

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Turunçgil Bitkilerinde Görülen *Citlodavirus citri* (CCDaV) ve *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) Etmenlerinin Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları Üzerindeki Canlılık Sürelerinin ve Kontrol Materyali Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Nida YALÇIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Ocak, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Turunçgil Bitkilerinde Görülen *Citlodavirus citri* (CCDaV) ve
Potexvirus citriflavivenae (CYVCV) Etmenlerinin Nitroselüloz
ve Kaba Filtre Kağıtları Üzerindeki Canlılık Sürelerinin ve
Kontrol Materyali Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Nida YALÇIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 28/01/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş
ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE (Danışman)
: Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Doç Dr. Ali ENDES

**Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:**

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-15726**

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Çalışma Materyalleri	15
3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller.....	15
3.1.3. TNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	15
3.1.4. RT-PCR/PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyaller.....	16
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	16
3.2. Metot	16
3.2.1. CCDaV ve CYVCV ile Enfekteli Bitki Örneklerinin Toplanması	16
3.2.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi ..	17
3.2.3. TNA Ekstraksiyonu Uygulamaları.....	18
3.2.4. Virüslerin Filtre Kağıtlarına Aktarılması	19
3.2.5. RT-PCR/PCR Uygulamaları	23
3.2.6. Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi.....	26
3.2.7. CCDaV ve CYVCV Etmenlerinin Turunç Bitkilerine Mekanik İnokulasyon ile Aktarılması	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Virüsler ile Enfekteli Bahçelere Ait Hastalık Simptomları Gösteren Ağaçlardan Alınan Örneklerin RT-PCR/PCR Çalışmaları ile İlgili Bulgular ve Tartışma	29
4.2. Viral Etmenlerin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma.....	32
4.2.1. <i>Citlodavirus citri</i> (CCDaV) Etmeninin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma	32
4.2.2. <i>Potexvirus citriflavivirae</i> (CYVCV) Etmeninin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma.....	37
4.3. Filtre Kağıtları Üzerinden İzole Edilen Viral Etmenler Kullanılarak İndikatör Bitkilerine Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular ve Tartışma	46

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	51
5.1. <i>Citlodavirus citri</i> (CCDaV) Etmeni için Elde Edilen Sonuçlar.....	51
5.2. <i>Potexvirus citriflavivenae</i> (CYVCV) Etmeni için Elde Edilen Sonuçlar	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	63



**Turunçgil Bitkilerinde Görülen *Citlodavirus citri* (CCDaV)
ve *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) Etmenlerinin
Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları Üzerindeki Canlılık
Sürelerinin ve Kontrol Materyali Olarak
Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Nida YALÇIN

Danışman: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada turunçgil bitkilerinde görülen ve bir DNA virüsü olan *Citlodavirus citri* (CCDaV) ile bir RNA virüsü olan *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) etmenlerinin, beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde nitroselüloz ve kaba filtre kağıtları üzerindeki varlığı araştırılmıştır. Hastalık etmenleri filtre kağıtlarına farklı yöntemler kullanılarak aktarılmış ve virüslerin, hangi yöntem kullanılarak kağıtlar üzerinde ne kadar süre kalıcılığını koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca filtre kağıtları üzerinde varlığını koruduğu tespit edilen ve pozitif çıkan örnekler, indikatör turunç bitkilerine mekanik inokulasyon ile aktarılmış ve virüslerin turunç bitkilerindeki canlılığı araştırılmıştır. Yapılan PCR çalışmaları sonucu CCDaV etmenine ait CTAB ile oluşturulan 75 µl'lik TNA örneklerinin nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarında 35 gün süresince pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bitki materyalinin kağıtlar üzerine direkt temas ettirilmesi ile oluşturulan örneklerin her iki tip filtre kağıdında 21 gün süresince, bitki öz suyunun aktarılmasında ise örneklerin nitroselüloz filtre kağıdında 35 gün, kaba filtre kağıdında ise 21 gün süresince pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. CCDaV etmeninin mekanik inokulasyon ile turunç bitkilerini enfekte edip etmediğinin araştırılması sonucu her iki tip filtre kağıdının 7., 14. ve 21. güne ait örneklerinin bitkide enfeksiyon sağladığı ancak 28. ve 35. günlere ait örneklerinin bitkide enfeksiyon sağlamadığı belirlenmiştir. Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu CYVCV etmenine ait CTAB ile oluşturulan 75 µl'lik TNA örnekleri, nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarında 35 gün süresince pozitif sonuç vermiştir. Bitki materyalinin kağıtlar üzerine direkt temas ettirilmesi ile oluşturulan örnekler, nitroselüloz filtre kağıdında 35 gün süresince pozitif sonuç vermiş ancak kaba filtre kağıdında 35 gün süresince negatif sonuç vermiştir. Bitki öz suyunun kağıtlara aktarılması ile oluşturulan örneklerin her iki tip filtre kağıdında 35 gün süresince negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Mekanik inokulasyon sonucu CYVCV etmeninin her iki tip filtre kağıdına ait örneklerinin bitkide enfeksiyon sağlamadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: CCDaV, CYVCV, PCR, Nitroselüloz filtre kağıdı, Kaba filtre kağıdı.

MSc THESIS

Investigation Of The Survival Times Of *Citlodavirus citri* (CCDaV) and *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) Agents On Nitrocellulose and Coarse Filter Papers and Their Potential Usability As Control Materials

Nida YALÇIN

Advisor: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Department of Plant Protection

ABSTRACT

This study investigated the presence of *Citlodavirus citri* (CCDaV), a DNA virus, and *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV), an RNA virus, in citrus plants using nitrocellulose and coarse filter papers over a five-week period, with sampling at 7., 14., 21., 28., and 35. days. To determine the duration for which the viruses remain detectable on the filter papers, various techniques were employed to transfer the pathogens onto the filter papers. Additionally, virus-positive samples preserved on the filter papers were mechanically inoculated into indicator citrus plants to evaluate the viability of the viruses. PCR analysis revealed that 75 µl TNA samples prepared with CTAB from the CCDaV agent tested positive on nitrocellulose and coarse filter papers for up to 35 days. Samples obtained by direct paper contact with plant material yielded positive results for 21 days on both types of filter paper, while samples obtained by transferring plant sap tested positive for 21 days on coarse filter paper and 35 days on nitrocellulose filter paper. Mechanical inoculation demonstrated that the CCDaV agent from samples collected on days 7., 14. and 21. caused infection in citrus plants. However, samples from days 28 and 35 did not cause infection, yielding negative results. Over the same 35-day period, RT-PCR analysis showed that 75 µl TNA samples prepared with CTAB from the CYVCV agent tested positive on nitrocellulose and coarse filter papers. Samples obtained by direct paper contact with plant material remained positive for 35 days on nitrocellulose filter paper but tested negative on coarse filter paper. Similarly, samples prepared by transferring plant sap to papers yielded negative results on both filter paper types. Mechanical inoculation revealed that the CYVCV agent did not infect plants in any of the filter paper samples tested.

Key Words: CCDaV, CYVCV, PCR, Nitrocellulose filter paper, Coarse filter paper.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini daima üzerimde hissettiğim, mesleki ve özel hayatımda oldukça büyük bir öneme sahip olan Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının değerlendirilmesinde Jüri Üyesi olarak bulunan kıymetli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN'a ve Doç Dr. Ali ENDES'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca tecrübesi ve bilgi birikimi ile yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Merve KAZAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimlerim boyunca mesleki kariyerime katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı hocalarıma ve bu çalışmanın yürütülmesinde destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar üzerimde emeği olan ve hayatıma dokunan tüm değerli öğretmenlerime ve sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. CTAB tampon içeriği	18
Çizelge 3.2. RT Reaksiyon-1 karışım kimyasalları.....	24
Çizelge 3.3. RT Reaksiyon-2 karışım kimyasalları.....	25
Çizelge 3.4. PCR karışım kimyasalları	25
Çizelge 3.5. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları.....	26
Çizelge 3.6. CCDaV etmeninin PCR aşamasında kullanılan primer	26
Çizelge 3.7. CYVCV etmeninin PCR aşamasında kullanılan primer	26
Çizelge 4.1. CCDaV ile enfekteli örneklerin PCR çalışmaları sonucunda filtre kağıtları üzerinde gösterdiği kalıcılık süreleri	33
Çizelge 4.2. CYVCV ile enfekteli örneklerin RT-PCR çalışmaları sonucunda filtre kağıtları üzerinde gösterdiği kalıcılık süreleri	39
Çizelge 4.3. Filtre kağıtlarına CCDaV ve CYVCV patojenlerinin aktarılması sonucunda elde edilen RT-PCR/PCR sonuçları.....	45
Çizelge 4.4. Mekanik inokulasyon ile indikatör bitkilerine aktarılan örneklerin RT-PCR/PCR çalışmaları sonucu elde edilen canlılık reaksiyonları	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan nitroselüloz (Whatman) ve kaba filtre kağıdı.....	15
Şekil 3.2. Hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu gözlenen turunçgil ağaçlarından örnek alımı...	17
Şekil 3.3. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan turunç bitkileri	18
Şekil 3.4. Viral etmenlerin nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılması.....	20
Şekil 3.5. Bitki materyalinin filtre kağıtlarına direkt temas ettirilmesi	21
Şekil 3.6. Bitki öz suyunun filtre kağıtlarına aktarılması ve oda sıcaklığında kuruyan kağıtların steril zarflara yerleştirilmesi	21
Şekil 3.7. Dilüsyon yöntemi ile seyreltme işlemi.....	22
Şekil 3.8. Dilüsyon yöntemi ile seyreltilen örneklerin kaba filtre kağıtlarına aktarılması	23
Şekil 3.9. Filtre kağıtların steril makasla kesilerek mikrosantrifüj tüplerine konulması.....	24
Şekil 3.10. Mekanik inokulasyon uygulamasında indikatör olarak kullanılan turunç bitkileri.....	28
Şekil 3.11. Viral etmenlerin gövde çizme yöntemi uygulanarak turunç bitkilerine inokulasyonu	28
Şekil 4.1. CCDaV ile enfekteli bitkilerde görülen yapraklarda V şeklinde bir girinti oluşumu, kıvrırcıklaşma, deformasyon, küçülme ve kloroz şeklindeki belirtiler	29
Şekil 4.2. Araziden alınan CCDaV ile enfekteli örneklerin %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü..	30
Şekil 4.3. CYVCV ile enfekteli ağaçta görülen yapraklarda küçülme, buruşukluk, damarlarda sarı renklenme ve yaprak kenarlarında kıvrılma şeklindeki belirtiler	31
Şekil 4.4. Araziden alınan CYVCV ile enfekteli örneklerin %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	31
Şekil 4.5. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	36
Şekil 4.6. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	36
Şekil 4.7. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 21. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	36
Şekil 4.8. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 28. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	37
Şekil 4.9. CCDaV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 21. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	37
Şekil 4.10. CCDaV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 28. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.....	37
Şekil 4.11. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jeldeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.....	42

