki gerçek dağılımı bilinmemektedir. Ancak hastalığın dünyada turuncgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm bölgelerde yaygınlığı rapor edilmiştir (Wallace, 1978; Duran-Vila ve ark, 1988).

Özellikle Turunçgil Tristeza Virüsü (CTV)'nün turunçgil alanlarında yoğun kayıplar oluşturmamasından sonra CEVd gerçek anlamda sorun olarak ortaya çıkmıştır. Birçok üretici CTV'ye duyarlı turunç anacı yerine üç yapraklı ve üç yapraklı hibritlerini anaç olarak kullanmaya başlamıştır. Bunun sonucu ancak CTV'ye tolerant olan bu anaçlar CEVd'ye duyarlı olduğu için kısa sürede CEVd'nin bir problem olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur (Semancik, 1987).

CEVd üç yapraklı anacının toprak üzerinde kalan kısımlarında kabuk çatlamalarına, soyulmalara ve ağaç gelişmesini engelleyerek de bodurluğa neden olmaktadır (Benton ve ark,1949).

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

CEVd, duyarlı olmayan turunçgil ağaçlarında herhangi bir simptom geliştirmeksizin, ağaçlarda bodurlaşmaya neden olabilmektedir. Çoğu ticari tür ve çeşitler tolerant olmasına karşın, bu bitkiler duyarlı anaçlara aşılandığında hastalığın bir göstergesi olarak anaçta kabuk kavlamaları görülür (Benton ve ark,1949).

Hastalığın ekonomik zararı, daha çok verim azalması ve ağaç ömrünün kısılması nedeni ile olmaktadır. Cüceleşme hastalığının turunçgil ağaçlarının gelişimini önleyip, bodur bırakmasının yanında, meyve kalitesine olumsuz bir etkisi yoktur. Ancak ağaç tacının küçülmesine bağlı olarak elde edilen ürün miktarının azaldığı belirtilmektedir (Broadbent ve ark, 1988). Salibe ve Moreira (1968) exocortis hastalığının, enfekteli ağaçlarda erken meyve vermeyi teşvik ettiğini, fakat Rangpur laymı anacının exocortis hastalığının şiddetli ırkı ile enfekteli olması durumunda verimin ortalama %40-60 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Yamada ve Tanaka (1972) Turunçgil Exocortis Viroidi ile bulaşık üç yapraklı anacı üzerindeki Satsuma mandarin fidanlarında yaptıkları bir çalışmada, sürgün uzunluğunun ve gövde çapının kontrol bitkilere oranla %10 ile %40 oranında küçüldüğünü saptamışlardır.

Günümüzde CEVd'nin kabuk kavlaması göstermeyen, ancak bodurlaşmaya neden olan ırkı veya ırkları yetiştiricilikte birim alanda fazla sayıda ağaç bulundurmak ve üretimi artırmak amacı ile kullanılmaktadır. İlk uygulamalar

portakal ve mandarinlerde Avustralya’da yapılmıştır. Böylece yüksek ürün yanında kültürel işlemlerde ve hasat işlemlerinde de kolaylıklar sağlanmaktadır (Broadbent ve ark, 1988).

Turunçgillerde CEVd’den sonra belirlenen ikinci viroid Turunçgil Cachexia Viroididir (CCaVd) ve bu viroidin neden olduğu mandarin ve mandarin hibritlerinin aşı birleşme noktasında floemde renk bozulması ve zamklanma simptomları ile karakterize edilen cachexia hastalığı 1950 yılında Childs tarafından Latince kötü anlamına gelen kakos ve koşul anlamına gelen hexis sözcüklerinin birleştirilmesi ile kötü koşul anlamında cachexia olarak adlandırılmıştır. 299 nükleotide sahip olan bu hastalık etmeninin Turunçgil Cachexia Viroidi tarafından oluşturulduğu Semancik ve ark (1988) tarafından belirlenmiştir.

Semancik ve Roistacher (1991), Kaliforniya üniversitesi ve İspanya ortak çalışmaları sonucunda cachexia hastalık sendromunun özellikle CVD-IIb tarafından oluşturulduğunu ve bu nedenle hastalık etmeni için Turunçgil Cachexia Viroidi (CCaVd) teriminin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Cachexia hastalığının karakteristik simptomları duyarlı turunçgil çeşitlerinin kalem kısmında aşı birleşme yerinden başlayarak yukarı primer dallara kadar ilerleyen floem renklenmesi, odunda çukurluklar ve buna karşı gelecek şekilde kabuk kambiyal yüzeyinde zamklı çıkıntılar şeklindedir (Calavan ve ark, 1961).

Cachexia hastalığına duyarlı türler; mandarin ve mandarin hibritleri, Parson’s Special mandarin, *C. macrophylla* ve Orlando tangelo’dur (Calavan ve Christiansen, 1965). Etmen dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelerde bulunmaktadır ve özellikle mandarin ve hibritlerinde yaygındır. Cachexia (gözenekleşme) hastalığı nedeni ile oluşan kayıpların cüceleşme hastalığına oranla çok daha fazla olduğu ve bu hastalığın varlığında ağaçların tamamen verimden düşüp geriye doğru ölümlerin yaşandığı bildirilmiştir (Reichert ve Bental, 1957).

Özellikle hastalığın duyarlı çeşitler üzerinde oluşturduğu kayıpların %75’in üzerinde olduğu ve cachexia hastalığının bu derece yaygın olmasının çeşit değiştirme işlemlerinde enfekteli ağaçlara duyarlı çeşitlerin aşılmasının büyük rol oynadığı belirtilmektedir (Semancik, 1987).

Turunçgillerde viroid hastalıkları olarak genellikle exocortis ve cachexia bilinmesine karşın, bugün turunçgillerde birbirinden farklı 12 adet viroidin tanısı yapılmıştır (Semancik ve Duran-Vila,1991).

Roistacher ve ark (1993), turunçgil viroidlerinin saf izolatları ile inokule ettikleri üç yapraklı anacına aşılı Valensiya portakalında ;

-CVd-Ia nedeniyle trifoliate gövdesinin odun kısmında derin çukurluklar şeklinde simptomlar (Trifoliate deep pit)

-CVd-IIa nedeniyle trifoliate gövdesinde zayıftan orta seviyeye kadar değişen kabuk çatlamları şeklinde simptomlar (Trifoiate mild bark carcking)

-CVd-IIIb nedeni ile de gövdenin daralması veya el izine benzer yatay çizgili oluk şeklinde simptomlar (Trifoliate finger imprint) gözlemişlerdir.

Viroidlerin sınıflandırılması ilk kez 1989 yılında Koltunow ve Rezaian tarafından yapılmıştır. Günümüzde nükleotid dizilim benzerliklerine dayanan taksonomik olarak *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* olmak üzere iki ayrı familyaya ayrılan yaklaşık 30 viroid türü bilinmektedir (Flores ve ark, 2000) ve doğrudan neden olunan hastalıklara ilave olarak birkaç latent viroid enfeksiyonu daha bulunmaktadır.

Viroid familyaları yapısal yönden farklılıklar göstermektedir. *Avsunviroidae* familyasına dahil viroidlerin çekiçbaşı yapısına sahip olup kendi kendine yarılma özelliği gösterdikleri (Symons, 1981; Hutchins ve ark, 1986), *Pospiviroidae* familyasına dahil viroidlerin ise oldukça iyi korunmuş merkez bölgeye sahip oldukları bildirilmiştir (Keese ve Symons, 1985; Sano ve ark, 1992).

Viroid familyalarında replikasyon yönünden de farklılıklar görülmektedir. *Pospiviroidae* familyasında yer alan viroidlerin çekirdekte replike olduğu (Keese ve Symons, 1985; Sano ve ark, 1992), *Avsunviroidae* familyasında yer alan viroidlerin ise kloroplastlarda replike olduğu belirtilmiştir (Symons, 1981; Hutchins ve ark, 1986).

Semancik ve Duran-Vila (1991), turunçgillerde bulunan ve 275 ile 371 nükleotid sayı arasında değişen moleküler ağırlığa sahip viroidleri ;

- %5'lik sPAGE'de elektriksel hareketlerine göre,
- cDNA probları kullanılarak moleküler hibridizasyon yöntemi ile dizilim benzerliklerinin belirlenmesine göre,
- Konukçu aralıklarına göre,
- Etrog citron üzerinde geliştirdikleri semptomlara göre 4 grup altında toplamışlardır.

Çizelge 2.1.Turunçgil viroidlerinin sınıflandırılması ve turunçgil hastalıklarıyla olan ilişkileri (Semancik ve Duran-Vila, 1991)

	TURUNÇGİL VİROİDLERİ		
	CİNSLER	VİROİDLER	HASTALIKLAR
FAMİLYA POSPİVİROİDAE	POSPİVİROİD	CEVd	<i>Exocortis</i>
	APSCAVİROİD	CVd-I (CBLVd) CVd-Ia CVd-Ib CVd-Ic	
	HOSTUVİROİD	CVd-II (HSVd) CVd-IIa CVd-IIb CVd-IIc	<i>Cachexia</i>
	APSCAVİROİD	CVd-III CVd-IIIa CVd-IIIb CVd-IIIc CVd-IIId CVd-V	
	COCADVİROİD	CVd-IV	

Çizelge 2.2.Nükleotid Dizilimi Bilinen Viroidlerin Listesi (Flores ve ark, 2005)

Familya	Cins Adı	Türler	Nükleotid sayısı
Pospiviroidae	POSPIVIROID	PSTVd (Potato spindle tuber)	356,359-360
		TCDVd (Tomato chlorotic dwarf)	360
		MPVd (Mexican papita)	360
		TPMVd (Tomato planta macho)	360
		CSVd (Chrysanthemum stunt)	354,356
		CEVd (Citrus exocortis)	370-375,463
		TASVd (Tomato apical stunt)	360-363
		IrVd1 (Iresine 1)	370
		CLVd (Columnea latent)	370,372
	HOSTUVIROID	HSVd (Hop stunt)	295-303
	COCADVIROID	CCCVd (Coconut cadang cadang)	246-247,287-301
		CTiVd (Coconut tinangaja)	254
		HLVd (Hop latent)	256
		CVd-IV (Citrus IV)	284
	APSCAVIROID	ASSVd (Apple scar skin)	329-330
		CVd-III (Citrus III)	294-297
		ADFVd (Apple dimple fruit)	306-307
		GYSVd 1 (Grapevine yellow speckle1)	366-368
		GYSVd 2 (Grapevine yellow speckle2)	363
		CBLVd (Citrus bent leaf)	318
		PBCVd (Pear blister canker)	315-316
		AGVd (Australian grapevine)	369
	COLEVIROID	CbVd 1 (Coleus blumei 1)	248,250-251
		CbVd 2 (Coleus blumei 2)	301-302
		CbVd 3 (Coleus blumei 3)	361-362,364
Avsunviroidae	AVSUNVIROID	ASBVd (Avocado sunblotch)	246-250
	PELAMOVİROID	PLMVd (Peach latent mosaic)	337
		CChMVd (Chrysanthemum chlorotic mottle)	399
	ELAVİROID	ELVd (Eggplant latent)	

Serra ve ark, (2008) turunçgillere akraba olan viroid hastalıklarına immun *Atalantia citroides* bitkisinde yeni bir viroid tespit etmişler ve CVd-V olarak adlandırmışlardır. CVd-V *Pospiviroidae* familyası içinde Apscaviroid genusuna dahil yeni bir tür olarak ileri sürülmüştür. 293-294 nükleotide sahiptir. Etrog citron ve Orlando tangelo üzerinde yapılan biyolojik indeksleme ve bunu takip eden sPAGE analizleri sonucu HSVd ve CVd-III ile benzer viroid benzeri RNA'nın varlığı ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar ABD, İspanya, Nepal ve Umman'ın farklı turunçgil yetiştiricilik alanlarından topladıkları 64 örneği de analiz etmiş ve CVd-V yönünden bulaşıklık tespit etmişlerdir.

Ülkemizde turunçgil viroidlerinin varlığı ilk kez yabancı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. FAO uzmanı olarak ABD'den ülkemize davet edilen Norman (1963) ülkemiz hükümetine verdiği raporda turunçgil ağaçlarında farklı virüs hastalıklarının yanı sıra exocortis ve cachexia hastalıklarının da bulunduğunu bildirmiştir.

Turunçgil cüceleşme hastalığının Türkiye'de var olduğu ilk olarak Norman (1963) ve Moreira (1965) tarafından bildirilmiştir.

1964 yılında Antalya Turunçgiller Araştırma Enstitüsü'nde turunçgil virüs ve virüs benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla başlatılan çalışmalar 1977 yılına kadar devam etmiş ve çalışmaya alınan ağaçların %30'unun cachexia-xyloporosis hastalığı ile, %72.7'sinin ise exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Hızal ve Göral, 1987).

Üç yapraklı anacının kullanıldığı Ege bölgesinde 1964-1965 yılları arasında yapılan bir çalışmada, yaklaşık 2,5 milyon turunçgil ağacının bulunduğu bu bölgede ağaçların %23'ünün cachexia-xyloporosis hastalığı ile, %10'unun exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Özalp ve Azeri, 1967).

Azeri ve Heper (1973) Ege bölgesinde yetiştirilen Satsuma mandarin ağaçlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla yaptıkları survey ve indeksleme çalışmaları sonucunda Satsuma ağaçlarının %4.26'sının exocortis, %1.58'inin cachexia-xyloporosis hastalıklarıyla bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

Doğu Akdeniz bölgesinde yapılan diğer bir çalışmada, gözenekleşme hastalığının latent olarak bulunduğu Vaşington navel, Yafa ve Valensiya ağaçlarında

hastalığın varlığı biyolojik indeksleme çalışmaları sonunda ortaya konmuştur (Güldür, 1988).

1988 yılında Doğu Akdeniz bölgesinde navel grubu portakal ve Satsuma ağaçlarında yaygın virüs ve virüs benzeri hastalıkların saptanması amacıyla yapılan survey ve indeksleme çalışmalarında, Satsuma mandarinlerinin %37 oranında gözenekleşme hastalığı ile bulaşık olduğu ve indekslenen 16 Vaşington navel ağacının da 13'ünün CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Güllü, 1989).

Çınar ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları çalışmaya göre ülkemiz turunçgil yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına neden olan toplam 15 viroid, virüs ve virüs benzeri hastalık bulunmaktadır. Ülkemizde yapılan bir survey çalışmasında, mevcut ağaçların çoğunun bu patojenlerden biri veya birkaçı ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Güllü, 1989).