Şekil 4.12. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jeldeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.....	42
Şekil 4.13. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	42
Şekil 4.14. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü... ..	43
Şekil 4.15. CYVCV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	43
Şekil 4.16. CYVCV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	43
Şekil 4.17. CCDaV ile enfekteli kaba filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.	48
Şekil 4. 18. CCDaV ile enfekteli nitroselüloz filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.	48
Şekil 4.19. CYVCV ile enfekteli kaba filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	49
Şekil 4.20. CYVCV ile enfekteli nitroselüloz filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

°	: Derece
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
–	: Negatif
+	: Pozitif
+ss	: Positive single-stranded
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ark.	: Arkadaşları
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACMV	: African cassava mosaic virus
ASBVd	: Avocado sunblotch viroid
ASF	: African swine fever
BCTV	: Beet curly top virus
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
Bp	: Baz pair
BSMV	: Barley stripe mosaic virus
BYV	: Beet yellows closterovirus
CCDaV	: Citrus chlorotic dwarf associated virus
CEVd	: Citrus exocortis viroid
cDNA	: Complementary DNA
cm	: Santimetre
ct	: Cycle threshold
CTAB	: Cetyl trimethyl ammonium bromide
CTV	: Citrus tristeza closterovirus
CyMV	: Cymbidium mozaik potexvirus
CYVCV	: Citrus yellow vein clearing virus
da	: Dekametre
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxynucleotide triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
EACMV	: East African cassava mosaic virus
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
 FAO : Food and Agriculture Organization
 FiPSA : Filter paper sero-assay
 FTA : Flinders Technology Associates
 gr : Gram
 GRSPaV : Grapevine rupestris stem pitting associated virus
 HCL : Hydrochloric acid
 HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
 IBV : Infectious bronchitis virus
 ICP : Inductively Coupled Plasma
 L : Litre
 LIYV : Lettuce infectious yellows virus
 M : Markör (marker)
 mg : Miligram
 mL : Mililitre
 mm² : Milimetrekare
 mM : Milimolar
 MSV : Maize streak virus
 N : Negatif kontrol
 NaCl : Sodium chloride
 NCBI : National Center for Biotechnology Information
 NGS : Next Generation Sequencing
 nm : Nanometre
 NO₂ : Azotdioksit
 nPCR : nested PCR
 nt : Nükleotit
 ORSV : Odontoglossum ringspot virus
 P : Pozitif kontrol
 PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 PCR : Polymerase chain reaction
 PDA : Potato dextrose agar
 PepMV : Pepino mosaic virus
 pH : Power of hydrogen
 PPR : Peste des petits ruminants
 PPV : Plum pox potyvirus
 PTFE : Politetrafloroetilen
 PVDF : Polyvinylidene difluoride

PVP : Polivinilprolidon
PVY : Potato virus Y
RHD : Rabbit heamorajik disease
RIA : Radioimmunoassay
RIPA : Rapid immunofilter paper assay
RNA : Ribonükleik asit
rpm : Revolutions per minute
RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SLCV : Squash leaf curl virus
SO₂ : Kükürtdioksit
sp. : Species
sPAGE : Sequential polyacrylamide gel electrophoresis
spp. : Subspecies
TAE : Tris-acetate EDTA
TAGEM: Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
Taq : Termostabil polimeraz enzimi
TE : Tris-EDTA
TEPGE : Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü
TEV : Tobacco etch virus
TKM : Toplam kattı madde
TNA : Total nükleik asit
TMV : Tobacco mosaic virus
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu
TYLCV : Tomato yellow leaf curl virus
ULS : Universal linkage system
UV : Ultraviyole
ZYMV : Zucchini yellow mosaic potyvirus



1. GİRİŞ

Ülkemiz iklim özellikleri bakımından tropik ve subtropik olarak gruplandırılabilen birçok meyve grubunun yetişmesine olanak sağlamaktadır. Bu meyve grupları içerisinde, tüm dünyada ve ülkemizde turunçgil meyvelerinin ayrı bir önemi vardır.

Turunçgiller; portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*C. reticulata*), limon (*C. limon*), greylort (*C. paradisi*) vb. türler olmak üzere, farklı boyutlarda ve şekillerde, kokulu, sulu ve değişik tatlarda çok farklı meyve türlerini ve bunların çeşitlerini içeren, yaprağını dökmeyen ağaç tipine sahip *Rutaceae* Familyasının üyesi olan *Citrus* cinsine ait bir meyve grubudur (TEPGE, 2023). Çok yıllık ve soğuk iklim koşullarına dayanıksız olan turunçgiller, ekvatorun 40 derece kuzey ve güney enlemleri arasında yer alan ülkelerin tamamında yetiştirilmektedir. Turunçgiller hem değişik tür ve aromaya sahip olması hem de insan sağlığı ve beslenme üzerinde bilinen olumlu etkilerinin olması sebebiyle tüketimine önem verilen meyvelerdir. Fazla miktarda üretilip tüketilmekle birlikte ülkemizin en önemli tarımsal ihracat kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Günümüzde başta gıda sanayi olmak üzere, özellikle taze tüketimde kullanılırken, işlenmiş ve birçok yan ürünün elde edilmesinde de kullanılmaktadır.

FAO (Food and Agriculture Organization) verilerine göre 2022 yılında dünya üzerinde yaklaşık 9 milyon hektar alanda turunçgil üretimi yapılmıştır (FAO, 2024). Dünyada turunçgil üretim alanlarının %44'ünü portakal, %37'sini mandarin, %15'ini limon ve %4'ünü greylort oluşturmaktadır. Aynı yılda Türkiye 178 bin ha alanda turunçgil üretimi gerçekleştirmiştir. Daha çok meyve suyu üretiminde kullanıldığı için dünya üzerinde 2023-2024 üretim sezonunda gerçekleşen 103 milyon tonluk turunçgil üretiminin %46'sını portakal oluşturmaktadır. Dünyada en çok turunçgil ithal eden ülkeler AB (Avrupa Birliği) ülkeleri, ABD (Amerika Birleşik Devletleri) ve Rusya iken, en çok turunçgil ihraç eden ülkeler ise Güney Afrika, Türkiye, Mısır ve Çin olmuştur. Türkiye, 2024 yılında yaklaşık 7.9 milyon ton turunçgil üretimi gerçekleştirmiş ve üretimin büyük bir kısmı Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nden sağlanmıştır. Adana, Mersin, Antalya, Hatay, Muğla ve Aydın illerinde turunçgil üretiminin yoğunlaştığı görülmektedir (TEPGE, 2024).

Çoğu tarımsal ürün yetiştiriciliğinde olduğu gibi turunçgil yetiştiriciliğinde de pek çok hastalık, zararlı ve yabancı ot türlerini görmek mümkündür. Bu gruplar içerisinde tarımsal üretim açısından sorun yaratan ve kimyasal mücadelesi olmayan çeşitli bitki virüs ve viroid hastalıkları bilinmektedir. Bitki virüsleri yaygın görülen ve ekonomik açıdan önemli bitki patojenleridir. İnsanların gıda, yem ve lif kaynağı için yetiştirdiği hemen hemen tüm bitkilerin en az bir virüsten etkilenmekte olduğu ve birçok yabancı bitkinin de virüslere konukçuluk yaptığı bilinmektedir (Hull, 2009). Tarımsal ürünlerdeki kayıpların önlenmesi açısından bitki virüslerinin incelenmesi, morfolojik ve genetik özelliklerinin belirlenmesi, oluşturduğu hastalık belirtilerinin ve özellikle taşınma yollarının araştırılarak var olan vektörlerinin belirtilmesi oldukça önemlidir.