Viroide spesifik hastalık belirtileri farklı ürünlerde değişik şekillerde gözlenebilmektedir. Bununla beraber belirgin hastalık belirtilerine neden olmayan latent viroidlerin, bağ ve şerbetçi otu gibi vejetatif çoğaltılan ürünlerde ve aşı gözü ile çoğaltılan turunçgillerde yaygın oldukları ortaya koyulmuştur (Sanger, 1988). Ülkemizde ise Doğu Akdeniz bölgesinde turunç anacı üzerinde yetiştirilen turunçgillerde symptom görülmemekle birlikte CEVd ile yoğun bulaşıklık saptanmış ve Turunçgil Cachexia Viroidi (CCaVd)'nin de mandarin çeşitlerinde ekonomik ölçüde zarar oluşturduğu bildirilmiştir (Güllü 1989; Önelge 1994).

Çınar ve ark (1993), Çukurova bölgesinde yaptıkları survey çalışmasında navel portakal ve mandarin ağaçlarının genelinde CEVd ile bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

Önelge (1994), tarafından Klemantin ve Satsuma mandarinleri üzerinde yürütülen turunçgillerde hastalık oluşturan viroidlerin biyolojik ve biyokimyasal tanısı konulu çalışmada sPAGE yöntemi ile CEVd ve CCaVd'e ilave olarak tüm turunçgil viroidlerinin varlığı da belirlenmiştir.

İsrail'de daha önce avokadoda ve asmada nükleotid dizilimleri belirlenen CVd-Ib ve CVd-IV'ün Doğu Akdeniz bölgesinde belirlenen portakal ağaçlarında sırasıyla 317 ve 285 nükleotidli olduğu belirlenmiş ve nükleotid dizilimleri analiz yapılarak ortaya konmuştur (Önelge, 1996).

Çukurova bölgesi turuncgil ağaçlarından elde edilen CEVd izolatu Etrog citron ve *Gynura* bitkilerine inokule edilmiş ve bu indikatör bitkilerde CEVd'nin 371 nükleotidli olduğu ve nükleotidlerin dizilimleri belirlenmiştir (Önelge, 1997).

Önelge (2007), turuncgil viroidlerini belirlemek amacıyla Çukurova'da yürüttüğü survey çalışmaları sonucu toplanan örneklerin CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III ve CVd-IV ile bulaşık olduğunu, testlenen tüm turuncgil çeşitlerinin genellikle CEVd, CVd-II ve CVd-III şeklinde bir viroid profili oluşturduğunu ve bu viroidlerin genellikle birlikte bulunup ortak enfeksiyon meydana getirdiğini tespit etmiştir.

Viroidler ribonükleik asitlerden (RNA) oluştukları ve antiserumları bulunmadığı için tanılanmalarında serolojik teknikler kullanılamamaktadır. Elektron mikroskobu denemelerinin viroidlerin rutin olarak tanısında başarılı olmadığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

Turuncgil viroidlerinin tanısında kullanılan yöntemler günümüzde 2 grup altında toplanmaktadır. Bunlardan birincisi biyolojik indeksleme yöntemi, diğeri ise moleküler yöntemle viroid bantlarının moleküler olarak tanısı ve moleküler hibridizasyon yöntemleridir (Riesner ve Gross, 1985; Semancik ve Roistacher, 1991).

Biyolojik indeksleme prosedürlerinin, duyarlı türlerde aşu inokulasyonu sonrası gelişen simptomları inceleme esasına dayandığı, duyarlı bir indeksleme prosedürü olduğu, halen aşu ile taşınan patojenlerin tanısı ve karakterizasyonunda zorunlu bir deneme olduğu bildirilmiştir (D'Onghia ve ark, 2007).

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

Citronların hızlı indikatör bitki olarak kullanımı ilk kez Salibe ve Moreira (1965) tarafından amaçlanmış ve kontrollü koşullar altında kuvvetli bir fidan gövdesi üzerinde citron gözlerinin gelişimine dayanan bu metod exocortis hastalığının tanısında hızlı ve duyarlı bir prosedür olarak geliştirilmiştir (Calavan ve ark,

1964;1968). Citron seçimi üzerinde uzun yıllar çalışılmış ve Etrog citronun 861-S1 klonunun diğerlerinden daha duyarlı bir indikatör olduğu ve CEVd'nin hafif ırklarının dahi bu klon üzerinde kolayca symptom geliştirdiği bildirilmiştir (Roistacher ve ark, 1977). Test başlangıçta CEVd'nin tanısı için tasarlanmışken sonraları bu indikatörün diğer viroidler için de kullanılabileceği saptanmıştır. Çizelge 2.3'te turunçgil viroidlerinin Arizona 861-S1 indikatöründe geliştirdikleri symptom durumları verilmiştir (Roistacher ve ark, 1977; Duran-Vila ve ark, 1988a,b).

CEVd için spesifik olarak kullanılan Etrog citron indikatör bitkisinin, son yıllarda belirlenenler de dahil tüm turunçgil viroidlerinin replikasyonuna izin verdiği ve bazı spesifik symptomlar oluşturduğu bildirilmiştir (Semancik ve Duran-Vila, 1991).

Çizelge 2.3. Turunçgil Viroidlerinin Etrog citron Bitkisi Üzerinde Geliştirdikleri Değişik Symptom Grupları (Duran-Vila ve ark, 1988, Semancik ve Duran-Vila, 1991)

Turunçgil Viroidleri	Symptom Grupları						
	Bodurluk	Yaprak Epinastisi	Orta Damar Nekrozu	Petiol Nekrozu	Yaprak Ucu Nekrozu	Bent Leaf (Yaprak Bükülmesi)	Dropping Leaf (Yaprak Düşüklüğü)
CEVd	şiddetli	şiddetli	orta	orta	-	-	-
CVd-I (CBLVd)	bazen	bazen	zayıf	-	-	zayıf	-
CVd-IIa (HSVd)	-	-	-	-	zayıf	-	-
CVd-IIb (CCaVd)	-	-	-	-	zayıf	-	-
CVd-III (CDVd)	bazen	orta şiddetli ya da bazen	genellikle zayıf	-	-	-	zayıf
CVd-IV (CBCVd)	zayıf	bazen	zayıf	-	-	-	zayıf

Hastalık indekslenmesi kaba limon veya Volkamer limon (*C. volcameriana* Ten ve Pasq.) gibi güçlü gelişen bir anaç üzerine 25 cm yükseklikten Etrog citron gözünün aşılınması, daha sonra aday ağaçtan alınan inokulumun Etrog gözünün alt kısmına 2 göz dokusu olarak aşılınması şeklindedir. Hastalık symptomlarının tek sürgün halinde gelişen Etrog citron bitkilerinin özellikle yapraklarında ve gövdesinde

gözlenebileceği belirtilmektedir (Wallace, 1978; Fraser ve Broadbent, 1979; Roistacher, 1991).

CEVd'nin Etrog citron üzerinde geliştirdiği en belirgin belirtiler; bitkinin gelişme geriliği göstererek bodur kalması, yapraklarda epinasti, yaprakların alt yüzeyinde damarların kahverengileşmesi ve nekroze olması şeklindedir. Yaprak petiolünün kıvrılması, kahverengileşmesi ve ileri safhalarda özellikle hastalığın şiddetli ırklarında gövde kabuğunun çatlamasının hastalığın belirgin belirtileri olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wallace, 1978; Roistacher, 1991).

Hastalık belirtilerinin gelişme süresinin dört ile on hafta arasında değişmekle birlikte, belirtilin gelişiminde hastalık ırkı, konukçu ve çevresel faktörlerin oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Zayıf ırklarda belirtilin gelişimi uzun sürede olmakta ve turuncgil viroidlerinin belirtili sıcak koşullarda, 32-40 °C max/gündüz ve 27-30 °C min/gece daha hızlı ve mükemmel gelişmektedir. Bitki içindeki viroid konsantrasyonunun da belirtilin gelişimine etkisi büyüktür. Konsantrasyonun az olduğu durumlarda belirgin belirtiler ortaya çıkmayabileceği veya bunların ortaya çıkış sürelerinin oldukça uzun olabileceği rapor edilmiştir (Semancik, 1987).

Cachexia hastalığının belirlenmesi için ilk bildirilen indikatör bitki Orlando tanelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) olmuştur (Calavan ve ark, 1961; Salibe ve Moreira, 1968). Ancak hastalık belirtilerinin inokulasyondan 2-8 yıl sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Roistacher ve ark, (1973), kaba limon üzerine aşılı Parson's Special mandarininin cachexia hastalığına karşı daha iyi bir indikatör olduğunu ve indekslemeden sonra 1 yıl içinde hastalık belirtilerinin ortaya çıkmaya başladığını bildirmişlerdir. Cachexia indikatörleri bu etmenin varlığında ağacın kalem kısmında zambak tabakası oluşumları geliştirmektedir.

Semancik ve Roistacher (1991), Etrog citron bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmalarda saf olarak Grup I (CVD-I) viroidlerinin bu bitkinin yapraklarında orta damar üzerinde nokta şeklinde nekroz oluşumuna ve yaprağın hafif bükülerek "leaf bent" olarak adlandırılan belirtilin gelişimine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Etrog citron Grup II (CVD-II) viroidleri için belirtisiz taşıyıcı olmakla birlikte CVD-IIa çok hafif yaprak ucu nekrozlarına neden olmakta, petiol kıvrılması

ve kahverengileşmesi simptomlarını da geliştirmektedir. CVd-II grubu içinde cachexia hastalığına neden olan CVd-IIb'nin Etrog citron üzerinde herhangi bir simptom geliştirmedeği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Semancik ve Roistacher, 1991).

Turunçgil viroidleri içinde III. ve IV. Grupta (CVd-III, CVd-IV) yer alan viroidlerin her zaman Etrog citron üzerinde düşük yaprak görüntüsü (drooping leaf) sergilediği ve bu oluşumun olgun yapraklarda da görüldüğü bildirilmiştir (Semancik ve Roistacher, 1991). CVd-III'ün ayrıca Etrog citron bitkilerinin petiol kısmında halka şekilli yapıların ve nekrozların oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir.

Turunçgil viroidleri çoğu zaman doğada saf olarak bulunmamakta ve karışık enfeksiyonlar sergilemektedirler. Semancik ve Duran-Vila (1991), turunçgil viroidlerinden farklı grupların Etrog citron indikatör bitkisi üzerinde karışık enfeksiyonlarının;

a- CEVd'in şiddetli yaprak buruşukluk simptomunu arttırabileceğini veya bu simptomu maskeleyebileceğini,

b- CEVd'in şiddetli yaprak buruşukluğu ve epinasti simptomlarında sinergistik etki geliştirebileceğini,

c- Yaprak simptomlarında şiddetli epinastiden hiçbir simptom gözlenmemesine kadar varabilen simptom değişikliğine neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Turunçgil viroidleri mekanik olarak bıçakla gövdeye yara açma şeklinde veya mekanik olarak saflaştırılmış viroid RNA'sını yapraklardan inokule etmek yoluyla otsu bitkilere taşınabilmektedir (Semancik,1987; Semancik ve Duran-Vila, 1991). *Gynura aurantiaca* D.C., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Chrysanthemum morifolium* Ramat, *Petunia hybrida* Hort. ex Vilm. *Solanum melongena* L. gibi otsu indikatörler turunçgil viroidleri ile yapılan çalışmalarda kullanılan otsu indikatör bitkilerdir (Duran-Vila ve ark, 1988).

Günümüzde viroidlerin en uygun tanılama işlemi viroid bandlarının elektroforetik olarak tanısının yapıldığı jel elektroforez yöntemi ve moleküler hibridizasyon yöntemleridir (Semancik, 1987; Szychowski ve ark, 1988; Flores ve ark,1985)

CEVd tanısında, birçok araştırmacı tarafından uzun yıllar PAGE çalışmasına paralel olarak nükleik asit hibridizasyon uygulamaları yapılmıştır (Flores, 1988; Albanese ve ark, 1988; Semancik, 1988; Gillings ve ark, 1988). Bu araştırmacılar hibridizasyon çalışmalarında prob işaretlemeye radyoaktif bir madde olan ³²P kullanmışlardır. Radyoaktif çalışmaların sağlık yönünden riskli olması ve özel laboratuvar ekipmanları gerektirmesi kullanımı sınırlamıştır. Bu nedenle bu yöntem birçok laboratuvarda uygulanamamaktadır.

Bitki viroidlerinin teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction=PCR) yönteminin kullanılabileceği ilk kez 1990'da rapor edilmiştir (Hadidi ve Yang, 1990). Ayrıca bitki viroidlerinin PCR ile tanımlanmasında PCR amplifikasyonundan önce başlangıçta bir reverse transkripsiyon (RT) adımının uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Tüm viroid genomlarının PCR'la amplifikasyonu monokotiledon ve dikotiledon bitki varyetelerinden ve odunsu veya odunlaşmış materyalleri içeren örneklerden başarıyla yapılabilmektedir (Hadidi ve ark, 1992; Wah ve Symons, 1997).

Flores (1988), viroidler tarafından oluşturulan hastalıkların tanısında 2 alternatif biyokimyasal metodun kullanılabileceğini ve bu metodların da spesifik dairesel (circular) yapıya ve viroidlerin nükleik asit sıralarına dayanan double poliakrilamid jel elektroforez ve dot-blot hibridizasyon olduğunu bildirmiştir.

Wan Shuyuan ve ark (1996), *in vitro* callus kültürü tekniği ile CEVd'i kısa sürede tanımlamışlardır. Bu yöntemde Etrog citron callusları şiddetli ve zayıf CEVd izolatları ile bulaştırılmış ve şiddetli izolatların kullanıldığı kallusların 10 günde, zayıf izolatların kullanıldığı kallusların ise 15 günde kahverengileştiği gözlenmiştir.

Palacio ve ark (2000), infekteli bitki dokularından viroidlerin tanısında bir "imprint hibridizasyon" metodu tasarlamışlardır ve inokule edilen citronların imprint hibridizasyon yolu ile tanısının turuncgil viroidlerinin rutin indekslemeleri için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Moleküler hibridizasyon ve PCR tekniklerinin iyi tanımlanmış viroidlerin rutin tespitinde PAGE'nin yerini önemli ölçüde aldığı bildirilse de, elektroforez yönteminin bilinmeyen viroid-benzeri moleküler yapıların belirlenmesinde önemli olduğu kanıtlanmıştır. Viroidlerin tanısında kullanılan bütün moleküler yöntemler

arasında yalnızca PAGE yöntemi hiçbir nükleotid dizilim bilgisi gerektirmemektedir. Hedef bilindiğinde, moleküler hibridizasyon ve RT-PCR analizi gibi nükleotid dizi bilgisine dayalı tekniklerin avantajlı olabileceği, ancak çok yönlü ve kullanımı kolay PAGE analiz yönteminin viroid araştırmalarında kullanılan öncelikli bir teknik olmayı sürdürdüğü rapor edilmiştir (Hanold ve ark, 2003).

Elektroforez yönteminden önce viroidlerin saflaştırılması gerekmektedir. Viroidlerin saflaştırma işlemleri genellikle iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birincisi düşük moleküler ağırlıktaki RNA ekstraktının hazırlanması, ikincisi ise bu ekstraktan viroid RNA'sının saflaştırılmasıdır (Riesner ve Gross, 1985).

Duran-Vila ve ark (1986), nükleik asit ekstraksiyonunun 4-5 gram kadar Etrog citron yaprağının fenol ile ekstrakte edilip, LiCl ile çöktürülmesi yapılarak nükleik asit örneklerine CF-11 selüloz ile kromatografi yöntemi uygulayıp, kolonların sırasıyla %35 ve %25 etanol içeren STE tampon çözelti ile yıkanıp daha sonra direkt tampon çözelti ile yıkanarak elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Lopez-Herrera ve ark (1987) ise farklı bir yöntemle 5 g kadar oldukça az miktardaki genç yaprak örneklerinin suya doymuş fenol içeren ekstraksiyon ortamı ile ezilmesi ve santrifüjlenmesinden sonra nükleik asit örneklerinin CF-11 selüloz ile kromatografiden geçirilip kolonların %35 etanol içeren STE tampon çözeltisi ile yıkanabileceğini ve etanol çöktürmesi ile nükleik asitlerin elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Elde edilen nükleik asitler içinden bitkilerde hastalık oluşturan viroidlerin saf olarak ayrılması ve tanımlanması poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemi ile ikinci bir basamakta gerçekleştirilmektedir. Elektroforez tekniği ile RNA'ların başarılı bir şekilde ayrımı 1960 yıllarının ortalarında başarılmış ve günümüzde rutin olarak kullanılmaktadır (Gierson, 1982).

Elektroforez terimi genellikle elektrik yüklü bir alan etkisi altında belirli bir solüsyon içinde küçük iyonların ve yüklü makromoleküllerin hareket ettirilmesini ifade etmektedir. Bu prensipten yararlanılarak RNA'ların belirli bir büyüklükte ayrımı uygun delik büyüklüğüne sahip jelde başarılmaktadır. Elektroforez işleminin belirli

boydaki plaka jeller içinde gerçekleştirilebileceği, agar ve poliakrilamid olmak üzere farklı jel materyalleri kullanılabileceği bildirilmiştir (Giersen, 1982).

Poliakrilamid jellerin akrilamid ve N',N'-methylen bisakrilamide karışımı ile hazırlanabileceği, polimerizasyonun ise %0.05 Tetramethylenediamine (TEMED) kullanılarak sağlanacağı bildirilmiştir (Schumacher ve ark, 1983; Semancik, 1987).

Schumacher ve ark (1983), da kısmi olarak saflaştırılan RNA'ların iki yönlü jel elektroforez yöntemi ile birbirlerinden ayırt edilebileceğini ve bu yöntemle tek bir jelde çok sayıda örneğin aynı anda analiz edilebileceğini belirtmişlerdir.

Turunçgil viroidlerinin belirlenmesinde %5'lik poliakrilamid jel kullanılması gerektiği 8 M üre ile denatüre işleminin yapılarak dairesel ve doğrusal viroid formlarının elde edilebileceği bildirilmiştir (Semancik, 1987).

Semancik (1986), daha önce tanımladığı yöntemi modifiye ederek %5'lik poliakrilamid jel'i pH 6.5 TAE tampon çözeltisi içinde hazırlanmış ve TBE yürütme çözeltisi içinde (pH 8.3) viroidlerin yavaş hareket eden dairesel formlarını ayırt etmiştir.

İki yönlü jel elektroforez tekniğinde, nükleik asit örneklerinin ilk jelde doğal olarak yürütüldüğü, ikinci jelde ise ürenin denatüre edici (dPAGE) olarak kullanıldığı ve böylece doğrusal ve halka yapılı RNA molekülerinin ayrımının yapılabileceği bildirilmiştir (Semancik, 1987). PAGE tekniğinde viroidlerin göç hızından yaklaşık iki kat daha fazla hıza sahip olan bromofenol mavisi ve viroidlerle aynı hıza sahip xylene-cyanol'un belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Giersen, 1982).

İlk jelden çıkarılan viroid hattının ikinci jel üzerine veya jelin alt kısmına yerleştirilerek denatüre edici jel ile (dPAGE) teması sağlanıp ikinci bir yürütme işlemi uygulanarak viroidlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrımının yapılabileceği bildirilmiştir (Semancik ve ark, 1988b).

Ethidium bromid ile poliakrilamid jel'in içinde boyanması (0,5 µg/ml 10 dakika) gerekli olan nükleik asit hattının görülmesi ve ikinci jele yerleştirilmesi sağlanırken, aynı zamanda viroidlerin biyolojik olarak aktif bir durumda elde edilmesinin de sağlandığı bildirilmiştir (Igloi, 1983).

Elektroforez işlemi ile ayrımı yapılan nükleik asitler, poliakrilamid jelin ethidium bromid ile (0,5 µg/ml 10 dakika) boyanarak nükleik asitlerin gözle görünür

hale gelmesini sağladığı ve tanınmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Valverde ve ark, 1986).

Ancak viroidlerin tanınmasında daha duyarlı bir boyama olan gümüş nitrat (AgNO_3) boyama yöntemi Igloi (1983) tarafından tanınmıştır. Günümüzde birçok araştırmacı bu yöntemin ethidium-bromid yöntemine göre çok daha duyarlı olduğunu belirtmiş, fakat bu yöntem ile boyamanın viroidleri inaktif duruma getirdiğini de belirtmişlerdir (Semancik, 1987; Duran-Vila ve ark, 1988).

PAGE yöntemi ile infekteli bitki dokularından kısmi olarak nükleik asitlerin ekstrakte edilmesi ve jel elektroforezde viroidlerin doğrusal ve dairesel formlarının ayırt edilmesinin 8 saat gibi kısa bir sürede tamamlanabileceği rapor edilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

3. MATERYAL ve METOD**3.1. Materyal**

Adana ili Kozan ilçesinde gövdelerinde ur benzeri gelişim gösteren organik turunçgil bahçesinden iki Valensiya portakal ağacı (*Citrus sinensis* (L.)), Ç. Ü. Tarımsal Yapılar ve Sulama bölüm arazisinden iki Valensiya portakal ağacı ve bir ev bahçesinden bir Kara kara (*C. sinensis* (L.)) portakal ağacı olmak üzere beş farklı turunçgil ağacı belirlenmiş ve bu ağaçlardan alınan aşıgözleri çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur.

3.1.1. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Biyolojik indeksleme çalışmalarında viroidlerin tanısı için en duyarlı indikatör olan turunç (*C. aurantium* L.) anacına aşılı Etrog citron (*C. medica* L.) cv. 861-S-1 seleksiyonu indikatör bitki olarak kullanılmıştır.

Çalışma materyali olarak belirlenen ağaçlarda Turunçgil Tristeza Virüsü'nün (CTV) varlığını araştırmak amacı ile Meksika laymı (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) ve Turunçgil Psorosis Virüsü'nü (CPsV) araştırmak amacı ile de Madam Vinous portakalı (*C. sinensis* (L.)) kullanılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca pozitif (+) kontrol olarak tüm turunçgil viroidlerini içeren N5 izolatu ve herhangi bir uygulama yapılmayan negatif kontrol (-) kullanılmıştır.

3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Belirlenen turunçgil ağaçlarını viroidler açısından moleküler bir tanı yöntemi olan ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) ile teşhiste, viroid replikasyonunun hızlı geliştiği Etrog citron 861-S-1 indikatör bitkilerinin genç yaprakları kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Belirlenen Ağaçlardan Materyal Alımı**

Turunç anacına aşılı portakal ağaçlarının kalem kısmında ur benzeri yatay çıkıntılar şeklinde makroskopik simptom gösteren ağaçlardan aşı kalemleri şeklinde ağacın dört yönünden örnekler alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Aşı kalemlerinin yaprakları temizlenmiş ve aşı kalemleri indeksleme çalışmalarında kullanılmak üzere + 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. İndikatör Bitkilerin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi

Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanmak üzere tüm turunçgil viroidlerinin ortak replikatörü olan Etrog citron 861-S-1 bitkilerinin aşığözleri, kalem kalınlığına erişmiş turunç anacının yaklaşık 20 cm yukarısına ilkbaharda aşılanmış ve üzeri plastik aşı bantları ile sarılmıştır. Yaklaşık 3 hafta boyunca sarılı kalan aşı bantları daha sonra çözülerek aşılarda sürmesi için turunç bitkileri aşı noktasının yaklaşık 10 cm üzerinden kesilmiştir. Meksika laymı, Madam Vinous ve turunç indikatör bitkileri ise tohumdan yetiştirilerek elde edilmiştir.

3.2.3. Biyolojik İndeksleme Yöntemi

Turunçgil viroidlerinin araştırıldığı biyolojik indeksleme çalışmalarında turunç anacına aşılı Etrog citron bitkileri indikatör bitki olarak kullanılmıştır. Çalışma materyali olarak belirlenen ağaçların kurşun kalem kalınlığındaki sürgünlerinden alınan 2 göz dokusu inokulum olarak Etrog citron gözünün alt ve üst kısmına gelecek şekilde aşılanmış ve inokulasyonlarda incelenen her ağaç için üç adet Etrog citron bitkisi kullanılmıştır.

Çalışmaya ayrıca tüm turunçgil viroidlerini içeren pozitif (+) kontrol bitkiler ve hiçbir aşılama yapılmamış negatif (-) kontrol bitkiler de alınmıştır.

Tespit edilen ağaçlarda Turunçgil Kavlama Hastalığı (CPsV) yönünden bulaşıklık mevcut olup olmadığını belirlemek için Madam Vinous portakalı, Turunçgil Göçüren Hastalığı (CTV) için ise Meksika laymı bitkileri indikatör olarak

kullanılmıştır ve her indikatör bitkiye seçilen ağaçlardan alınmış 2 göz dokusu inokulum olarak verilmiştir. Ayrıca her hastalık için üç adet pozitif ve negatif kontrol bitki kullanılmıştır.

Aşılama işlemleri sırasında her farklı materyalin inokulum olarak verilmesinde aşı bıçağı %2'lik Sodyum hipoklorid çözeltisine batırılarak temizlenmiştir.

İnokule edilen bitkiler sıcak 20/35 ° C 'deki sera bölmesinde gelişmeye bırakılmış, aşı bantları yaklaşık üç hafta sonra çözülerek dokuların canlılığı kontrol edilmiştir ve tutmayan aşılar belirlenerek aday ağaçlardan tekrar örnek alınarak aşılanmıştır. İnokulasyon sonrası 4-16 hafta boyunca hastalık belirtileri gözlemlenmiş, CPsV'nün karakteristik belirtileri olan turuncgil ağaçlarının ve indikatör bitkilerin genç yapraklarında damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni ve genç sürgünlerde şok belirtisi aranmıştır. CTV için ise Meksika laymında damarlarda renk açılması (vein clearing) ve yapraklarda kaşıklanma, turuncda yaprak sarılığı (seedling yellow) belirtileri araştırılmıştır. Turuncgil viroidlerinin biyolojik indekslemesinde ise Çizelge 2.3'te belirtilen viroidlere ait belirtiler baz alınarak bu belirtilerin indikatör bitkilerde var olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.4. Moleküler Çalışmalarla İlgili Yöntemler

Belirlenen ağaçları turuncgil viroidleri yönünden incelemede moleküler tanı yöntemlerinden ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) kullanılmıştır. sPAGE yöntemi ile tanılama işlemi iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada viroidler bitki yaprak dokularından ekstrakte edilmiş ve arıtılmış (Szychowski ve ark, 1988), ikinci aşamada ise nükleik asitler sPAGE yöntemi ile analiz edilmiştir (Semancik ve ark, 1987).

3.2.4.1. İndikatör Bitkilerden Nükleik Asit Ekstraksiyonu ve Purifikasyon Yöntemi

Çalışma materyali olarak seçilen ağaçları turuncgil viroidleri açısından sPAGE yöntemi ile tanılama çalışmalarında bu ağaçların inokulum olarak verildiği Etrog citron 861-S-1 bitkilerinin genç yaprak dokuları kullanılmıştır. İndikatör

bitkilerden yapılan purifikasyon (Semancik ve ark, 1988b) aşağıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

1. İnokulasyon yapılmış indikatör bitkilerin taze yapraklarından beşer gram tartılmış ve ince bir şekilde doğranmıştır. Üzerine 6 ml EM-1 tampon çözeltisi (0,4 M Tris-HCl pH 8.9, %1 SDS, 5 mM EDTA pH 7.0, %4 Merkaptotanol) ve 18 ml suyla doyurulmuş fenol eklenmiş ve örnek el blenderi kullanılarak ezilmiş ve solüsyon santrifüj tüplerine boşaltılmıştır.

2. Tüpler 10.000 d/dak.'da 30 dakika +4 ° C'de santrifüj edilmiştir.

3. Santrifüjden sonra üst sıvı faz steril bir pipetle alınmış ve üzerine 0.6 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.5) ve 3 hacim %95'lik soğuk etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır.

4. Tüpler 10.000 d/dak.'da 30 dakika +4 ° C'de santrifüj edilmiştir. Katı faz alınarak tüpler kurutulmuştur.

5. Pellet 1 ml TKM tampon çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Solüsyon dializ tüplerine aktarılmış ve TKM tampon çözeltisi içeren erlende tüm gece bir karıştırıcı üzerinde dializ edilmiştir.

6. Dializ tüplerindeki solüsyon santrifüj tüplerine aktarılmış üzerine 1 hacim 4 M LiCl eklenmiş ve tüpler +4 ° C'de en az 4 saat bekletilmiştir.

7. Tüpler 10.000 d/dak.'da 30 dakika +4 ° C'de santrifüj edilmiş, sıvı faz alınarak üzerine 3 hacim %95'lik etanol eklenmiş ve tüpler -20 ° C'de en az yarım saat bekletilmiştir.

8. Tüpler 10.000 d/dak.'da 30 dakika +4 ° C'de santrifüjlendikten sonra pellet kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur.

9. Tüplerdeki pellet 1 ml TKM tampon çözeltisi ile çözündürülmüş ve %35'lik Etanol-STE ile dengelenmiştir.

10. Kromatografi için 10 ml'lik enjektörlerin taban kısmı steril kurutma kağıdı ile kapatılmış ve üzerine CF-11 selüloz ve %35'lik Etanol-STE karışımı eklenerek solüsyonun süzülmesi beklenmiştir. Kolon tamamen süzülünce örnek solüsyonu eklenmiş ve sıvının tamamen geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra kolon üzerine 40 ml %30'luk Etanol içeren STE çözeltisi ilave edilmiş ve sıvının süzülmesi beklenmiştir.