Bitki virüs hastalıkları içerisinde dünyanın ve ülkemizin belirli bölgelerinde varlığı rapor edilmiş, turunçgil yetiştiriciliğinde görülmesi halinde üreticiye sorun yaratan; ağaçların, yaprakların ve bazı durumlarda meyvelerin görünümünde şekil bozukluklarına ve önemli verim kayıplarına yol açan *Citlodavirus citri* (CCDaV: Citrus chlorotic dwarf associated virus) ve *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV: Citrus yellow vein clearing virus) etmenleri bilinmektedir. Bu etmenlerin bölgemizde bulunduğu ve yayıldığı bilinmekte olup gerek ülkemizde gerekse varlığı bilinen diğer ülkelerde önemli iki patojen olarak pek çok araştırma yapılmaktadır. Etmenlerin bu kadar önemli olması, araştırmacıları alternatif tanılama yöntemlerini bulmaya yöneltmektedir. Bahçede symptom gösteren ağaçlardan kesin tanılama yapabilmek için ağaçların farklı bölgelerinden örnek alınması ve ardından ilgili laboratuvarıda teşhis çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Alınan örneklerin laboratuvara götürülürken muhafaza koşullarının iyi ve yeterli olması ve örneğin alınmasının üzerinden çok zaman geçmeden çalışmaların yapılması, analiz sonuçlarının doğru çıkmasını sağlayacak faktörler arasındadır. Ancak araştırmacıların viral materyalleri her zaman doğadan elde etme imkanları yoktur. Bu yüzden araştırmalarda yaygın olarak kullanılan virüslerin iyi koşullarda muhafaza edilmeleri ve yapılacak çalışmalarda yeniden kullanımı için hazır hale getirildiklerinde virülensliğini koruyor olmaları, çalışmaların güvenilirliği açısından çok önemlidir.

Etmenlerin uzun dönem canlı ve stabil kalmaları yapılacak moleküler ve biyolojik çalışmalar için oldukça önemlidir. Bu durum özellikle yurt içi ve yurt dışı gibi uzak mesafelere örnek taşıma ve göndermede, canlılığını kısa sürede yitiren obligat parazit olan virüsler açısından daha büyük bir öneme sahiptir. Günümüzde araştırmacıların ihtiyaç duydukları etmenlerin materyallerine hızlı ve güvenilir bir şekilde ulaşması, gerçekleşecek zaman kaybının ve hastalık etmenlerini izole etmek için harcanacak maddi kayıpların önlenmesini sağlayacaktır. Aynı zamanda hastalık etmenleri erken teşhis edilerek mücadele yöntemleri erken uygulamaya koyulacak ve böylelikle tarımsal ürün yetiştiriciliğinde görülen zararın azalması sağlanacaktır. Araştırmacılar bu materyallere her ne şekilde ulaşırlarsa ulaşınsınlar, bu materyallerin virülensliklerini hâlâ muhafaza ediyor olmaları çok büyük önem taşımaktadır. Bu bakımdan etmenlerin bulundukları ortamlarda canlılıklarını kaybetmemeleri ve farklı karakterlere sahip olan ırklarının geri kazanımları sırasında dejenerasyon ve kontaminasyona uğramamaları önemlidir. Bütün bunlar biz virologları; viral materyallerin uzun dönem saklanması, korunması ve geri kazanımı üzerine alternatif yöntemleri araştırmaya yöneltmiştir. Araştırılan yöntemlerde ortak özellik, virüslerin izole edildikleri andaki virülensliğinin ve canlılığının uzun süre korumasının sağlanmasıdır.

Bitki hastalık etmenlerinin, doğal veya suni olarak hazırlanmış birçok besin maddelerini kullanarak farklı besi ortamlarında geliştikleri bilinmektedir. Bazı etmenlerin bitki dokularından izole edilmesi ve yetiştirilmesi çok kolay iken, bazıları konukçuya özgü olduğundan kültür ortamında bir takım ilave maddelere ihtiyaç duyarlar. Etmenlerin kültür ortamında canlılığını sürdürmek için araştırmacılar tarafından kullanılan çeşitli metotlar vardır. **Filtre kağıdı üzerinde saklama yöntemi**, bunlardan biridir. Filtre kağıdı, genellikle selüloz veya cam elyafı gibi bileşiklerden yapılan yarı

geçirgen bir kağıttır ve ince katı parçacıkları, sıvılardan veya gazlardan ayırmak için kullanılmaktadır (Interlab Laboratuvar Ürünleri, 2023). Tarihsel olarak “charta emporetica” adı verilen yumuşak ve gözenekli bir kağıt, filtre ve ambalaj kağıdı olarak eczanelerde kullanılmıştır (Anonymous, 2023). Günümüzde ise filtre kağıtları, biyolojiden kimyaya kadar birçok farklı alandaki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup laboratuvar ve endüstriyel uygulamalardaki çalışmalar için vazgeçilmezdir (Fisher Scientific, 2024).

Filtre kağıtları modern laboratuvarlarda pek çok patojeni ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan önemli araçlardır. Bu kağıtlar güçlü sıvı emme potansiyeline sahiptir ve genellikle analitik çalışmaların yapıldığı laboratuvarlarda kullanılmaktadır (Hawach Scientific, 2023c). Filtre kağıdı kullanımı diğer yöntemler ile kıyaslandığında genellikle ucuzdur, yalnızca küçük bir örnek hacmi ve gerçekleştirilmesi için minimum düzeyde teknik uzmanlık gerektirir. Kağıt üzerinde iyi performans gösterebilecek patojenlerin seçimi; örnek toplama sırasında serolojik belirteçlerin varlığı, nükleik asitlerin varlığı ve miktarı, bunların filtre kağıdı üzerindeki stabilitesi ve kullanılan elüsyon yöntemleri gibi önemli birkaç faktöre bağlıdır. Günümüzde filtre kağıdı, çalışılacak örneklerin herhangi bir merkezi laboratuvara getirilmesi veya yurt dışında farklı bir araştırmacıya iletilmesi sırasında, muhafaza edilmesine olanak sağlayan ve bilinen pek çok bitki patojeni için kullanılabilen bir malzeme haline gelmiştir. Böylelikle bu etmenlerin erişilebilirliği artmış ve çalışmalarda farklı izolatların birbirleri ile benzerlikleri veya farklılıkları daha kolay anlaşılabilir duruma gelmiştir.

Bu çalışmada, dünyanın belirli bölgelerinde oldukça öneme sahip ve ülkemizde turuncgil üretim alanlarında görülen *Citlodavirus citri* ve *Potexvirus citriflavivenae* etmenlerinin nitroselüloz ve kaba filtre kağıtları üzerinde canlılık süreleri ve kontrol materyali olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmada; CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) protokolü uygulanarak TNA (Total Nükleik Asit) ekstraksiyonu ve dilüsyon yöntemi ile oluşturulan örnekler kullanılmıştır. Ayrıca bitki materyalinin kağıtlar üzerine direkt temas ettirilmesi ve bitki öz suyunun kağıtlar üzerine damlatılması ile oluşturulan örneklerde kullanılmıştır. Elde edilen örneklerin, nitroselüloz ve kaba filtre kağıdı olmak üzere iki farklı membran üzerinde ne kadar süre canlı kalabildiği ve bu membranlar üzerinden izole edilen viral etmenlerin kontrol materyali olarak kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Virüs kelimesi Latince “**zehir veya zehirli sıvı**” kelimesinden türemiştir. Virüsler; ultra mikroskopik partiküller olup enleri 200 nm’den büyük olmayan, patojenik ırklar oluşturabilme yeteneğine sahip, kendine özgü çoğalma yöntemleri olan, DNA (Deoksiribonükleik asit) ve RNA (Ribonükleik asit)’dan yalnızca birini içeren, mitokondri, ribozom ve diğer organelleri bulunmayan, konukçu hücrelerin içerisinde biyokimyasal olarak çoğalabilen ve tek hücreli mikroorganizmalardan çok daha küçük olan patojenlerdir (Yardımcı, 2018). Çok küçük ve basit yapılı olmalarına rağmen virüsler, bir bölgede epidemik veya pandemik bir etki oluşturabilmektedir. En temel haliyle bir virüs, genomu oluşturan DNA veya RNA olmak üzere tek bir nükleik asitten ve bunu çevreleyen “**kapsid**” adı verilen bir protein kılıftan oluşmaktadır. “**Nükleokapsid**” olarak adlandırılan bu yapıya ilave olarak bazı virüslerde zarf tabakası da bulunmaktadır. Kapsitin virüse şeklini verme, virüsün hücreye tutunmasını sağlama ve virüse antijen özelliği kazandırma gibi görevleri mevcuttur. Enfeksiyon oluşturabilme yeteneğine sahip olan virüs partikülüne “**virion**”, protein kılıfı olmayan ve virüs benzeri patojenlere ise “**viroid**” adı verilmektedir. Diğer organizmalarda olduğu gibi virüsler de genetik bilgilerini nükleik asitlerinde taşımaktadır. Obligat parazit olan virüslerin çoğalmaları konukçu hücrelerin mekanizmasına bağlıdır. Hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakteriler dahil olmak üzere tüm canlı organizmalar virüslerin konukçusudur (Yardımcı, 2018).