11. Kolona 0,8 ml 1XSTE çözeltisi eklenmiş ve tamamen akması sağlanmıştır. Ardından kolona 6 ml 1XSTE eklenmiş ve bu kez çözelti 50 ml'lik tüpler içinde toplanmıştır. Toplanan sıvı üzerine 0,6 µl 3 M sodyum asetat ve 2,5 kat %95'lik soğuk etanol ilave edilmiştir.

12. Tüpler 10.000 d/dak.'da 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş ve sıvı faz dökülerek tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek kurutulmuştur. Tüplerdeki pellet 300 µl TKM tampon çözeltisi ile çözündürülmüş ve elektroforez işleminde kullanılıncaya kadar -20 °C'de tutulmuşlardır.

3.2.4.2. Nükleik Asitlerin Ardışık Poliakrilamid Jel Elektroforez (sPAGE) Yöntemi ile Analiz Edilmesi

İndikatör bitkilerden purifiye edilen viroidler bu çalışmada sPAGE yöntemi ile analiz edilmiş, ethidium bromide (EtBr) ve gümüş nitrat (AgNO₃) ile boyanmışlardır (Schumacher ve ark, 1983). Bu yöntemde kullanılan tampon çözeltiler Ek-2'de verilmiştir.

Saflaştırılan viroid RNA'ları önce %5'lik doğal akrilamid (30:0,75 akrilamid:bisakrilamid) ile sequential poliakrilamid jel elektroforez yöntemi uygulanarak bitki RNA'larından ayrılmıştır. Elektroforez uygulamasında %5'lik poliakrilamid içinde viroid RNA'ları ile aynı hızda hareket eden xylene-cyanol ve viroid RNA'larından iki kat fazla ilerleme hızına sahip bromofenol mavisi işaretleyici olarak kullanılmıştır. TAE tampon çözeltisi ile hazırlanan %5'lik poliakrilamid jel içine polimerizasyon sağlaması amacı ile 500 µl ammonium persülfat (%10) ve katalizör olarak 50 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine) ilave edilmiştir. Karışım (pH 7) 16 cm x 16 cm x 1.5 mm ebadındaki cam plaka içine dökülmüş ve örnekleri jele yerleştirmek amacı ile üst tarafına tarak yerleştirilmiştir. Jel buzdolabında yaklaşık 1-2 saat bekletilerek polimerize edilmiştir. Jele purifiye edilmiş örnekler ve işaretleyici koyulduktan sonra TAEX1 tampon çözeltisi (pH 7.2) içinde 60-70 mA'de bromofenol mavisi cam tabakanın alt kısmına erişinceye kadar yürütülmüştür. Jel ethidium bromide (0.225 mg EtBr/300 ml destile su) solüsyonu ile boyanarak viroid RNA'larının bulunduğu hat yaklaşık 3 cm kalınlıkta kesilmiş ve ikinci jelin üst kısmına yerleştirilmiştir (Semancik ve Harper, 1984).

İlk jelde viroid RNA'ları bitki nükleik asitlerinden ayrılmaktadır. İkinci jelde ise turuncgil viroidleri birbirinden ve bunun yanında viroidlerin halkasal yapıları doğrusal yapılarından ve bitkiye ait RNA'lardan ayrılmıştır.

Denature poliakrilamid jel (dPAGE) işleminde %5'lik akrilamid jel cam tabakanın içine dökülerek polimerize olması sağlanmış ve ilk jelden kesilen parça bu jelin üst kısmına yerleştirilmiş ve bu jel TBEX1 (denaturing buffer) tampon çözeltisi (pH 8.3) içinde 20-25 mA'lık sabit akımda xylene-cyanol jel içinde cam tabakanın en alt kısmına erişinceye kadar yürütülmüştür. Elektroforez işleminin bitmesinden sonra viroid RNA bantlarını gözle görünür hale getirebilmek amacı ile akrilamid jel gümüş nitrat ile boyanmıştır.

3.2.4.3. Elde Edilen Viroid RNA'larının Gümüş Nitrat (AgNO_3) Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi

Turuncgillerde bulunan viroidlerin biyokimyasal bir tanı yöntemi olan sPAGE ile belirlenmesindeki son aşama ikinci jelin yürütme işleminin bitiminde akrilamid jelin AgNO_3 ile boyanmasıdır. Çalışmada jelin AgNO_3 ile boyanması Igloi (1983)'nin uyguladığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

- | | |
|--|-----------|
| 1. %50 Etanol + %10 Asetik asit | 60 dakika |
| 2. %10 Etanol + %1 Asetik asit | 60 dakika |
| 3. 12 mM (AgNO_3) | 60 dakika |
| 4. Saf su | 10 dakika |
| 5. 0.75 M Potasyum hidroksit (KOH) ⁺ | |
| %0.28 Formaldehit (HCHO) | 20 dakika |
| 6. 0.07 M Sodyum karbonat ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) | 10 dakika |

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**4.1. Arazi Gözlemleri**

Bahçe gözlemleri sonucu seçilen ve ur benzeri yapı gösteren turunç anacına aşılı portakal (*Citrus sinensis* (L.)) ağaçlarında urlar ağacın kalem kısmında gözlenmiştir. Ağaçların turunç anacı kısmında ise herhangi bir ur veya ur benzeri yapı gözlenmemiştir. Portakal ağaçlarının kalem kısmındaki ur benzeri yapılar primer dallara kadar ilerlemekte olup Adana (1) ve Adana (2)'de üzeri hafif pürüzlü yapıda ve sayıca fazla 8-10 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Seçilen diğer ağaçlarda (Kozan (3), Kozan (4), Adana (5)) ise dormant göz şeklinde hafif kabarık olup tümsek şeklinde üzeri pürüzlü yapılar mevcuttur. Dormant göz şeklindeki çıkıntılar ise ur benzeri yapılardaki gibi fazla şişkin olmayıp ince yatay çizgiler şeklinde ve sayıları ur benzeri yapılar gibi oldukça fazladır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Ur benzeri yapıya sahip Adana (2) (Valensiya) ağacının genel görünüşü



Şekil 4.2. Gövdesinde ince yatay çizgi şeklinde kabarıklıklar gelişmiş Kozan(3) (Valensiya) ağacı

Seçilen portakal ağaçlarında turunçgil viroidlerinin varlığını belirlemek ve bu portakal ağaçlarındaki viroid profilini ortaya koymak amacı ile yürütülen bu çalışmada, materyal olarak belirlenen ağaçlarda turunçgil viroidleri dışında turunçgillerin gövdesinde simptom meydana getiren Turunçgil Kavlama Hastalığının (CPsV) ve Turunçgil Göçüren Hastalığının (CTV) varlığı da araştırılmıştır.

Materyal olarak belirlenen portakal ağaçlarında ilkbahar sürgünlerinin genç yapraklarında CPsV'nün belirtileri olan meşe yaprağı deseni ve damar bantlaşması belirtileri gözlenmemiştir. Ayrıca yine CPsV'nün varlığında meydana gelen gövde

ve kalın dallarda kabukta pul pul veya tabaka Ŗeklinde kavlamalar ve meyvelerde meyve kabuğunda halkalı lekeler veya kahverengi lekeler Ŗeklindeki simptomların hiçbirini gözlenmemiŖtir. Seçilen ağaçlarda Turunçgil Tristeza virüsünün turunç anacı üzerindeki ağaçlarda ekonomik olarak önemli iki ırkı olan stem pitting (gövde çukurlaŖması) ve quick decline (hızlı geriye ölüm) ırklarına ait simptomlara rastlanmamıŖtır. Ağaçların hiçbirinde uzunlamasına oluŖan deęiŖik Ŗekil, çap, derinlik ve uzunluktaki kanalımsı çukurluklar (stem pitting) ve gelişim geriliği, sürgünlerde geriye ölüm gözlenmemiŖtir. Ancak bu ağaçlarda CTV'nün aŖı birleŖme yerinde bazen meydana getirdiği diz oluŖumu Ŗeklindeki ŖiŖkinlik benzeri simptom gözlenmiŖtir. Bu ağaçların aŖı birleŖme noktasından kabuk kaldırılmıŖ ve odun dokusunda bu virüse ait ters iğne ucu benzeri çıkıntılar ve buna karŖı gelecek Ŗekilde kabukta bal peteği Ŗeklinde çöküntülere rastlanmamıŖtır.

4.2. Biyolojik İndeksleme ÇalıŖmaları ile İlgili Bulgular

4.2.1. Kavlama Hastalığının İndekslemesine Ait Bulgular

ÇalıŖma materyali olarak belirlenen portakal ağaçlarında CPsV'nün varlığı indikatör bitki olarak kullanılan Madam Vinous portakalı (*Citrus sinensis* (L.)) üzerinde gelişen sürgün ve genç yaprak simptomları dikkate alınarak deęerlendirilmiŖtir. Seçilen portakal ağaçlarından alınan inokulumun verildiği Madam Vinous bitkileri, negatif kontrol ve pozitif kontrol bitkiler üç kez geriye doğru budanarak genç yaprak geliŖtirmeleri sağlanmış ve ayrıca ilkbahar ve sonbahar döneminde yaprak simptomlarını gözlemek amacı ile de düzenli olarak kontrol edilmiŖtir. Bunun sonucunda yalnızca pozitif kontrol bitkilerde CPsV'ne ait damar bantlaŖması, meŖe yaprağı deseni ve genç sürgünlerde Ŗok simptomları geliŖmiŖtir. Seçilen ağaçlardan alınan inokulumun verildiği bitkilerin ve hiçbir inokulumun verilmediği negatif kontrol bitkilerin genç yapraklarında ve sürgünlerinde ise hiçbir simptom gözlenmemiŖtir. Bu bitkilerde herhangi bir simptomun gelişmemiŖ olması çalıŖmada materyal olarak kullanılan ağaçların CPsV ile bulaŖık olmadığını ortaya koymaktadır.

4.2.2. Göçüren Hastalığının İndekslemesine Ait Bulgular

Bilinen tüm turunçgil virüs ve virüs benzeri hastalıklar içinde en tehlikeli ve yıkıcı olanı Turunçgil Tristeza Virüsü'dür (CTV) (Bar-Joseph ve ark., 1989). Hastalık turunç üzerine aşılı limon hariç tüm çeşitlerde yıkıcı olabilmektedir. Ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinde anaç olarak genellikle turunç anacı kullanılması nedeni ile potansiyel tehlike konumunda olan turunçgil göçüren hastalığının materyal olarak seçilen ağaçlarda varlığını araştırmak amacı ile biyolojik indeksleme yapılmıştır. Turunç (*C. aurantium* L.) ve Meksika laymı (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) bitkilerinin indikatör olarak kullanıldığı tristeza indekslemesinde CTV için tanımlayıcı olabilecek yaprak sarılığı (seedling yellow), damarlarda renk açılması (vein clearing) ve yapraklarda kaşıklanma simptomlarını gözlemek amacı ile düzenli olarak kontrol edilmiş ancak kullanılan indikatör bitkilerde bu hastalık simptomlarına rastlanmamıştır. Materyal olarak seçilen ağaçların arazi gözlemlerinde ve indikatör bitkilerde CTV ile ilgili olabilecek herhangi bir makroskobik simptome rastlanmamış olması ve arazideki ağaçların sağlıklı görünümeleri göz önüne alındığında çalışmada materyal olarak kullanılan ağaçların tümünün göçüren hastalığı ile bulaşık olmadığını ortaya koymaktadır.

4.2.3. Turunçgil Viroidlerinin İndekslenmesine İlişkin Bulgular

Çalışmada ur benzeri yapılar içeren portakal ağaçlarında var olan viroidler Etrog citron (*C. medica* L.) indikatör bitkisi kullanılarak araştırılmaya çalışılmıştır. Etrog citron indikatör bitkisi tüm turunçgil viroidlerinin genel replikatör bitkisi olup viroidlere spesifik simptomlar geliştirmekte ve viroidlerin tanılanmasında kullanılmaktadır. Etrog citron üzerinde gözlenen simptomlar çalışmada yedi farklı grup altında değerlendirilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3'te görüldüğü gibi Turunçgil Exocortis Viroidi (CEVd) Etrog citron üzerinde şiddetli bodurluk ve yaprak epinastisi simptomları geliştirmektedir. Bununla birlikte indikatör bitkilerde orta damar nekrozuna ve petiol nekrozuna neden olabilmektedir. Citrus Bent Leaf Viroid (CBLVd) CVd-Ia, CVd-Ib ve CVd-Ic olarak adlandırılmaktadır. Zayıf orta damar nekrozu, tek noktadan gelişen şiddetli yaprak

bükülmesi simptomsu yanında bazen bodurluk ve yaprak epinastisi simptomsu da oluşturabilmektedir. Hop Stunt Viroidinin (HSVd) ise CVd-IIa, CVd-IIb ve CVd-IIc olmak üzere üç varyantı bulunmaktadır ve bunlardan CVd-IIa Etrog citronda yalnızca hafif yaprak ucu kahverengileşmesi oluşturmaktadır. Turunçgil Gözenekleşme Hastalığının (CCaVd) etmeni olan CVd-IIb ise Etrog citron üzerinde herhangi bir simptom göstermemekle birlikte diğer II. Grup viroidler gibi yaprak ucu kahverengileşmesi meydana getirebilmektedir. CVd-IIc varyantı da CVd-IIb varyantı gibi Orlando tangelo üzerinde ve üç yapraklı anacına aşılı Klemantin ağacının kalem kısmında cachexia simptomslarına neden olmaktadır. Turunçgil III. Grup Viroidleri (CVd-III) Citrus Dwarfing Viroid (CDVd) olarak da adlandırılmaktadır ve CVd-IIIA, CVd-IIIB, CVd-IIIC ve CVd-IIID olmak üzere dört tanedir. Zayıf orta damar nekrozu, yaprak düşüklüğü ile bazen bodurlaşma ve yaprak epinastisi simptomsu oluşturabilmektedir. Turunçgil IV. Grup Viroid ise günümüzde Citrus Bark Cracking Viroid (CBCVd) olarak adlandırılmakta olup zayıf bodurluk, orta damar nekrozu ve yaprak düşüklüğü ile bazen yaprak epinastisi simptomslarına neden olabilmektedir. Çizelgede bulunmayan ve 2008 yılında karakterizasyonu yapılan bilinen son turunçgil viroidi olan CVd-V ise Etrog citronda çok az bodurluk, gövdede çok zayıf nekrotik lezyonlar, çatlama ve hafif zamklanma şeklinde simptomslar göstermektedir (Serra ve ark., 2008).

Ur benzeri yapıların var olduğu turunçgil ağaçlarındaki viroidlerin biyolojik indeksleme yöntemi ile araştırıldığı bu çalışmada Etrog citron bitkisi üzerinde gözlenen simptomslar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi araziden seçilen Kozan (4) ve tüm turunçgil viroidlerinin inokulum olarak verildiği pozitif (+) kontrol Etrog citron indikatör bitkisinde şiddetli bodurluk meydana getirmiştir. Kozan (3) orta şiddette bodurluk meydana getirmiş olup seçilen diğer ağaçlar (Adana (1), Adana (2), Adana (5)) ve negatif kontrol Etrog citronda herhangi bir bodurluğa neden olmamıştır. Ayrıca negatif kontrolde herhangi bir gelişme geriliği de gözlenmemiştir.

Orta damarların kahverengileşmesi şeklinde gelişen orta damar nekrozu simptomsu yalnızca orta damar ile sınırlı kalmış olup Adana (2), Adana (5) ve pozitif kontrol da Etrog citron üzerinde bu simptomsu meydana getirmiştir. Negatif kontrol

ve seçilen diğer ağaçlar Etrog citron üzerinde orta damar nekrozu simptomunu sergilememiştir.

Çizelge 4.1. İncelenen Portakal Ağaçları ve Kontrollerin Etrog citron İndikatör Bitkisinde Geliştirdikleri Viroid Simptomları

Seçilen Ağaçlar	Bodurluk	Orta Damar Nekrozu	Yaprak Epinastisi	Petiol Nekrozu	Yaprak Ucu Kahverengileş-mesi	Bent Leaf (Yaprak Bükülmesi)	Dropping Leaf (Yaprak Düşüklüğü)	Bulunması Olası Viroidler
Adana (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adana (2)	-	+	+	-	-	-	-	CEVd,
		(orta şiddetli)						
Kozan (3)	+	-	+	-	+	-	-	CEVd, CVd-II, CVd-III, CVd-IV
	(orta şiddetli)		(şiddetli)					
Kozan (4)	+	-	+	-	+	-	+	CEVd, CVd-II, CVd-III, CVd-IV
	(şiddetli)		(şiddetli)					
Adana (5)	-	+	+	-	-	-	-	CEVd,
		(orta şiddetli)						
Kontrol (+)	+	+	+	-	+	-	-	CEVd, CVd-II, CVd-III, CVd-IV
	(şiddetli)		(şiddetli)					
Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-	-	-

Etrog citron yapraklarının içe doğru bükülüp kıvrılması şeklinde gelişen yaprak epinasti simptomunu Etrog citron biyolojik indekslemesine alınan ağaçlardan Adana (2), Kozan (3), Kozan (4), Adana (5) ağaçları ve pozitif kontrol bitkiler şiddetli biçimde geliştirmiş (Şekil 4.3 ve 4.4), diğer ağaçlar ise indikatör bitkide epinasti simptomu göstermemiştir. Negatif kontrolde de bu simptoma rastlanmamıştır.

**A****B**

Şekil 4.3. Etrog citron bitkisinde gelişen orta şiddetli yaprak epinastisi simptomu
A. Kozan (3), B. Kozan (4).

**A****B**

Şekil 4.4. Etrog citron bitkisinde gelişen şiddetli yaprak epinastisi simptomu
A. Kozan (4), B. Pozitif Kontrol

Turunçgil viroidleri arasından CVD-IIa tarafından geliştirilip bu viroidi diğer turunçgil viroidlerinden ayıran spesifik bir simptom olan yaprak ucu kahverengileşmesi simptomunu indekslemeye alınan Kozan (3), Kozan (4) ağaçları ve pozitif kontrol meydana getirmiştir (Şekil 4.5). Negatif kontrol ve indekslemeye alınan diğer ağaçlar bu simptomu oluşturmamıştır.

**A****B**

Şekil 4.5. A- Kozan (4) Valensiya ağacının Etrog citronda geliştirdiği epinasti ve yaprak ucu kahverengileşmesi simptomu B- Kozan (3) Valensiya ağacının Etrog citronda geliştirdiği yaprak ucu kahverengileşmesi

Yaprak düşüklüğü olarak adlandırılan yaprak petiolünün bir noktadan nekroze olması ve bitki yaprağının aşağıya doğru sarkması şeklinde gelişen simptomu ise yalnızca Kozan (4) ağacı sergilemiştir (Şekil 4.6).



şekil 4.6. Etrog citron üzerinde Kozan (4) (Valensiya) ağacının geliştirdiğı yaprak düşüklüğü simptomsu

CBLVd'e özğü bir simptomsu olan ve yaprak orta damarının tek bir noktadan bükölmesini ifade eden yaprak bükölmesi simptomsunu ise indekslemeye alınan hiçbir ağaç sergilememiştir.



şekil 4.7. Etrog citron yaprak damarı ve gövdesinde genel nekroz simptomsu (Kozan (4))

Seçilen ağaçların Etrog citronda meydana getirdikleri belirtiler Çizelge 2.3'te verilen genel turunçgil viroidlerinin oluşturduğu belirtiler baz alınarak incelendiğinde, yalnızca Adana (1)'in ve inokulum verilmeyen negatif kontrol bitkisinin Etrog citronda hiçbir viroid belirtisi geliştirmedeği gözlenmiştir. Bu gözlemlere dayanarak Adana (1) ağacında turunçgil viroidleri açısından bulaşıklık olmadığı düşünülmektedir. Diğer ağaçlarda ise tekli ya da karışık viroid enfeksiyonları bulunma olasılığı vardır. Çizelge 4.1'deki seçilen ağaçların biyolojik indeksleme sonrası Etrog citron indikatör bitkisinde meydana getirdikleri belirtilerden yola çıkarak ve Çizelge 2.3'teki bilgilere bağli olarak hangi ağacın hangi viroid ya da viroidlerle bulaşık olabileceği çizelgenin “Bulunması Olası Viroidler “ sütununda verilmiştir. Buna göre Adana (2) ve Adana (5) ağaçlarının Etrog citronda geliştirdikleri orta damar nekrozu ve yaprak epinastisi belirtileri nedeni ile yalnızca CEVd ile bulaşık olma ihtimali bulunmaktadır. Kozan (3) ve Kozan (4) ağaçlarında ise bodurluk, yaprak epinastisi, yaprak ucu kahverengileşmesi belirtileri nedeni ile ve bunun yanı sıra Kozan (4)'ün Etrog citronda meydana getirdiği yaprak düşüklüğü belirtilerinden dolayı bu ağaçlarda CEVd , CVd-II ve III. Grup viroidler (CVd-III) ile CVd-IV'ün bulunma olasılığı vardır. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi seçilen ağaçların indekslenmesi sonucu farklı viroid belirtileri gözlenmiş olmakla birlikte her bir viroide özgü spesifik belirtilerin yanı sıra belirtiler şiddetinde de farklılıklar görülmüştür. Bunun nedeni ortak viroid enfeksiyonu durumunda viroid gruplarının birbirlerini değişik yönde etkileyebilmeleri yani belirtilerin maskelenmesi ya da belirtiler şiddetinin artmasına neden olabilmeleridir (Semancik ve Duran-Vila,1991). Örneğin CEVd ve CVd-Ia ortak enfeksiyonu ya da CEVd ve CVd-IIa ortak enfeksiyonu durumunda CEVd belirtilerinde gerileme meydana gelirken CEVd , CVd-Ia ve CVd-IIa karışık enfeksiyonunda CEVd belirtilerinde artış meydana gelmektedir. CVd-Ia ve CVd-IIa enfeksiyonu durumunda epinasti ve bodurluk belirtilerinde artış meydana gelirken CVd-IIIa ve CVd-IV ortak enfeksiyonunda belirtilsuzluk ya da belirtiler şiddetinde artış meydana gelebilmektedir (Semancik ve Duran-Vila,1991).

Turunçgil viroidlerine özgü belirtilerin gelişme süresinin dört ile on hafta arasında değiştiği, ancak viroidlerin belirtiler gelişiminde ırk, konukçu ve çevresel

faktörlerin oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Semancik, 1987). Zayıf ırklarda simptom gelişiminin uzun sürede meydana geldiği ve simptomların sıcak koşullarda, 32-40 °C max/gündüz ve 27-30 °C min/gece daha hızlı ve mükemmel geliştiği saptanmıştır. Bitki içindeki viroid konsantrasyonunun da simptom gelişimine etkisinin büyük olduğu, konsantrasyonun az olduğu durumlarda belirgin simptomların açığa çıkmayabileceği veya bunların ortaya çıkış sürelerinin oldukça uzun olabileceği rapor edilmiştir (Semancik, 1987). Bu çalışmada biyolojik indeksleme aşısı için uygun bir dönem olan ilkbahar mevsiminde yapılmış olup indikatör bitkilerdeki simptom gelişimi inokulasyondan bir buçuk ay sonra gözlenmeye başlanmıştır ve Çizelge 4.2’de verilen biyolojik indeksleme ile inokulasyon sonrası simptom gelişimi için gerekli minimum inkübasyon periyotları ile benzerlik göstermektedir (Duran-Vila ve ark., 1993).

Çizelge 4.2. Biyolojik İndeksleme ve sPAGE Analizleri ile Viroidlerin Tanısında İnokulasyon Sonrası Gerekli Minimum İnkübasyon Periyotları (Duran-Vila ve ark., 1993)

Viroidler	28-32 °C		18-25 °C	
	Biyolojik İndeksleme (ay)	Etrog citrondan sPAGE (ay)	Biyolojik İndeksleme (ay)	Etrog citrondan sPAGE (ay)
CEVd	1	1	3-6	1
CVd-I	3	1	3-6	1
CVd-II	6-9	2-3	>9	5-7
CVd-III	3	1	6	1
CVd-IV	6	3	>9	2

Çizelgede CEVd’nin biyolojik indekslemeden en az 1 ay sonra simptom geliştirebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada da inokulasyondan bir buçuk ay sonra

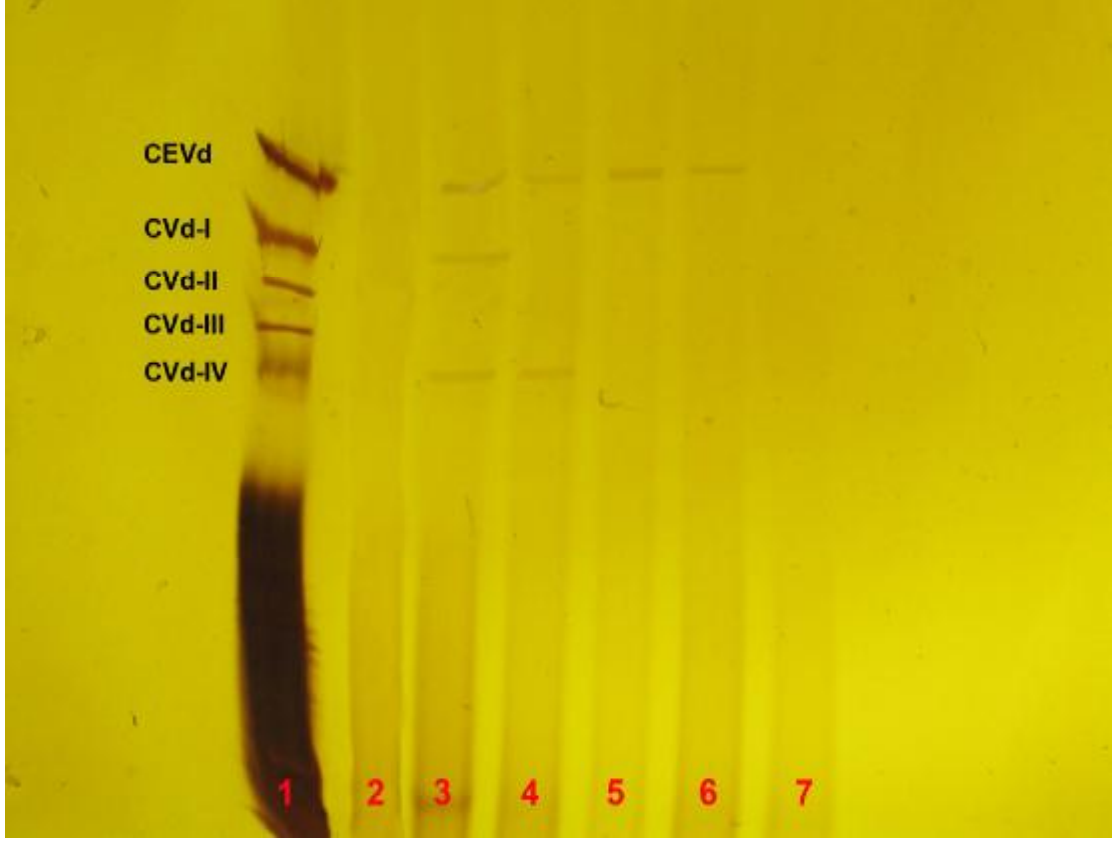
orta damar nekrozu ve yaprak epinastisi şeklinde CEVd simptomları gözlenmeye başlanmıştır. CEVd simptomlarını Kozan (3) ve Kozan (4) Valensiya ağaçları inokulasyondan bir buçuk ay sonra, Adana (2) ve Adana (5) ağaçları ise inokulasyondan iki buçuk ay sonra oluşturmuştur. CVd-II'nin bazen meydana getirdiği yaprak ucu nekrozu ise Çizelge 4.2 ile aynı olup inokulasyondan altı ay sonra Kozan (3) ve Kozan (4)'ün inokule edildiği Etrog citron bitkilerinde gözlenmiştir. Benzer şekilde yaprak düşüklüğü symptomu meydana getirebilen CVd-III'ün ve CVd-IV'ün çizelgede inokulasyondan sonra minimum 3-6 ayda symptom meydana getirdiği bildirilmiştir ve bu çalışmada da yaprak düşüklüğü symptomu Kozan (4) ağacında inokulasyondan 5 ay sonra görülmüştür.