Tarihsel araştırmalar, virüslerin neden olduğu hastalıkların milattan önceki yıllarda var olduğunu bizlere gösterir niteliktedir. Ancak virüslerin genel anlamda keşfedilmesi ve tanımlanmasına 1886 yılında Mayer tarafından Tütün mozaik virüsü (TMV) ile yaptığı çalışmalar öncülük etmiştir (Mayer, 1886). Mayer’in çalışmalarının ardından 1896 yılında Beijerinck, bakterilerin geçemediği filtrelerden geçebilen bu etmenin bulaşıcı olduğunu, hastalığın filtre edilmiş bitki öz suyundan sağlıklı bitkilere bulaşabildiğini, etmenin akıcı bir madde olduğunu ve temasla geçtiğini ortaya koyarak Tütün mozaik etmeninin bakteriyel olmadığına işaret etmek amacıyla Tütün mozaik virüsü adlandırmasını kullanmıştır (Yardımcı, 2018).

Virüslerin yapısı 1930 yıllarında açıklık kazanmaya başlamıştır. Bu duruma elektron mikroskopunun kullanılmasının ve kimyasal metotların geliştirilmesinin büyük katkısı olmuştur (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2011). Önceleri virüslerin sadece protein molekülleri olduğu varsayılmakta iken, daha sonra yapılan çalışmalar virüslerin az miktarda nükleik asit içerdiğini de göstermiştir. 1935 yılında TMV, kristalize edilen ilk bitki virüs hastalığı olmuştur. Virüslerin moleküler yapısını tanımlama ve özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmalarından dolayı 1946 yılında Stanley, Nobel ödülüne layık görülmüştür. 1967 yılında mikoplazmanın varlığını Doi ve ark., 1971 yılında viroid adı verilen subviral etmenlerin varlığını Diener, 1979 yılında riketsiyanın varlığını ise Sikora ortaya koymuştur (Yardımcı, 2018). 1977 yılında Clark ve Adams’ın geliştirdiği “Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)” nin virüslerin tanımlanmasında kullanılabilmesi ve

beraberinde yapılan pek çok çalışma günümüzde virüslerin bilimsel araştırmalara konu olmasının temelini oluşturmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde tarımsal ürün yetiştiriciliğinde ve ticari olarak oldukça öneme sahip turunçgillerin, çeşitli virüs ve viroid hastalıkları ile bulaşık olduğu bilinmektedir. Turunçgillerin bu kadar önemli tarımsal bir ürün grubu olması, geçmişten bu yana turunçgil yetiştiriciliğinde görülen virüs ve viroid hastalıklarının araştırılmasına neden olmuştur. Bugün bölgemizde turunçgil yetiştiriciliğinde karşımıza çıkan CCDaV ve CYVCV bu araştırmanın temelini oluşturmaktadır.

CCDaV dünyada ilk kez Türkiye’de ortaya çıkmış ve ülkemizde 1980 yılında Mersin ili ve ilçelerinde tespit edilmiştir (Çınar ve ark.,1993; Korkmaz ve ark.,1994; Kersting ve ark.,1996). Kısa süre içerisinde Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki Adana, Mersin ve Hatay illerine yayılmıştır. 2015 yılında Çin’de Eureka limon türünde (Guo ve ark., 2015), 2019 yılında ise Tayland’da Pomelo (*C. maxima*) türünde rapor edilmiştir (Yang ve ark., Zhang ve ark., 2019).

CCDaV; 3640 nükleotid uzunluğunda, *Geminiviridae* familyasından *Citlodavirus* cinsine ait ve tek sarmallı (ss) bir DNA virüsüdür (Locansole ve ark., 2012a). Virüs bulaşık aşı gözüyle, budama aletleriyle ve Defne beyazsineği [*Parabemisia myricae* Kuwana, (Homoptera: *Aleyrodidae*)] ile persistent veya semipersistent olarak taşınmaktadır (Korkmaz ve ark., 1994; Kersting ve ark., 1996). Bu hastalık dünyada beyazsinek ile taşınan ilk turunçgil virüs hastalığı olarak bilinmektedir (TAGEM, 2017). CCDaV ile enfekteli bitkilerde ilk belirtiler ilkbahar sürgünlerinde ortaya çıkmaktadır. En belirgin belirtiler genç yapraklarda çok tipik olan V şeklinde bir girintinin oluşumu ve yaprak damar aralarında görülen renk açılması şeklindedir. Olgun yapraklarda ise kıvrıkcıklaşma, deformasyon, ters gondol ve kayık şekli oluşumu, kloroz ve yaprak alanlarının küçülmesi şeklinde belirtiler meydana gelmektedir. Belirtiler ilkbahar ve sonbahar aylarında ve aktif sürgün dönemlerinde daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Belirtiler genelde farklı çeşitlerde ve farklı şekillerde ortaya çıkmakla birlikte, bazen aynı çeşitte ve aynı bitki üzerinde bile farklı olabilmektedir. Limon, portakal, mandarin, greylort ve tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) etmeninin ana konukçularıdır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017a).

CYVCV, dünyada ilk kez 1988 yılında Pakistan’da limon ve turunç (*C. aurantium*) ağaçlarında rapor edilmiştir (Catara ve ark., 1993). 1997 yılında Hindistan’da Etrog citron (*C. medica*), Rangpur lime (*Citrus x limonia*), turunç ve limonlarda varlığı bildirilmiştir (Ahlawat, 1997; Alshami ve ark., 2003). Türkiye’de ise 2000 yılında Adana ilinde Çukurova Üniversitesi turunçgil koleksiyon parsellerindeki limon ve turunç ağaçlarında tespit edilmiş ve eradikasyonu gerçekleştirilmiştir (Önelge, 2002). 2009 yılında ise Çin’in Yunnan eyaletinde bulunan Ruili ilindeki limon ağaçlarında varlığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2014).

CYVCV; 7529 nükleotid uzunluğunda, *Alphaflexiviridae* familyasından *Potexvirus* cinsine ait *Mandarivirus* alt cinsine bağlı, tek sarmallı ve pozitif polariteli bir RNA (+ssRNA) virüsüdür (Loconsole ve ark., 2012b). Bu etmenin turunç, limon, Etrog citron ve Rangpur lime tür ve hibritlerinde hastalık belirtileri gösterdiği ve otsu konukçularının da var olduğu bilinmektedir (Liu

ve ark., 2020). Bunlar fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), börölce (*Vigna unguiculata* L.) ve kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (Önelge ve ark., 2011), büyük ebeğümeci (*Malva sylvestris* L.), köpek üzümü (*Solanum nigrum* L.), yabani hardal (*Sinapis arvensis* L.) ve düğün çiçeği (*Ranunculus arvensis* L.) (Önelge ve ark., 2016) olarak bildirilmiştir. Etmenin 2020 yılında asmalara da bulaştığı rapor edilmiştir (Afloukou ve Önelge, 2020). Etmen tohum hariç olmak üzere üretim materyalleri, mekanik olarak budama aletleri ve yaprak bitleri [*Aphis craccivora* Koch, *Aphis spiraecola* Patch (Hemiptera: *Aphididae*)] ile yayılabilmektedir (Önelge ve ark., 2011). Özellikle kanatlı formdaki yaprak bitleri, hastalığı komşu bahçe ve tarlalardaki diğer konukçu bitkilere taşıyabilmektedir. Hastalık etmeni; yapraklarda küçülme, buruşukluk ve sarı renklenmeler, yaprak kenarlarında değişen şiddette kıvrılmalar, yaprağın alt kısmında damarlar boyunca hafif kahverengileşme, ana ve yan damarlarda uzunlamasına renk açılmaları, meyve iriliği ve kalitesinde azalma şeklinde symptom oluşturabilmektedir. Yaprak dökümüne de yol açan bu hastalık, ağaçların yapraklarındaki deformasyonlar ile birlikte meyve boyutlarında küçülme, üründe verim ve kalite yönünden azalmalara da neden olmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017b).

Bu çalışmanın temel materyali olarak kullanılan filtre kağıtları, farklı pek çok özelliği dikkate alınarak kendi içerisinde sınıflara ayrılmıştır. Üreticiye, üretim malzemesine, gözenek boyutuna, temel ağırlığına, saklama kapasitesine, şekillerine ve boyutlarına göre olmak üzere genel bir sınıflandırmanın mevcut olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte laboratuvar ortamlarında kullanılan filtre kağıtları da kendi içerisinde pek çok sınıflara ayrılmıştır. Kantitatif, kalitatif, şırınga, cam elyaf, kuvars elyaf, kartuş, PTFE (Politetrafloroetilen) ve FTA (Flinders Technology Associates) gibi filtre kağıtları laboratuvar ortamlarında kullanılan membranlar olarak karşımıza çıkmaktadır (GVS Filter Technology, 2024). Filtre kağıtlarının çeşitli sınıflarının yanı sıra, onları bilimsel çalışmalarda bu kadar öne çıkaran en önemli unsurlardan biri de yapısal özellikleridir. Filtre kağıtlarının ıslak mukavemeti, gözeneklilik, parçacık tutma, hacimsel akış hızı, uyumluluk, verimlilik, sertlik, emilim ve kapasite gibi farklı pek çok özelliği bilinmektedir (Blab Market, 2023). Kağıtların yüzeyindeki gözeneklerin yoğunluğuna, sayısına ve boyutlarına bağlı olarak farklı özelliklere sahip olmalarını sağlayan çeşitli türleri mevcuttur. Bu özellikler, bilimsel çalışmalarda hangi filtre kağıdının kullanılacağını seçerken bir yol haritası oluşturmaktadır.

Filtre kağıdının ham maddesi birbirinden farklı kağıt hamurları olarak üretilmektedir. Kağıt hamuru yumuşak ve sert ağaçlardan, lifli bitkilerden veya mineral liflerden olabilmektedir. Yüksek kaliteli filtre kağıdı elde edebilmek amacıyla çözünen kağıt hamuru ve merserize kağıt hamuru kullanılır (Cytiva Life Sciences, 2024). Kağıtların gözenekliliğini arttırmak amacıyla ise krepleme işlemi yapılmaktadır. Çoğu filtre kağıdı, küçük kağıt makineleri kullanılarak üretilmektedir (Anonymous, 2023).

Tarihsel araştırmalar filtre kağıtlarının 1750 yılında İngiltere’de devrim niteliğinde ilerlemeler kaydeden bir kağıt üreticisi olan James Whatman’a dayanmakta olduğu göstermektedir (Anonymous, 2024). Whatman tarafından 1750 yılında İngiltere’de kurulmuş olan kağıt fabrikası,

kağıt sektöründe pek çok yeniliğe öncülük etmiştir. (Vintage Paper Co, 2024). Ayrıca günümüzde bilimsel araştırmalarda ve bu çalışmada da kullanılan Whatman filtre kağıdının üretilmesini sağlamıştır.

Filtre kağıdının bilimsel bir araç olarak ilk kez 1815 yılında İsveçli kimyager Berzelius tarafından kullanıldığını bildirilmiştir (Smit ve ark., 2014). 1932 yılında Chediak, Küba'da standart teşhis testleri için kan toplanmasındaki zorlukların üstesinden gelmek amacıyla bir cam slayt üzerinde kurutulmuş kandan *Treponema pallidum* adı verilen bakteriyel etmenin sebep olduğu Frengi hastalığını tanımlamaya yönelik bir yöntem geliştirmiştir. Bu gelişmenin ardından II. Dünya Savaşı'nın başlangıcında Almanya'da Zimmermann, mikroskopik aglütinasyon testini kullanarak Frengi hastalığını teşhis etmek için parmaktan veya kulaktan alınan kanı, filtre kağıdı üzerinde kurutarak Chediak'ın geliştirdiği yöntemi uyarlamıştır. 1940 yıllarında ise Heatley, Oxford'da antimikrobiyal solüsyonların birleştirilmesi için filtre kağıdı kullanımını tanımlayarak antibiyotik duyarlılık disk testinin gerçekleştirilmesini sağlamıştır. Bu gelişmeler filtre kağıdının bilimsel çalışmalarda kullanımının yaygınlaşmasını da beraberinde getirmiştir.

1950 yılında Joe, Hollanda'nın Leiden kentinde, Endonezya'dan posta yoluyla gönderilen filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş dışkı örneğini alarak yapmış olduğu çalışmalar sonucu Şigelloz (Basil dizanterisi) hastalığını tespit etmiştir. Yapılan bu çalışma, filtre kağıdı üzerine inokule edilen hastalık etmenlerinin dünyanın farklı ülkelerine veya bölgelerine gönderilebileceğini kanıtlamış ve filtre kağıdı kullanılarak hastalık etmenlerinin teşhis edilebileceğini göstermiştir. 1963 yılında Guthrie, yeni doğan bebeklerde Fenilketonüri hastalığını teşhis etmek için filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş kanı kullanmıştır.

2014 yılında Smit ve ark., insanlarda görülen Tropikal hastalıklar (sıtma, cüzzam, verem vb.) olarak adlandırılan pek çok hastalığın tanınmasında Whatman filtre kağıtlarının klinik olarak kullanımını araştırmış ve yapılan çalışmada filtre kağıtlarının hastalıkların teşhisinde pek çok avantaj sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca insan sağlığı alanında yapılan bilimsel çalışmalarda filtre kağıdı kullanımı yaygınlaşarak genetik mutasyonların taranması, metabolitlerin kütle spektrometresi ile belirlenmesi ve çeşitli biyokimyasal analizler gibi çalışmalar için özellikle insan vücudunda bulunan mikrobiyal sıvıların filtre kağıdı üzerinde saklandığı bildirilmiştir (Smit ve ark., 2014). Bununla birlikte 2016 yılında Doni ve ark. tarafından Türkiye'nin Şanlıurfa ilinde Sıtma hastalığı olduğu şüphelenilen 153 çiftçiden parmak ucu kan örnekleri alınmış, bu kan örnekleri Whatman 31ET Chr modeli filtre kağıdına (Whatman, Piscataway, NJ) emdirilerek nPCR (nested Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmada kağıtların hava ile kurutulması sağlanmış ve laboratuvar koşullarında kağıtlar üzerinden DNA ekstraksiyonu ile analizine kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

İnsan sağlığı üzerine yapılan çalışmaların yanı sıra hayvanlar üzerinde de filtre kağıdı kullanılarak pek çok bilimsel çalışma gerçekleştirilmiştir. 2005 yılında Moscoso ve ark. kuşlarda görülen Enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV) hastalığının FTA filtre kartları üzerinden moleküler tespiti

ve serolojik çalışmaları üzerine yaptıkları araştırmada, allantoik sıvıdaki viral RNA'nın FTA kartları üzerinden RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) uygulamasının gerçekleştirilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca kartlar üzerinde uygun olmayan çevre koşulları (41°C) altında en az 15 gün saklanması durumunda moleküler karakterizasyonun mümkün olabildiğini ve IBV içeren örneklerin toplanması, taşınması ve saklanması için filtre kağıdı kullanılmasının güvenli, ucuz ve moleküler teşhis çalışmaları için yeterli olduğu bildirilmiştir.

2007 yılında Michaud ve ark. yapılacak çalışmada kullanılacak örnekleri hızlıca toplamak için filtre kağıdı kullanımını ve hastalık oluşturan virüslerin yüksek sıcaklık koşullarında uzun süre saklandığında moleküler tespitini ve genotiplenmesini açıklamak amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada biri DNA virüsü olan Afrika domuz vebası (ASP) ve diğeri RNA virüsü olan Koyun-keçi vebası (PPR) olmak üzere iki hayvan virüsü kullanılmıştır. Hastalık etmenleri ile enfekteli kan örnekleri filtre kağıdına inokule edilmiş, kağıtlar kurutulmuş ve farklı sıcaklıklarda (22-32-37°C) çeşitli süreler boyunca (9 aya kadar) saklanmıştır. Filtre kağıtları, 5 mm'lik küçük parçalar halinde kesilmiş ve PCR işlemi için doğrudan PCR tüplerine eklenmiştir. Her iki virüsten gelen nükleik asit, 32°C sıcaklık koşullarında 3 ay sonra tespit edilebilmiş ayrıca DNA virüsünün varlığı, 37°C'de muhafaza edildikten 9 ay sonra bile tespit edilebilmiştir. Filtre kağıtlarından elde edilen PCR ürünlerinin dizileri çıkarılarak filogenetik analizler yapılmış ve sonuçların yayınlanmış dizilerle tutarlı olduğu, bu durumda filtre kağıtları ile saklama yönteminin virüs genotiplemesi için kullanılabileceği bildirilmiştir.

2016 yılında Seyer ve ark. *Blastocystis spp.* tespiti amacıyla geleneksel dondurulmuş dışkı ve filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş dışkı lekeleri olmak üzere iki farklı muhafaza yöntemini kullandıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada toplam 230 dışkı örneği kullanılmış ve bu örneklerin bir kısmı -20°C'de saklanarak doğrudan dondurulmuş, geri kalan kısmı ise filtre kağıtları üzerine yaklaşık 3 cm çapında ince bir tabaka halinde yayılarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra saklanmıştır. Çalışmanın sonucunda her iki yöntemle elde edilen DNA dizileme sonuçlarının uyumunun %90.7 olduğu ve *Blastocystis spp.* teşhisinde filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş dışkı lekelerinden DNA ekstraksiyonunun, geleneksel dondurulmuş dışkı yönteminden daha hassas ve etkili olduğunu gösteren ilk çalışma olduğu bildirilmiştir.