4.3. Turunçgil Viroidlerinin Ardışık Poliakrilamid Jel Elektroforez (sPAGE) Yöntemi ile Araştırılmasına İlişkin Bulgular

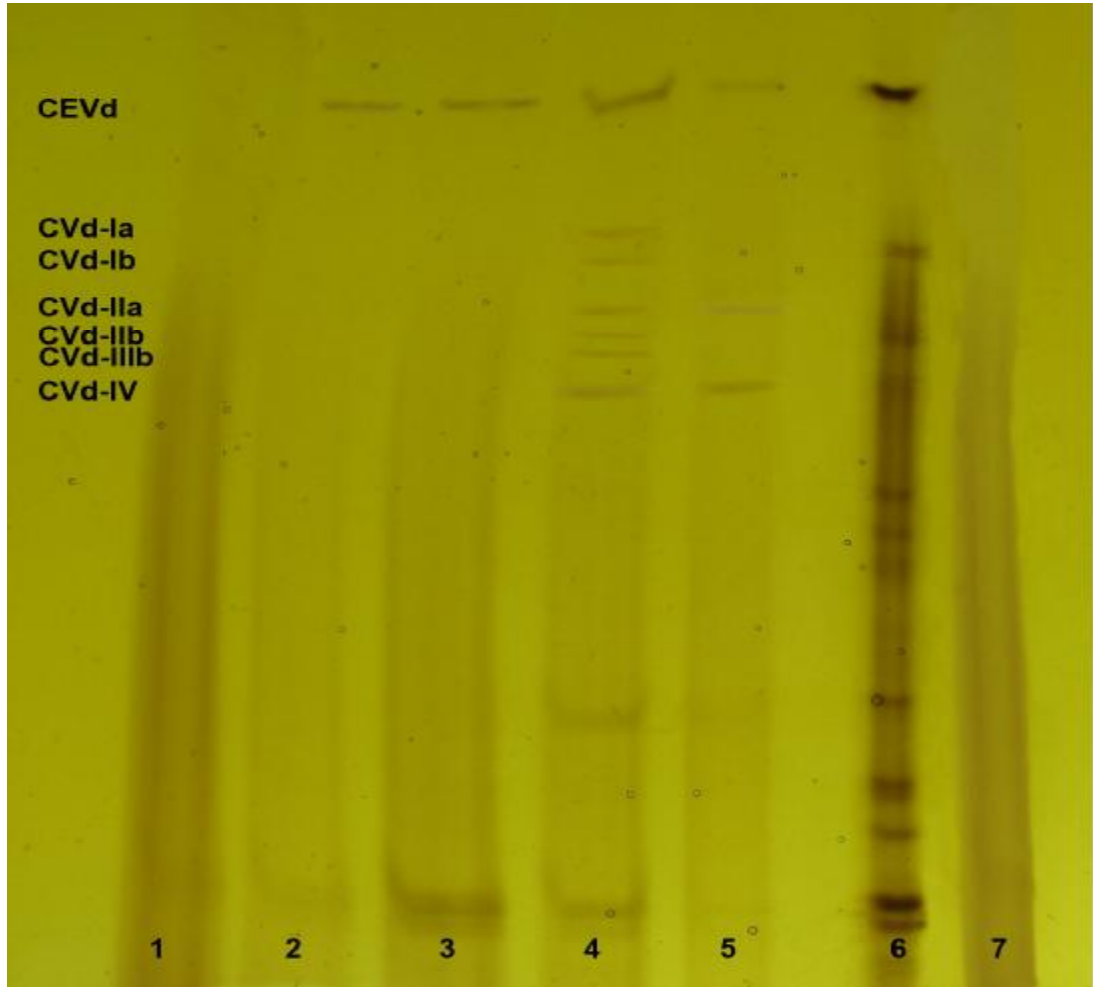
Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucu symptom gelişiminin ardından ur benzeri yapıya sahip portakal ağaçlarındaki turunçgil viroidlerinin araştırılmasına purifikasyon ve elektroforez çalışmalarıyla devam edilmiştir. Seçilen ağaçlarda var olan viroidler ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) yöntemi ile araştırılmıştır. sPAGE analizinde kullanılan bitki materyali biyolojik indekslemede kullanılan Etrog citron bitkileridir. İndikatör bitkilerin özellikle epinasti, yaprak ucu nekrozu, orta damar nekrozu ve yaprak düşüklüğü gibi simptomlu kısımlarını içeren yaprakları toplanmıştır ve Semancik ve ark., (1988b)'nin uyguladıkları yöntemle göre turunçgil viroidleri açısından incelenerek viroidlerin varlığı jel üzerinde belirlenmeye çalışılmıştır.

İlk purifikasyon ve bunu takip eden elektroforez çalışması inokulum verildikten yaklaşık 4 ay sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aday ağaçlarda bulunan viroidleri tanılamak amacı ile referans olarak tüm turunçgil viroidleri ile enfekteli olan pozitif kontrol citron bitkilerinin ve herhangi bir inokulasyon yapılmamış negatif kontrol citron bitkilerinin de purifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Purifikasyon işlemi farklı zamanlarda 5 kez yapılmıştır ve her bir purifikasyon ürünü 2-3 kez elektroforez çalışmasında kullanılmıştır.

İlk elektroforezde Adana (2) ve Kozan (3)'te çok belirgin olmayan yalnızca CEVd'e ait tek viroid bandına, Kozan (4)'te ise CEVd ve CVd-I olmak üzere 2 viroid bandına rastlanmıştır. Viroidlerin bitki içerisindeki konsantrasyonları zamanla değiştiği için farklı zamanlarda purifikasyon işlemi tekrarlanmıştır ve purifikasyon ürünü farklı yoğunluklarda elektroforezde kullanılarak daha belirgin viroid bantları açığa çıkarılmaya çalışılmıştır. Yapılan sPAGE analizleri sonucunda Adana (2), Kozan (3), Kozan (4) ve Adana (5) ağaçlarında yaklaşık 371 nükleotid uzunluğundaki CEVd'nin varlığı saptanmıştır. Bu viroid üç yapraklı anacında kabuk çatlama ları oluştururken turunç anacına aşılı ağaçlarda simptomsuz olarak bulunmakta ve zayıf ırkları bodurluk faktörü olarak kullanılmaktadır (Broadbent ve ark., 1988). Çalışmaya alınan ve gövdelerinde ur benzeri yapılar bulunan ağaçlardan Adana (1) hariç hepsinde CEVd'in var olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu ağaçların genel görüntüsünün de yapısal olarak normal ve ur benzeri yapı taşımayan ağaçlara oranla daha bodur olduğu makroskobik olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Ur benzeri yapı gösteren turuncgil ağaçlarından alınan örneklerin biyolojik indeksleme sonrası sPAGE analizi sonuçları 1. Pozitif kontrol CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III, CVd-IV; 2. Negatif kontrol; 3. Kozan (4) CEVd, CVd-I, CVd-IV ; 4. Kozan (3) CEVd, CVd-IV; 5. Adana (2) CEVd ; 6. Adana (5) CEVd; 7. Adana (1).



Ŗekil 4.9. Ur benzeri yapı gösteren turunçgil ağaçlarından alınan materyallerin biyolojik indekslenmesi sonrası indikatör bitkilerden elde edilen viroid RNA'larının %5'lik poliakrilamid jelde sPAGE yöntemi ile analizi sonuçları. 1. Adana(1); 2. Adana (2) CEVd; 3. Adana (5) CEVd ; 4. Kozan (4) CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb, CVd-IV; 5.Kozan (3) CEVd, CVd-IIa ve CVd-IV; 6. Pozitif kontrol CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb, CVd-IV. 7. Negatif kontrol.

Üç yapraklı anacının kabuk kısmında derin çukurluklar meydana getiren CVd-I'in varlığına yalnızca Kozan (4) ağacında ve pozitif kontrolde rastlanmıştır. Bu viroid turunç anacında üç yapraklı anacındaki gibi derin çukurluk şeklinde simptom meydana getirmemektedir ve turunç anacı bu viroidin simptomsuz

taşıyıcısıdır (Roistacher ve ark., 1993). Arazi gözlemleri sırasında materyal olarak belirlenen Kozan (4) Valensiya ağacında gerek turunç anacı kısmında gerekse portakal olan kalem kısmında derin çukurluklar gözlenmemiştir.

Etrog citronda hafif yaprak ucu nekrozu simptomsu ve üç yapraklı anacında hafif kabuk çatlamaları meydana getiren CVd-IIa (Semancik ve ark., 1988) viroidini Kozan (3), Kozan (4) ağaçları ve pozitif kontrol bitkiler sPAGE analizinde geliştirmiştir. Ancak seçilen ağaçlardan yapılan biyolojik indekslemede Etrog citron üzerinde herhangi bir kabuk çatlaması simptomsu gözlenmemiştir. Bu viroid de bodur turunçgil yetiştiriciliğinde kullanılmakta olup turunç anacına aşıllı çeşitlerde herhangi bir semptom geliştirmemektedir (Roistacher ve ark., 1993). Bu viroidin Etrog citron üzerinde kabuk çatlaması geliştirmeyip sPAGE üzerinde belirlenmiş olması etmenin zayıf bir ırk olduğunu ortaya koymaktadır.

Etrog citronda belirgin bir semptom meydana getirmeyen ve üç yapraklı ağaçlarını etkilemeyen Turunçgil Gözenekleşme Hastalığı etmeni 299 nükleotide sahip CVd-IIb viroidi ise yalnızca Kozan (4) ağacı ve pozitif kontrolde belirlenmiştir. Bu viroid yalnızca mandarin ağaçlarında kalem kısmının kabuk dokusunda zamk paketi oluşturmakta portakal ağaçlarında ise semptomsuz olarak bulunmaktadır (Palacio ve Duran-Vila, 2000).

Farklı ülkelerde yapılan viroid surveyi sonucu ağaç büyüklüğünde azalmaya neden olduğu belirlenen ve Turunçgil Bodurluk Viroidi (Citrus dwarfing viroid (CDVd)) olarak adlandırılan 290 nükleotide sahip CVd-IIIb viroidinin (Gillings ve ark., 1991; Semancik ve ark., 1997; Villalobos ve ark., 1997; Owens ve ark., 2000) bandının varlığına Kozan (4) ağacında ve pozitif kontrolde rastlanmıştır. Günümüzde Turunçgil Kabuk Çatlaklığı Viroidi (Citrus Bark Cracking Viroid (CBCVd)) olarak adlandırılan Turunçgil CVd-IV ise Kozan (3), Kozan (4) ağaçlarında ve pozitif kontrolde belirlenmiş olup diğer ağaçlarda bu viroidin 275 nükleotidlik bandına sPAGE analizinde rastlanmamıştır (Şekil 4.9).

Pozitif kontrolde CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVdIIa, CVd-IIb, CVd-IIc, CVd-IIIa, CVd-IIIb, CVd-IIc, CVd-IIId ve CVd-IV bandı elde edilmiş negatif kontrolde ise herhangi bir viroid bandı gözlenmemiştir. Çalışma sırasında purifikasyon beş kez tekrarlanmış aynı ağaçlar bazen viroidlerin belirlenmesinde

farklılıklar göstermiştir. Bu durum purifikasyon yönteminin uygulanışından el alışkanlığından kaynaklanabileceği gibi viroid konsantrasyonunun Etrog citron indikatöründe yeterli düzeye ulaşmamasından da kaynaklanabilmektedir. Duran-Vila ve ark., (1993)'nın bildirdiğine göre, Turunçgil II. Grup Viroidlerin (CVD-II) bitki içindeki konsantrasyonu oldukça düşük olabilmektedir ve 28-32 °C'de 6-9 ay gibi uzun bir sürede replikasyonları gerçekleşebilmektedir.

Semancik (1986) yapısal olarak farklılık gösteren viroidlerin CF-11 selüloz kromatografi yöntemi ile ayırmak amacı ile yaptığı çalışmada CF-11 selüloz ile viroidleri ayırmanın pratikte birçok avantajı olduğunu belirtmekte, özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunan viroidlerin tanınmasını kolaylaştırdığını, bunun yanında benzer görünen veya eşit büyüklüğe sahip viroid benzeri RNA'ların ortaya konmasının bu yöntemle olabileceğini belirtmektedir. Ancak araştırmacı CF-11 selüloz kromatografi ile viroidleri ve viroid benzeri RNA'ları ayırmada etanol varlığında viroidlerin selüloza bağlanmasında bazı açık olmayan noktalar bulunduğunu ve bu nedenle bazı viroidlerin elde edilemediğini de belirtmektedir.

Çizelge 4.3. sPAGE Analizi Sonucu Jel Üzerinde Oluşan Bandlara Göre Belirlenen Viroidler

ÖRNEKLER	sPAGE Analizi Sonucu Jel Üzerinde Oluşan Bandlara Göre Belirlenen Viroidler
Adana (1)	-
Adana (2)	CEVd
Kozan (3)	CEVd, CVd-IIa, CVd-IV
Kozan (4)	CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIIb, CVd-IV
Adana (5)	CEVd
Pozitif (+) kontrol	CEVd, CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-Ic, CVd-IIa, CVd-IIb, CVd-IIc, CVd-IIIa, CVd-IIIb, CVd-IIId, CVd-IIId ve CVd-IV
Negatif (-) kontrol	-

sPAGE analizi ile elde edilen ve Çizelge 4.3'te verilen sonuçlar, Çizelge 4.1'de biyolojik indeksleme sonrası indikatör bitkilerde meydana gelen semptomlara dayalı olarak verilen ‘‘Bulunması Olası Viroidler’’ sütunundaki kısım ile karşılaştırıldığında aralarında büyük ölçüde benzerlik olduğu görülmektedir. Çizelge 4.1'de Adana (1) dışındaki tüm örneklerde bodurluk, yaprak epinastisi ve damar nekrozları şeklinde CEVd'nin oluşturduğu semptomların ortaya çıkması bu ağaçların CEVd ile bulaşık olabileceği belirtilmiş olup sPAGE ile de jel üzerinde CEVd bandına rastlanmış ve aynı sonuç elde edilmiştir. Benzer şekilde Adana (2) ve Adana (5)'te semptomlara dayalı olarak yalnızca CEVd ile bulaşıklık ihtimali belirtilmiş olup yapılan sPAGE analizi ile de aynı sonuç elde edilmiştir. Kozan (3)'te Etrog citron üzerinde orta şiddette bodurluk, şiddetli yaprak epinastisi ve yaprak ucu kahverengileşmesi semptomlarına dayanılarak CEVd dışında CVD-II, CVD-III ve CVD-IV olabileceği verilmiş ancak CVD-III dışındaki tahmini olarak verilen diğer viroid bantları tespit edilmiştir. Bu örneğin CVD-III ile bulaşık olabileceği ifade edilmişken sPAGE'de bu viroid bandına rastlanmamış olup bu viroid yönünden bulaşıklık belirlenmemiştir. Çizelge 4.1'de tahmini olarak verilen viroidler yalnızca tek bir semptoma bağlı olarak değil karışımlar olarak da verilmiş olup aynı zamanda benzer semptomu farklı viroidler de geliştirebilmektedir. Kozan (4) portakal ağacında CVD-I'e özgü bir semptom olan yaprak bükülmesi semptomu gözlenmemiş olmasına karşın jel üzerinde bu viroide ait banda rastlanmıştır. Ancak bu ağaçta CEVd, CVD-I, CVD-II, CVD-III ve CVD-IV şeklinde karışık viroid enfeksiyonu belirlenmiş olup daha önce de verildiği gibi ortak viroid enfeksiyonu durumunda semptomların ortaya çıkışında değişiklik meydana gelebilmektedir ve bu değişiklik bazen semptomun engellenmesi biçiminde olabilmektedir. Örneğin CVD-IIa ve CVD-IV'ün ortak enfeksiyonunda değişken semptomlar, semptomsuzluk ya da semptom şiddetinde artış olabilmektedir (Semancik ve Duran-Vila, 1991). Yapılan sPAGE analizleri sonucunda Kozan (3) ve Kozan (4) Valensiya ağaçlarında CVD-IV'ün varlığı belirlenmiştir. Bu viroid Akdeniz Bölgesinde oldukça yaygın olup bu viroidin turuncgil ağaçlarında özellikle Klemantin mandarinlerinde çatlaklar oluşturduğu bildirilmiş ve bu nedenle Turuncgil Kabuk Çatlaklığı Viroidi (CBCVd) olarak adlandırılmıştır (Anonymous, 2009). Ancak bu çalışmada sPAGE analizi sonucunda

CVd-IV içeren Kozan (3) ve Kozan (4) ağaçlarında belirgin bir çatlaklık belirlenmemiştir. Yapılan bu çalışmada biyolojik indeksleme çalışmalarını elektroforez çalışmaları ile kıyasladığımızda genel olarak bir uyumluluğun olduğu görölmektedir.

Roistacher ve arkadaşları (1993) yapmış oldukları bir çalışmada üç yapraklı anacına aşılı turunçgil ağaçlarının gövdelerinde ince uzun çöküntüleri turunçgil I. Grup viroidlerinin (CVd-Ia), diz şeklindeki çıkıntıları ise CVd-IIIb'nin oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ur benzeri yapılar sergileyen ağaçlarda bu iki viroidin varlığına sadece Kozan (4) olarak adlandırılan Valensiya ağacında rastlanmıştır. Analiz edilen diğ er ağaçların tamamında bu viroidler gözlenmemiştir.

Duran-Vila ve Semancik (2003) turunçgil III. Grup viroidlerin turunçgil ağaçlarında oluşturduğu diz şeklindeki çıkıntıların baskın olmayıp her ağaçta görülmediğini, çıkıntıların bakım uygulamalarından veya yetiştiriliş koşullarından da kaynaklanabileceğini belirtmiştir (Duran-Vila ve Semancik, 2003). Bu çalışmada da bu iki viroidin ur benzeri yapılar sergileyen ağaçlardan yalnızca birinde bulunması seçilen diğ er ağaçlarda bulunmaması bu yorumu destekler niteliktedir. sPAGE analizi sonucunda tüm ağaçların ortak bir viroid profili sergilemediği belirlenmiştir. Turunçgil viroidleri açısından sadece CEVd dört ağaçta ortak olarak belirlenmiştir. Ancak bu viroidin tüm turunçgil ağaçlarında çok yaygın olduğu ve üç yapraklı anacında kavlamalara neden olduğu, turunç anacında ise bodurluk oluşturduğu verime direk etki etmediği ve ur benzeri yapılarla ilgili olmadığı belirlenmiştir (Duran-Vila, ve Semancik, 2003). Bunun dışında yapılan analizler sonucunda ur oluşumları ile ilgili olabilecek yeni bir viroide rastlanmamıştır. Yapılan sPAGE analizleri sonucunda incelenen ağaçlarda ortak bir viroid profili elde edilememiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Adana ilinde gövdelerinde ur benzeri yapı bulunan portakal ağaçlarında turunçgil viroidlerinin varlığını belirlemek ve bu ağaçlardaki viroid profilini ortaya koymak amacı ile yürütülen bu çalışmada, seçilen ağaçlar biyolojik indeksleme ve ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) ile analiz edilmiştir.

Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda seçilen ağaçların belirli viroidlerle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Adana (1) ağacının inokulum olarak verildiği ve hiçbir inokulum verilmeyen negatif kontrol bitkide herhangi bir viroid simptomsu gözlenmemiştir. Adana (2) ve Adana (5) ağacı Etrog citronda orta damar nekrozu ve şiddetli yaprak epinastisi, Kozan (3), Kozan (4) ağacı ve pozitif kontrol ortak olarak orta şiddette bodurluk, şiddetli yaprak epinastisi ve yaprak ucu kahverengileşmesi simptomlarını geliştirmiştir. Ayrıca Kozan (4) ağacı yukarıda belirtilen simptomlara ek olarak yaprak düşüklüğü simptomsu da meydana getirmiştir. Gözlenen simptomlara bağlı olarak bu ağacın birden fazla viroidle bulaşık olabileceği belirlenmiştir.

Çalışma materyali olarak belirlenen Valensiya portakal ağaçları turunçgil viroidlerinin yanı sıra Turunçgil Kavlama Hastalığı (CPsV) ve Turunçgil Göçüren Hastalığı (CTV) açısından da incelenmiştir. CPsV için indikatör olarak kullanılan Madam Vinous portakallarından yalnızca pozitif kontrolde CPsV'ne ait damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni ve genç sürgünlerde şok simptomları gelişmiştir. Seçilen ağaçlardan alınan inokulumun verildiği bitkilerin ve hiçbir inokulumun verilmediği negatif kontrol bitkilerin genç yapraklarında ve sürgünlerinde ise hiçbir psorosis simptomsu gözlenmemiştir. Bu bitkilerde herhangi bir simptomsun gelişmemiş olması çalışmada materyal olarak kullanılan ağaçların CPsV ile bulaşık olmadığını ortaya koymaktadır.

Turunç ve Meksika laymı bitkilerinin indikatör olarak kullanıldığı tristeza indekslemesinde ise pozitif kontrol hariç hiçbir bitkide yaprak sarılığı (seedling yellow), damarlarda renk açılması (vein clearing) ve yapraklarda kaşıklanma simptomlarına rastlanmamıştır. Materyal olarak seçilen ağaçların arazi gözlemlerinde ve indikatör bitkilerde CTV ile ilgili olabilecek herhangi bir makroskobik simptomsu rastlanmamış olması ve ağaçların sağlıklı görünimleri göz önüne alındığında

çalışmada materyal olarak kullanılan ağaçların tümünün göçüren hastalığı ile bulaşık olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Yapılan sPAGE analizleri sonucu seçilen Valensiya portakal ağaçlarından Adana (1) hariç hepsinde tekli ya da karışık viroid infeksiyonu belirlenmiştir. CEVd dört ağaçta ortak olarak bulunmuştur ancak bu ağaçlardan Adana (2) ve Adana (5)'te CEVd dışında başka bir turuncgil viroidi ile bulaşıklık belirlenmemiştir. Kozan (3) ağacında CEVd dışında CVD-IIa ve CVD-IV'ün bulunduğu, Kozan (4) ağacında ise CEVd dışında CVD-Ia, CVD-Ib, CVD-IIa, CVD-IIb, CVD-IIIb ve CVD-IV'ün bulunduğu birden fazla viroid bandı saptanmıştır. Pozitif kontrolde CEVd, CVD-Ia, CVD-Ib, CVD-Ic, CVD-IIa, CVD-IIb, CVD-IIc, CVD-IIIa, CVD-IIIb, CVD-IIId, CVD-IIIc, CVD-IIIId ve CVD-IV bandı elde edilmiş negatif kontrolde ise herhangi bir viroid bandı gözlenmemiştir.

Bu çalışmada biyolojik indeksleme çalışmalarını elektroforez çalışmaları ile kıyasladığımızda genel olarak bir uyumluluğun olduğu görülmektedir. Biyolojik indeksleme çalışmalarında Etrog citron üzerinde gözlenen spesifik viroid simptomlarının sPAGE analizi sonucu elde edilen viroid bantları ile uyumluluk sergilediği belirlenmiştir.

Yapılan sPAGE analizleri sonucu ur benzeri yapı gösteren portakal ağaçlarında yalnızca CEVd'in dört ağaçta ortak olarak bulunduğu, bunun dışında ağaçların ortak bir viroid profili sergilemediği belirlenmiştir. Portakal ağaçlarında ur oluşumları ile ilgili olabilecek yeni veya farklı bir viroid bandına rastlanmamıştır.

Bu çalışma ur benzeri yapıya sahip turuncgil ağaçlarının turuncgil viroidleri yönünden incelenmesi konusunda ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçlar turuncgil viroidleri ile ilgili bilinmeyenlerin açığa çıkarılması ve sonraki bilimsel çalışmalara ışık tutması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

ANONYMOUS, 2006a. TÜİK verileri (www.tuik.gov.tr) 9, Mayıs 2009.

<http://209.85.129.132/search?q=cache:D3V8KnigWGwJ:www.ymms.org.tr/home/ymsturuncgil.aspx+TU%C4%B0K+2006+29+ADANA+%C4%B0LLER+E+G%C3%96RE+TURUN%C3%87G%C4%B0L&cd=1&hl=tr&ct=clnk&gl=tr>

ANONYMOUS, 2006b. Yaş Sebze, Meyve ve Kesme Çiçek İle Narenciye Üretimindeki ve İhracatındaki Sorunların Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan(10.81.234.286) Esas Numaralı Meclis Araştırması Komisyonu Raporu,2006.

ANONYMOUS, 2007a. FAO Statistic (www.fao.org) 9, Mayıs 2009.

ANONYMOUS, 2007b. <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/PRIONS.HTM> (20.11.2007).

ANONYMOUS,2009.<http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:keKlq-Bj-RAJ:www.danforthcenter.org/upload/ictvupload/2005.254P.04.CitrusbarkCracking.pdf+Citrus+bark+cracking+viroid+CBCVd&hl=tr&gl=tr> 16.09.2009.

ALBANESE, G., ROSA, R., DAVINO, M., HAMMOND, W.R., SMITH, D.R., DIENER, T.O., 1988. A Viroid Different From Citrus Exocortis Viroid Found in Commercial Citrus in Sicily. 10th Conf. IOCV. Riverside, 165-172.

AZERİ, T., ve HEPPER. E., 1973. Ege Bölgesi Satsuma Mandarinlarındaki Virüs Hastalıklarının Tanımı, Yayılışı ve Ekonomik Önemi Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK IV. Bilim Kongresi, 46-51.

BAR-JOSEPH, M., MARCUS, R., and LEE, R.F., 1989. The Continuous Challenge of Citrus Tristeza Virus Control. Ann. Rev. Phytopathol. 27 : 291-316.

BARBARA, D.J., MORTON, A., and ADAMS, A.N., 1990. Assessment of UK Hops for The Occurrence of Hop Latent and Hop Stunt Viroids, Annals of Applied Biology 116:265.

BENTON, R. J., BOWMAN, F.T., FRASER, L., and KEBBY, R.G., 1949. Selection of Citrus Budwood to Control Scally Butt in Trifoliata Rootstock. Agric.Gaz. N.S. Wales 60, 31-34

- BENTON, R. J., BOWMAN, F.T., FRASER, L., and KEBBY, R.G., 1950. Stunting and Scaly Butt Associated with Poncirus Trifoliata Rootstock. N.S. Wales, Dept. Agr., Sci. Bull.70, 1-20.
- BITTERS, W.P., 1952. Exocortis Disease of Citrus California Agriculture. 6, 5-6.
- BROADBENT, P., NICHOLLS, P., and B. FREEMAN, 1988. Effect of Graft-Transmissible Dwarfing Agents in Lemons. pp. 204-211, In. Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- CALAVAN, E. C., CHRISTIANSEN, D. W., and WEATHERS, L. G., 1961. Comparative Reaction of Orlando Tangelo and Palestine Sweet Lime to Cachexia and Chlyporosis. pp. 150-158. In. Proc. 2nd Conf. IOCV. Univ. Of Fla. Pres, Gainesville.
- CALAVAN, E.C., FROLICH, E.F., CARPENTER, J.B., ROISTACHER, C.N., & CHRISTIANSEN, D.W., 1964 Rapid Indexing for Exocortis of Citrus Phytopathol., 54 :1359-1362.
- CALAVAN, E. C., CHRISTIANSEN, D., 1965. Variability of Cachexia Reaction Among Varieties of Rootstocks within Clonal Propagations of Citrus. In. Proc. 3rd Conf. IOCV, p.76-85. Gainesville, Univ. Fla. Pres.
- CALAVAN, E. C., 1968. Exocortis. In: Indexing Procedures. for 15 Virus Diseases of Citrus Trees, pp. 28-34. Agriculture Handbook No. 333.USDA.
- CHILDS, J. F. L., 1950. The Cachexia Disease of Orlando Tangelo. Plant Dis.Repr., 34:295-298.
- ÇINAR, A., KERSTING, U., ÖNELGE, N., KORKMAZ, S. ve SAS, G. 1993. Citrus Virus and Virus-like Diseases in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. In: P. Moreno, J. V. da Graca and L. W. Timmer, (eds.) , Proc.12 Conf. IOCV, Riverside, CA, USA, pp.397-400.
- DIENER, T. O., and RAYMER, W.B., 1967. Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with Properties of Nucleic Acid Science, 158:378-381.
- D'ONGHIA, A. M., FAHMY, H., BRANDONISIO, R., and DJELOUAH, K., 2007. Proceedings of the International Organization of Citrus Virologist : IOCV 2007.

- DURAN-VILA, N., FLORES, G., & SEMANCIK, J.S.,1986. Characterization of Viroid-like RNAs Associated with The Citrus Exocortis Syndrome. *Virology* 150, 75-84.
- DURAN-VILA, N., PINA, J.A., BALLESTA, J.F., JUAREZ, J., ROISTACHER, C.N., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and SEMANCIK, J. S., 1988. The Citrus Exocortis Disease: A Complex of Viroid-RNAs. pp. 152-165. In: Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- DURAN-VILA, N., ROISTACHER, C.N., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and SEMANCIK, J.S. (1988a). A Definition of Citrus Viroid Groups and Their Relationship to The Exocortis Disease. *J. Gen. Virol.* 69, 3069-3080.
- DURAN-VILA, N., PINA, J.A., BALLESTER, J.F., JUAREZ, J., ROISTACHER, C. N., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and SEMANCIK, J.S.,1988b. The Citrus Exocortis Disease: A Complex of Viroid RNAs. Pages 152-164 in: Proc 10 th Conf. Int. Org. Citrus Virol. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro, eds. IOCV:Riverside, CA.
- DURAN-VILA, N., PINA, J.A., and NAVARRO, L.,1993. Improved Indexing of Citrus Viroids. Pages 202-211 in : Proc. 12th Conf. Int. Organ. of Citrus Virol. P. Moreno, J. V. da Graça, and L.W. Timmer, eds. IOCV: Riverside, C.A.
- DURAN-VILA, N., and SEMANCIK, J.S.,2003. in *Viroids : Citrus Viroids*, Pages 184-185.
- FLORES, R., DURAN-VILA, N., PALLÁS, V., and SEMANCIK, J.S., 1985. Detection of Viroid and Viroid-like RNAs from Grapevine. *J. Gen. Virol.* 66:2095-2102.
- FLORES, R., 1988. Detection of citrus Exocortis Viroid in Natural and Experimental Citrus Hosts by Biochemical Methods. In: Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists, 10, Riverside. Proceedings... Riverside: CA. USA, p 192-196.
- FLORES, R., RANGLES, J.W., BAR-JOSEPH, M., and DIENER, T.O., 2000. Subviral Agents: Viroids. Pages 1009-1024 in: *Virus Taxonomy, Seventh Reporth of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*

- FLORES, R., RANGLES, J.W., and BAR-JOSEPH, M., 2005. [www.thesis.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt](http://www.thesis.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt).
- FRASER, L.R., & BROADBENT, P., 1979. Virus and Related Diseases of Citrus in New South Wales. 77 pp.
- FUTCH, S.H., and BRLANSKY, R.H., 2004. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus, Citrus Industry Magazine 85(7):22-23.
- GIERSON, D., 1982. Gel Electrophoresis of RNA . pp. 1-38. In "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Practical Approach", IRL Press.
- GILLINGS, M.R., BROADBENT, P., GOLLNOW, B.I., 1988. Biochemical Indexing for Citrus Exocortis Viroid. pp 178-187. In: Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists, 12, Riverside. Proceedings... Riverside: CA. USA, p 178-187.
- GILLINGS, M. R., BROADBENT, P., and GOLLNOW, B. I., 1991. Viroids in Australian citrus: Relationship to Exocortis, Cachexia and Citrus Dwarfing. Aust. J. Plant Physiol. 18: 559-570.
- GÜLDÜR, M. E., 1988. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgil Tür ve Çeşitlerinde Xyloporosis- Cachexia Hastalık Etmeninin İndeksleme Yöntemi ile Saptanması. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. 46 p.
- GÜLLÜ, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel Grubu Portakal ve Satsuma Mandarin Ağaçlarında Yaygın Virüs ve Virüs-benzeri Hastalıkların Sörveyi ve İndekslenmesi Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi 266s.
- HADIDI, A., and YANG, X., 1990. Detection of Pome Fruit Viroids by Enzymatic cDNA Amplification. J. Virol. Methods, 30:261-270.
- HADIDI, A., TERAİ, Y., POWELL L.A., SCOTT, S.W., and DESVIGNES, J.C., 1992. Enzymatic cDNA. Amplification of HSVd Variants from Naturally Infected Fruit Crops. Acta Hortic. 309:339-344.
- HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W. and SEMANCIK, J.S., 2003. Viroids. Eds. Csiro Publishing: Australia. 370 p.
- HANOLD, D., and RANGLES, J.W., 1991. Coconut Cadang Cadang Disease and Its Viroid Agent. Plant Disease, 75:330.