Bununla birlikte 2020 yılında Jennings-Gaines ve ark. tarafından ABD'nin Wyoming kentinde, tavşanlarda görülen bir RNA virüsünün neden olduğu Tavşan hemorajik hastalığı (RHD), Nobuto filtre kağıdı şeridi tip 1 kullanılarak tanılanmıştır. Kağıt şeritler, tekdüze örnek almak için ideal ve ince bir yapıya sahip ve yüksek saflıkta selülozdan üretilmekte olup çalışmada 77 adet filtre kağıdı üzerine kan örneği emdirilmiştir. Ardından kağıtlar oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve alınan örneklerle 2., 4. ve 6. haftalarda RNA ekstraksiyonu uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, filtre kağıdından elde edilen karaciğer ct değerleri ile çalışmanın başlangıcında alınan karaciğer ct değerlerinin 2., 4. ve 6. haftalar arasında benzerlik gösterdiği ve filtre kağıdı ile tanılama yöntemi kullanılarak tutarlı veriler elde edildiği bildirilmiştir.

Tarihte bitki patojenleri ile ilgili filtre kağıdı üzerinde saklama yönteminin kullanıldığı ilk çalışmanın 1986 yılında Correll ve ark. tarafından *Fusarium oxysporum* izolatları üzerinde gerçekleştirildiği bilinmektedir. Bu çalışmada fungus, su agarı üzerine ya tek mikrokonidi ya da hif olarak kültüre alınmış, daha sonra PDA (Potato Dextrose Agar) üzerine transfer edilmiştir. Her bir fungus izolatu için 7 cm çapında steril Whatman No.3 filtre kağıtları PDA yüzeyine yerleştirilmiş, kütle halinde fungal materyallerin kağıt üzerine yaklaşık 1-2 gün kolonize olması sağlanmış ve kağıt diskler PDA yüzeyinden alınarak boş bir petri kabında hava yardımı ile kurutulmaya bırakılmıştır. Kağıt diskler daha sonra 2-3 mm²lik parçalar halinde steril ve ağzı vida kapaklı küçük tüplere konularak 4°C'de depolanmıştır. Bu çalışmanın öncülüğünde 2000 yılında Fong ve ark. modifiye edilmiş filtre kağıdı metodunu kullanarak *Fusarium*, *Ganoderma* ve *Marasmiellus* gibi cinsleri sağlıklı bir şekilde korumuşlardır (Dikilitaş ve ark., 2011).

1989 yılında Haber ve Knapen tarafından, bitki virüslerinin serolojik teşhisi için hızlı ve hassas bir teknik olarak Filtre Kağıdı Sero-Analizi (FiPSA) adında bir yöntem uygulanmıştır. Yapılan çalışmada bir RNA virüsü olan Arpa çizgili mozaik virüsü (BSMV) antijeni, 7 mm boyutunda Whatman No.1 filtre kağıt disklerine damlatılmış ve bitki viral antijenlerinin basit bir prosedürle filtre veya kromatografi kağıdında kolayca tespit edilebildiği belirtilmiştir. Ayrıca yöntemin ELISA veya RIA (Radioimmunoassay) gibi serolojik yöntemlere kıyasla daha basit, ucuz ve hızlı olduğu bildirilmiştir.

1997 yılında Tanaka ve ark. tarafından yapılan çalışmada Tayland'ın kuzey, orta ve güney bölgelerinde bulunan sekiz ilde mevcut olan 43 fidanlığın bulunduğu konumdaki 24 farklı cinse ait 442 orkide bitkisi, etmeni RNA olan Cymbidium mosaic virus (CyMV) ve Odontoglossum ringspot virus (ORSV) açısından Hızlı İmmün Filtre Kağıdı Metodu (RIPA) ile incelenmiş ve çalışmada Whatman GA/A modeli filtre kağıdının kullanıldığı bildirilmiştir.

Patojenler üzerine yapılan bilimsel çalışmalar içerisinde Whatman FTA filtre kartları ile yapılan araştırmalar oldukça yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. FTA kartları, DNA veya RNA analizi için biyolojik örneklerin toplanması ve oda sıcaklığında saklanması için tasarlanmış ve kimyasal olarak işlenmiş bir filtre kağıdıdır. FTA kartları, bilimsel çalışmalarda DNA örnekleme ve depolanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Carl Roth, 2024). Ayrıca bu kartların çeşitli örneklerin kolay toplanmasında, hızlı tespit edilmesinde ve diğer ülkelere uygun örneklerin iletilmesinde avantaj sağladığı bilinmektedir. Bu teknolojinin çeşitli suç davalarında (Fujita ve Kubo, 2006), insan virolojisi (Gustavsson ve ark., 2009) ve bitki patolojisi (Owor ve ark., 2007; Grund ve ark., 2010) gibi alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir.

2005 yılında Roy ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, domates yetiştiriciliğinde görülen Pepino mosaic virus (PepMV) ve üzüm yetiştiriciliğinde görülen Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) etmenlerinin FTA kartları üzerindeki doku baskılarından tespit edildiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada her iki RNA virüsünün FTA kartları üzerindeki doku baskılarından,

oda sıcaklığında aylarca saklandıktan sonra bile tespit edilebildiği ve bu durumun örnek toplama ve saklama için uygun bir prosedür olduğu belirtilmiştir.

2005 yılında Ndunguru ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; mısır, manyok, domates ve tütün bitkilerinde görülen bazı DNA ve RNA virüslerinin tespiti için FTA kartları kullanılmıştır. DNA virüsleri olarak Doğu Afrika manyok mozaik virüsü (EACMV), Afrika manyok mozaik virüsü (ACMV), Mısır çizgi virüsü (MSV) ve Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV); RNA virüsleri olarak ise Tütün mozaik virüsü (TMV), Tütün aşındırma virüsü (TEV) ve Patates Y virüsü (PVY) etmenlerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada bitkilerden elde edilen yaprak örnekleri FTA kartlara preslenmiş ve FTA kartlarından ayrıştırılan viral nükleik asitlerin PCR tabanlı teknikler ile tanısal moleküler analiz için uygun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca FTA kartlarının kontrollü koşullar altında ve sahada çalışırken viral patojenlerin ve bitki genomik dizilerinin örneklenmesi, saklanması ve alınması için pratik, ekonomik ve hassas bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

2012 yılında Chandrashekara ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Bakteriyel solgunluk hastalığı *Ralstonia solanacearum*'un moleküler karakterizasyonu için FTA kartlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada enfekte olmuş domates, patates, biber ve patlıcan bitkilerinden akan bakteri sızıntısı doğrudan FTA kartlarında toplanmış ve 5 dakika boyunca hava ile kurutulmuştur. Kartın küçük bir parçası (<1 mm) PCR çalışmasına tabi tutularak elde edilen sonuçlar geleneksel yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucu, *R. solanacearum*'un hızlı ve güvenilir tanısı için FTA kart tekniğinin uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir. 2019 yılında Burlakoti ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada da *R. solanacearum*'un moleküler karakterizasyonu için FTA kartlarının kullanıldığı ve bu yöntemin *R. solanacearum* kompleks türlerinin ve filotiplerinin tanımlanması için yararlı olacağı bildirilmiştir.

2015 yılında Ádám J. ve ark. tarafından Bulgaristan ve Macaristan'da yapılan bir çalışmada sert çekirdekli meyve ağaçlarında büyük kayıplara yol açan ve Şarka virüs hastalığı olarak bilinen Erik çiçeği virüsü (PPV)'nün tespiti ve saklama koşulları, FTA kartları kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada viral etmenin daha iyi anlaşılması için Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden 64 örnek toplanmış ve konvansiyonel posta ile Macaristan'a FTA kartları üzerinde gönderilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bir RNA virüsü olan PPV'nin FTA kartları üzerinde 7 ay boyunca saklandığı, bu örneklerin incelenmesi sırasında herhangi bir RNA bozunması yaşanmadığı ancak güvenilir bir protokol oluşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir.

2021 yılında Mathews ve ark. tarafından Kaliforniya'da Avokado güneş lekesi viroidi (ASBVd) ile enfekteli ağaçları hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, hastalık etmeninin tespiti için filtre kağıdı metodu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak meyve ve yaprak örneklerinin, büyüklük ve dallanma oranında farklılık gösteren ağaçlardan toplanması sağlanmıştır. Çalışmada RNA kaynağı olarak 1 gr öğütülmüş yaprak dokusundan elde edilen tamponlanmış ekstraktı içeren etanol kullanılmıştır. Ekstrakt, Whatman No.1 filtre kağıdının

küçük parçalarına emdirilmiş ve kağıtlar daha sonra kurutulmuştur. Hastalık etmeni RNA, steril su kullanılarak filtre kağıdından ayrıştırılmış ve standart tek tüplü RT-PCR reaksiyonunda şablon olarak kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda filtre kağıdı disklerine inokule edilen RNA'nın oldukça stabil olduğu, kağıt disklerin 1 yıldan fazla bir süre boyunca saklanabildiği ve ortaya çıkan RT-PCR ürünlerinin kalitesinde veya miktarında gözle görülür bir düşüş olmadan ortam sıcaklığında dünyanın her yerine gönderilebileceği bildirilmiştir.