- HANOLD, D., SEMANCIK, J.S., and OWENS, R.A., 2003. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. in: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Page 95-103.
- HIZAL, A. Y., GÖRAL, V. T., 1987. Türkiye Turunçgil Üretimi-İhracatı ve Virüs Hastalıkları Yönünden Durumu. *Derim*, 4 (1):32-42.
- 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 Stain for The Detection of Nanogram Amounts of tRNA Following Two-dimensional Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 134:184-188.
- KEESE, P., and SYMONS, R.H., 1985. Domains in Viroids: Evidence of Intermolecular RNA Rearrangements and Their Contribution to Viroid Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4582-4586.
- KOLTUNOW, A.M., and REZAIAN, M. A., 1989. A Scheme for Viroid Classification, *Intervirology*, 30:194.
- LOPEZ-HERRERA, C., PLIEGO, E., & FLORES, R., 1987. Detection of Avocado Sunblotch Viroid in Spain by Double Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Phytopathology*, 119: 184-189.
- MOREIRA, S., 1955. Sintomas De Exocortis Em Limoeira Cravo. *Araientia*, 14:19-21.
- MOREIRA, S., 1965. Cachexia and Xyloporosis. Are the Caused by The Same Virus? pp. 52-56. In *Proc. 3rd Conf. IOCV. Univ. Of Fla. Pres Gainesville*.
- NORMAN, P. A., 1963. Report to The Government of Turkey on Citrus Virus Diseases. *FAO Report No:1641*. 16 pp.
- OWENS, R. A., YANG, G., GUNDERSEN-RİNDAL, D., HAMMOND, R. W., CANDRESSE, T., and BAR-JOSEPH, M., 2000. Both Point Mutation and RNA Recombination Contribute to The Sequence Diversity of Citrus Viroid III. *Virus Genes* 20: 243-252.

- ÖNELGE, N., 1994. Turunçgillerde Hastalık Oluşturan Viroidlerin Biyolojik ve Biyokimyasal (PAGE) Tanısı Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Doktora Tezi 93s.
- ÖNELGE, N., 1996. Nucleotide Sequence of CVd-Ib and CVd-IV Viroid Collected from Citrus Gummy Bark Diseased Sweet Orange Trees in The East Mediterranean Region of Turkey. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 103(5), 482-487.
- ÖNELGE, N., 1997. Direct Nucleotide Sequencing of Citrus Exocortis Viroid (CEV). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 21, 419-422.
- ÖNELGE, N., 2007. Proceedings of The International Organization of Citrus Virologist : IOCV 2007.
- ÖZALP, O., ve AZERİ, T., 1967. Ege Bölgesi Turunçgil Virüs Hastalıkları Sürveyi. *Bitki Koruma Bülteni*, 7(4):167-187.
- PALACIO, A., and DURAN-VILA, N., 2000. Citrus Cachexia Disease : Molecular Characterization of Its Viroid Agent. 14th Conf. IOCV. Riverside, 273-281.
- PALACIO, A., FOISSAC, X., DURAN-VILA, N., 2000. Indexing of Citrus Viroids by Imprint Hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*, v. 105, p. 897-903.
- PUCHTA, H., RAMM, K., and SANGER, H.L., 1988a. The Molecular Structure of Hop Latent Viroid (HLV) A New Viroid Occuring Worldwide in Hops. *Nucleic Acids Research* 16: 4195-4216.
- RANGLES, J.W. (2003). Viroids. *Economic Impact of Viroid Diseases* pp. 3-11.
- REICHERT, I., and BENTAL, A., 1957. Additional Tristeza Infected Citrus Varieties Found in Israel. *FAO, Plant Prot. Bull.*, s:129-130.
- RIESNER, D., and GROSS, H.J., 1985. Viroids. *Annual Reviews of Biochemistry* 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.*

- ROISTACHER, C.N., BLUE, R.L., & CALAVAN, E.C.,1973. A New Test for Cachexia. *Citrogr.*, 58:261-262.
- ROISTACHER, C. N., CALAVAN, E.C., BLUE, R.L., NAVARRO, L., & GONZALES, R.,1977. A New More Sensitive Citron Indicator for Detection of Mild Isolates of Citrus Exocortis Viroid (CEV). *Plant Dis. Rep.*, 61: 135-139.
- ROISTACHER, C.N.,1991. Graft-transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis. IOCV, Riverside and FAO, Rome. 286 p.
- ROISTACHER, C. N., BASH, J. A., and SEMANCIK, J. S., 1993 . Proceedings of the Twelfth Conference of The International Organization of Citrus Virologists : IOCV 1993. P 173-179
- SALIBE, A.A., 1965. A Quick Field Test for Xyloporosis Virus. In. *Proc. 3rd Conf. IOCV, Univ. Of Flo Pres Gainesville.* 108-113.
- SALIBE, A.A., and MOREIRA, S.,1965.Tahiti Lime Bark Disease is Caused by Exocortis Virus. Pages 143-147 in: *Proc. 3rd Conf. Int. Org. Citrus Virol.* W.C. Price , ed. University of Florida Pres, Gainesville, FL.
- SALIBE, A.A., and MOREIRA, S., 1968. Effect of Virus Diseases on Growth and Productivity of Citrus Trees. pp. 289-303. In. *Proc. 4th Conf. IOCV. Univ. of Flo. Pres. Gainesville.*
- SÄNGER, H.L., 1988. Viroids and Viroid Diseases. *Acta Hortic.* 234:79-87.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R.W., DIENER, T.O., and OWENS, R.A.,1992.Identification of Multiple Structural Domains Regulating Viroid Pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10104-10108.
- SCHUMACHER, J., RANGLES, J.W., & 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 An Infectious Free- Nucleic Acid Plant Virus with Unusual Properties. *Virology*, 47: 456-566.
- SEMANCIK, J.S., and HARPER, K.L.,1984. Optimal Conditions for Cell-free Synthesis of Citrus Exocortis Viroid and The Question of Specificity of

- RNA Polymerase Activity. Proceedings of the National Academy of Sciences, , v. 81, p. 4429-4433.
- SEMANCIK, J. S., 1986. Separation of Viroid RNAs by Cellulose Chromatography Indicating Conformational Distinctions. *Virology*, 155: 39-45.
- SEMANCIK, J. S., 1987. Viroids and Viroid-like Pathogens. CRC Pres: Boca Raton. 127- 161.
- SEMANCIK, J. S., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and GOHEEN, A. C., 1987. Widespread Occurrence of Viroid-like RNAs in Grapevines. *Am. J. Enol. Viticult.* 38: 35-40.
- SEMANCIK, J.S., ROSTACHER, C. N., and DURAN-VILA, N., 1988. A Viroid RNA Associated with Cachexia (Xyloporosis) Disease of Citrus. pp. 126-136. In. Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- SEMANCIK, J.S., ROISTACHER, C.N., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and DURAN VILA, N., 1988b. Citrus Cachexia Viroid, A New Viroid of Citrus: Relationship to Viroids of The Exocortis Disease Complex. *Journal of General Virology* 69: 3059-3068.
- SEMANCIK, J.S., and DURAN-VILA, N., 1991. The Grouping of Citrus Viroids : Additional Physical and Biological Determinants and Relationships with Diseases of Citrus. pp.171-178. In Proc. 11th Conf. IOCV, IOCV Riverside .
- SEMANCIK, J.S., ROISTACHER, C. N., 1991. The Citrus Viroid Complex . I. *Citrograph* 76:17-25.
- SEMANCIK, J. S., and SZYCHOWSKI, J. A., 1992. Relationships Among The Viroids Derived from Grapevines. *J. Gen. Virol.* 73:1465-1469.
- SEMANCIK, J. S., RAKOWSKI, A. G., BASH, J. A., and GUMPF, D. J., 1997. Application of Selected Viroids for Dwarfing and Enhancement of Production of Valencia orange. *J. Hort. Sci.* 72: 563-570.
- SERRA, P., BARBOSA, C. J., DAROS, J. A., FLORES, R., & DURAN-VILA, N. (2008). Citrus Viroid V: Molecular Characterization and Synergistic Interactions with Other Members of The Genus *Apscaviroid*. *Virology*, 370, 102–112. doi:[10.1016/j.virol.2007.07.033](https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.033).

- SZYCHOWSKI, J., GOHEEN, A.C., & SEMANCIK, J.S., 1988. Mechanical Transmission and Rootstock Reservoirs as Factors in The Widespread Distribution of Viroids in Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39: 213-216.
- SYMONS, R.H., 1981. Avocado Sunblotch Viroid : Primary Sequence and Proposed Secondary Structure. *Nucleic Acids Res.* 9, 6527-6537.
- VALVERDE, R. A., DODDS, J. A., and HEICK, J. A., 1986. Double Stranded RNAs from Plants Infected with Viruses Having Elongated Particles and Undivided Genoms. *Phytopathology* 76: 459-465.
- VILLALOBOS, W., RIVERA, C., and HAMMOND, R. W., 1997. Occurrence of Citrus Viroids in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 45, 983-987.
- WAH, Y.F.W.C., and SYMONS, R.H., 1997. A high sensitivity RT-PCR Assay for The Diagnosis of Grapevine Viroids in Field and Tissue Culture Samples, *J. Virol. Methods* 63 (1997), pp. 57-69.
- WALLACE, J. M., 1978. Virus and Virus-like Diseases. pp. 67-184. In "The Citrus Industry". Univ. Cal. Div. Agr. Sel.
- 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 1996.
- 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., GREEN, F.C., and HARJUNG, M. K., 1967. Transmission of Exocortis Virus of Citrus to Herbaceous Plants. *Plant Disease*, 51: 868-871.
- YAMADA, S., and TANAKA, H., 1972. Damage from Eocortis in Japan . pp. 99-101. In Proc. 5th Conf. IOCV, Univ. Fla. Pess Gainesville.
- YAMAMOTO, H., KAGAMI, Y., JUROKAWA, M., MISHIMURA, S., UKAWA, S., and KUBO, S., 1973. Studies on Hop Stunt Disease in Japan. *Pep. Res. Lab. Kirin Brewery Co Ltd.*, 16:49.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2001 yılında girmiş olduğum Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bitkisel üretim bölümünden 2002 yılında yatay geçişle Çukurova Üniversitesine geçiş yaptım ve 2005 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü’nün Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2005 yılında başlayan yüksek lisans öğrenimimi 2006-2009 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım. Evliyim.

EKLER

EK-1.**Nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltiler****STE X 10 Tampon Çözeltisi pH 7.2 (0.5 lt)**

NaCl	1 M
Tris	0.5 M
EDTA	10mM

TAE X 10 Tampon Çözeltisi (Stok D) pH 7.2

Tris	400mM
Sodyum Asetat	200mM

TAE Tampon Çözeltisi (Stok G) pH 6.5

Tris	120mM
Borik Asit	22mM

TBE X 10 Tampon Çözeltisi (Denaturing Buffer) pH 8.3

Tris	225mM
Sodyum EDTA	5mM
Borik asit	22mM

TKM X 10 Tampon Çözeltisi pH 7.4

Tris	10Mm
KCl	10mM
MgCl ₂	0.1Mm

EM-1 Tampon Çözeltisi

%1 SDS

0.4 M Tris-HCl, pH 8.9

5 mM EDTA pH 7.0

%4 merkaptopetanol

EM-2 Tampon Çözeltisi

0.5 M Na₂SO₃

%1 SDS

%4 Merkaptoetanol

%1'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi

SDS 1g

dH₂O 100ml

EDTA Tampon Çözeltisi pH 7

EDTA 0.1 M

STE-Etanol (%35)

10 X STE 63.2 ml

%95 Etanol 368 ml

Destile su 568.8 ml

STE-Etanol (%30)

10 X STE 68.5 ml

%95 Etanol 315 ml

Destile su 616.5 ml

EK-2.**sPAGE analizinde kullanılan tampon çözeltiler****%5 Native Jel**

12 ml H₂O

10 ml Stok C

2.4 ml Stok B

5ml Stok A

0.48 µl Stok E

Stok A

Akrilamid 30 g

Bisakrilamid 0.75 g

100 ml dH₂O

Denaturing Jel pH 6.5

14.4 g üre

7 ml H₂O

3 ml Stok G

5 ml Stok A

2.5 ml Stok B

0.5 µl Stok E

Stok G pH 6.5

Tris 120 mM

Sodyum asetat 60 mM

Sodyum EDTA 3 mM

Stok B

2 ml TEMED (Tetramethylethylenediamine)

100 ml dH₂O

Stok E

Amonyum persülfat 2.5 g

dH₂O 25 ml

Stok C

30 ml Stok D destile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Gümüş Nitrat Solüsyonu (12mM Ag NO₃)

AgNO₃ 0.41 g

Destile su 200 ml

Hidroksit Solüsyonu

KOH 41 g

HCHO 7.5 ml

Destile su 100 ml