Filtre kağıtlarının kullanılarak genetik materyallerin tanındığı bir diğer yöntem hibridizasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Hibridizasyon teknikleri, canlı organizmalarda bulunan hastalık etmenlerinin veya bu dokulara ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli problarla ortaya konulmasını amaçlayan bir yöntemdir. Bu sebeple "prob hibridizasyon yöntemi" olarak da tanımlanmaktadır (Arda, 2000). Prob, araştırılan nükleik asit dizisine tamamlayıcı olan ve belirteç görevi gören özgün nükleik asit parçaları olarak bilinir (Özdemir ve ark., 2015). Son yıllarda hibridizasyon tekniklerinde gerçekleşen önemli gelişmelerden dolayı testler çok daha kolay, çabuk, etkin ve güvenilir bir hale gelmiştir. Bunlar arasında yaygın kullanılan "Dot blot hibridizasyon yöntemi" karşımıza çıkmaktadır. Dot blot yöntemi, canlıların farklı hücrelerinden veya dokularından alınan örneklerde DNA, RNA veya protein gibi biyomolekülleri tanımlama süreci olarak bilinmektedir. Dot blot hibridizasyon yöntemi birçok virüs hastalığının tanınmasında, virüs ve vektör ilişkisine yönelik çalışmalarda ve hastalık epidemiyolojisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Harper ve Creamer, 1995; Flores, 1988). Bu yöntemde patolojik materyallerden mikrobiyal nükleik asit ekstrakte edilip çıkarılarak DNA ya da RNA izole edilir ve ardından konsantre edilirler. Bu aşamadan sonra örnekler iki veya beş katlı olarak dilüsyon yöntemi ile seyreltilir (Arda, 2000). Her örneğe ait dilüsyonlar, naylon veya nitroselüloz membran filtre kağıtlarının üzerine birer damla damlatılır. Burada denatürasyon işleminden geçirilerek membran üzerine emdirilir ve daha sonra uygun işaretli prob ile hibridize edilir (Anonim, 2024). Ardından filtre membran, X-ışını filmine maruz bırakılarak otoradyografide değerlendirilir. Bu yöntemde genellikle PVDF (Polyvinylidene difluoride) membranları ya da Nytran olarak adlandırılan naylon membranlar kullanılmaktadır. Bu membranların gözenek büyüklükleri ortalama 0.2 ya da 0.45 µm'dir. Bu filtreler protein ve nükleik asitler için oldukça yüksek bağlanma gücüne sahip, homojen gözenek boyutu ve dağılımı ile son derece tutarlı membranlardır (Labsan Laboratuvar Sanayi, 2024). Dolayısıyla dot blot çalışmaları için tasarlanmıştır.

1995 yılında Harper ve Creamer yaptıkları çalışmada DNA virüs hastalıkları olan Kabak yaprak kıvrılma virüsü (SLCV) ve Pancar kıvrıkcık tepe virüsü (BCTV) de dahil olmak üzere Geminivirüsler, ayrıca RNA virüs hastalıkları olan Kabak sarı mozaik potyvirusü (ZYMV), Marul bulaşıcı sarı virüsü (LIYV) ve Pancar sarısı closterovirüsü (BYV) etmenlerini dot blot hibridizasyon yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada filtre kağıdı olarak nitroselüloz ve naylon membranların kullanıldığı bildirilmiştir.

2002 yılında Korkmaz yaptığı çalışmada, Turunçgil tristeza virüsü (CTV) etmeninin izolatlarını doku blotlama tekniğini kullanarak saptamıştır. Yapılan çalışmada 10 cm²lik Bio-Rad Trans-Blot nitroselüloz membranlar (Bio Rad Laboratories, CA) kullanılmış ve blotlanmış membranlar 4°C ve 25°C'de %65 bağıl nemde saklanmıştır. Analizler, ilk blotlar yapıldıktan 1, 2, 3 ve 4 hafta sonra gerçekleştirilmiş ve 25°C'de tutulan membranların 4°C'de tutulana göre daha iyi sonuçlar verdiğini belirtilmiştir. Çalışmanın sonunda direk doku bastırmanın Turunçgil tristeza virüsünün tanısı için hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu, yöntem için küçük miktarda örneklerin yeterli olduğu ve örnek bastırılan membranların 25°C'de en az 4 hafta süreyle bozulmadan saklanabildiği belirtilmiştir. Ayrıca membranların test için diğer bölgelere güvenli bir şekilde gönderilebileceği sonucuna varılmıştır.

2003 yılında Göçmen ve ark. Turunçgil Exocortis viroidinin (CEVd) tanılanmasında RT-PCR ve enzim işaretlemesiyle dot blot hibridizasyon tekniğini kullanmışlardır. Çalışmada Biotin-ULS (Universal Linkage System) kiti, prob işaretlemesinde kullanılmış ve örnekler Nytran membran filtre kağıdı üzerine damlatılmıştır. Yapılan çalışmada filtre kağıdı üzerinde pozitif çıkan örneklerin bazılarının, diğerlerine göre daha net bir mavi renk gösterdiği, renk tonları arasındaki farklılığın prob ile hibridize olan CEVd miktarına bağlı olabileceği düşünülmüş ve negatif çıkan örneklerde problemlerin bağlanmadığı tespit edilmiştir.

2005 yılında Mahrous ve ark. turunçgil yetiştiriciliğinde görülen Stubborn hastalık etmeni olan *Spiroplasma citri*'nin izolasyonu ve tanılanmasında dot blot hibridizasyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada gerçekleştirilen hibridizasyon tekniğinde nitroselüloz filtre kağıdı kullanılmış ve hastalık etmeninin başarıyla tespit edildiği belirtilmiştir.

Yapılan bütün çalışmalar; filtre kağıdının insanlardan, hayvanlardan ve bitkilerden alınan çeşitli hastalık etmeni patojenlerin saklanması ve taşınmasında yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmesini sağlamıştır. Bilimsel çalışmalarda birbirinden farklı özelliklere sahip filtre kağıtların kullanımının yaygınlaştığı, verilen önceki çalışmalarda açıkça görülmektedir. Ayrıca filtre kağıdı üzerinde saklama yöntemi, sağladığı avantajlar neticesinde araştırmalarda gün geçtikçe daha fazla kullanılmaktadır.

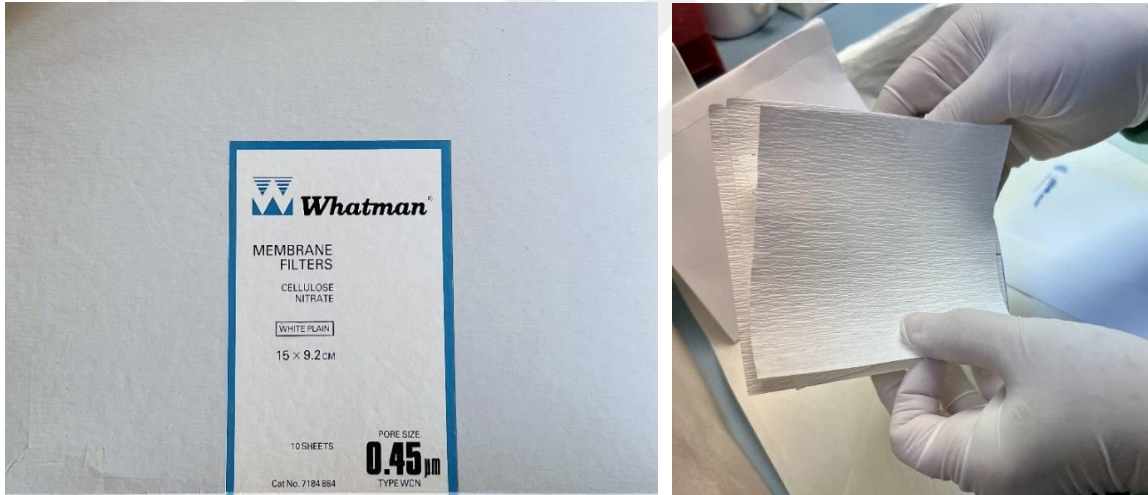


3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyalleri

Çalışmada kullanılan CCDaV ve CYVCV ile enfekteli bitki materyalleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi turunçgil parselinde bulunan, makroskobik belirtilerle değerlendirilen ve hastalıklar ile enfekteli olduğu gözlenen limon ağaçlarından alınmıştır. Örnekler ağaçların farklı bölgelerinde bulunan dal ve yaprak kısımlarından oluşmaktadır. Alınan bu örnekler naylon torbalara yerleştirilerek etiketlenmiş ve buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarına getirilmiştir. Çalışmada kullanılan kaba filtre kağıdı ile Whatman Membrane Filters markaya ait 15 x 9.2 cm boyutunda ve 0.45 µm gözenek büyüklüğündeki nitroselüloz filtre kağıdı, alüminyum folyo ve kağıtların muhafazası için kullanılan zarflar Turunçgil Virüsleri Laboratuvarından temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan nitroselüloz (Whatman) ve kaba filtre kağıdı.

3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Biyolojik indeksleme çalışmalarında CCDaV ve CYVCV etmenlerinin tanınması için indikatör bitki olarak tohumdan yetiştirilmiş turunç fidanları kullanılmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmalarında; şırınga ucu, lateks eldiven, %2'lik sodyum hipoklorit, 1X TKM (Toplam Katı Madde) tamponu çözeltisi, saf su, parafilm bantlar, viyoller ve plastik saksılar gibi çeşitli malzemeler kullanılmıştır.

3.1.3. TNA Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

TNA ekstraksiyonu çalışmalarında; Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesine bağlı araştırma arazisinden alınan bitki örnekleri, hassas terazi, mikrosantrifüj cihazı, CTAB Buffer [PVP-40 (Polivinilprolidon), Tris HCL (Hydrochloric acid), EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid),

NaCl (Sodium chloride), β -Mercaptoethanol], havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, %2'lik sodyum hipoklorit, kurutma kağıdı, 1.5 ml ve 2 ml hacimlerinde mikrosantrifüj tüpleri, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, rak, su banyosu, derin dondurucu, vorteks, kloroform : izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE (Tris-EDTA) tamponu çözeltisi, saf su cihazı gibi çeşitli materyaller ile laboratuvar aletlerinin sterilizasyonu amacıyla da otoklav ve etüv gibi ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.4. RT-PCR/PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

RT-PCR/PCR çalışmalarında; TNA ekstraksiyonu ile daha önceden elde edilmiş olan TNA örnekleri, CCDaV ve CYVCV etmenlerine özgü primerler, RNase-free su, 10X Dream Taq, dNTP (10 mM) (Deoxynucleotide triphosphate), Go Taq enzim, 5XBuffer, 0.1 M DTT (Dithiothreitol), RT enzim, PCR tüpleri, değişik hacimlerdeki pipet ve pipet uçları, vorteks, santrifüj cihazı, buz makinesi ve thermal cycler aleti gibi ekipmanlar kullanılmıştır.

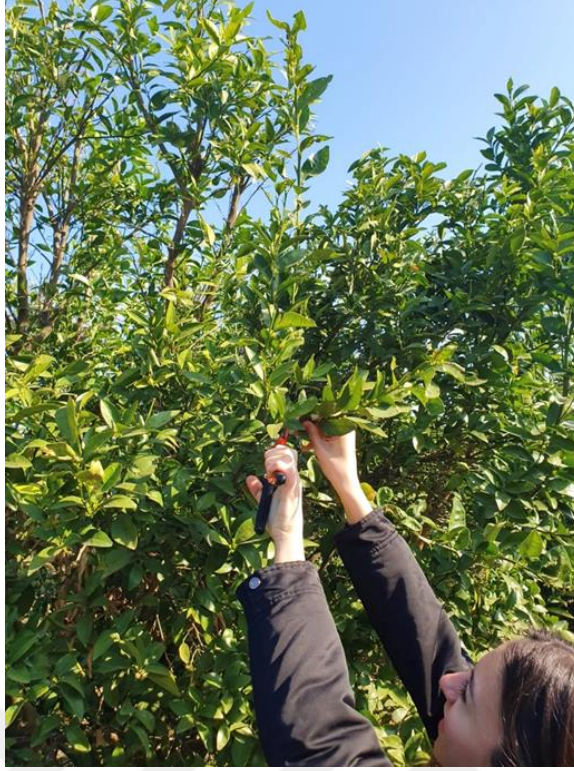
3.1.5. Agaroz Jel Elektrophorez Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Elektrophorez çalışmalarında; TAE (Tris-acetate EDTA) tampon, agar jel, elektrophorez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları 100 veya 1000 bp (baz pair) DNA markörleri kullanılmıştır. Tüm jellerin görüntülenmesi aşamasında UV (Ultraviyole) transillüminatör cihazı ve jel yıkama tamponu olarak saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür ve fotoğraflama cihazı kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. CCDaV ve CYVCV ile Enfekteli Bitki Örneklerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan turuncgil yaprak ve dal örnekleri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi turuncgil parselinde bulunan, makroskopik simptomlarca değerlendirilen ve hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu gözlenen ağaçlardan alınmıştır. Toplanan örnekler, seçilen her bir ağacın farklı yönlerinden olmak üzere üçer adet dal ve yaprak şeklinde alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilmiştir. Ardından buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turuncgil Virüsleri Laboratuvarına getirilmiş, indeksleme ve moleküler tanı çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.2. Hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu gözlenen turunçgil ağaçlarından örnek alımı.

3.2.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Turunçgil virüsleri laboratuvarından temin edilen turunç bitkilerinin tohumları; torf, perlit ve temiz toprak karışımı ile hazırlanan saksılara, her bir saksıya 3-5 adet tohum gelecek şekilde ekilmiş ve yeterli miktarda sulamadan sonra iklim odasına yerleştirilerek çimlendirilmiştir. Bitkiler yaklaşık 20 cm boyuna geldiğinde daha güçlü gelişim göstermesi amacıyla şaşırtma işlemi uygulanmış ve daha büyük saksılara alınmıştır. Yetiştirilen bitkilere düzenli aralıklar ile ihtiyaçları doğrultusunda gübreleme ve ilaçlama programı uygulanmıştır. Bitkilerin gelişiminin takibi ve indeksleme çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarına bağlı iklim odasında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan turunc bitkileri.

3.2.3. TNA Ekstraksiyonu Uygulamaları

CCDaV ve CYVCV etmenlerinin moleküler olarak tanımlanması için CTAB tampon çözeltisi kullanılarak total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır (Murray ve Thompson, 1980). CTAB Tampon içeriği çizelge 3.1’de verilmiştir. TNA ekstraksiyon çalışmaları üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada ekstraksiyon için araziden alınan, makroskobik semptomlarla değerlendirilen ve hastalık etmenleri ile enfekteli olduğu düşünülen bitki materyalleri kullanılmıştır. İkinci aşamada filtre kağıtlarına aktarılan virüslerin, kağıtlar üzerindeki varlığının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Üçüncü aşamada ise mekanik inokulasyon yapılan bitkilerin yaprak dokuları kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. CTAB tampon içeriği

Ph: 8.00	100 ml
CTAB	2.00 gr
Tris HCL	1.57 gr
EDTA	0.58 gr
NaCl	8.17 gr
PVP-40	2.00 gr
2 Mercaptoethanol %0.2	100 µl

Gerçekleştirilen TNA ekstraksiyonu çalışmaları, her bir örnek için aşağıda verilen protokole göre yürütülmüş ve belirtilen TNA ekstraksiyon aşamaları uygulanmıştır.

- Bitkisel materyallerden 500 mg miktarında örnek alınmış ve 1:10 m/v CTAB tamponu çözeltisi eklendikten sonra örnek havanlar yardımı ile homojen olacak şekilde ezilmiştir.

- 2 ml bitki öz suyu, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne pipet yardımıyla alınmıştır.
- Örnekler 65°C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilerek 60 dakika bekletilmiştir. Tüpler her 15 dakikada bir çalkalanmıştır.
- Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst sıvı fazdan 1 ml'lik kısım aktarılmıştır. Tüplere 1 ml kloroform: isoamil alkol (24:1) eklenip çalkalanarak iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst sıvı fazdan 750 µl alınıp aktarılmış ve üzerine 450 µl soğuk 2-propanol eklenip yavaşça iki kez karıştırılmıştır.
- Örnekler -20°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübe edilen örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve sıvı faz dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.
- Kalan pelet (katı faz) ise %70'lik 1 ml etanol ile yıkanmıştır.
- %70'lik etanol ile yıkanan örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve etanol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
- Örnekler kurutma kağıdı üzerinde hava ile kurutulmuştur.
- Katı kısım (pelet) 100 µl TE tampon çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.
- Ekstrakte edilen TNA kullanılıncaya kadar, -20°C sıcaklıktaki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.
- Spektrofotometre'de A260/280 nm'de konsantrasyonu belirlenmiştir.
- Yüksek kalitede nükleik asit için optimum A260/230 değeri 1.8'ye yakın olan örnekler çalışmada kullanılmıştır.

3.2.4. Virüslerin Filtre Kağıtlarına Aktarılması

RT-PCR/PCR çalışmaları sonucunda agar jel üzerinde UV transilluminator aleti ile görüntülenen ve pozitif çıkan örnekler, nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına dört farklı yöntem kullanılarak aktarılmıştır. Filtre kağıtlarına aktarım işlemi gerçekleştirilirken kağıtların altına alüminyum folyo konularak olası bir bulaşmanın önüne geçilmeye çalışılmıştır. Viral etmenlerin aktarıldığı kağıtlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, kuruduktan sonra ise steril zarf içerisine yerleştirilerek RT-PCR/PCR aşamasına kadar oda sıcaklığında bırakılmıştır. Belirtilen bölümlerde bu yöntemler detaylı bir şekilde yer almaktadır.

CTAB Protokolü Uygulanarak TNA Ekstraksiyonu ile Oluşturulan Örneklerin Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtlarına Aktarılması

Tek bir viral etmen için; nitroselüloz filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 12 adet, kaba filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 12 adet olmak üzere toplam 24 adet kesilmiş ve steril

ortamda eşit parçalara ayrılmıştır. Her bir filtre kağıdına CTAB protokolü ile oluşturulan 75 µl TNA pipet ile aktarılmış ve bu aşamada toplam 1800 µl TNA kullanılmıştır. Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarının yarısı belirlenen beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde yapılacak RT-PCR/PCR çalışmalarında, diğer yarısı ise indikatör bitkilerine uygulanacak mekanik inokulasyon yöntemi sırasında kullanılmıştır. Bu işlem CCDaV ve CYVCV için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Viral etmenlerin nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılması.

Virüsler ile Bulaşık Olduğu Bilinen Bitki Materyallerinin Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtlarına Direkt Temas Ettirilmesi

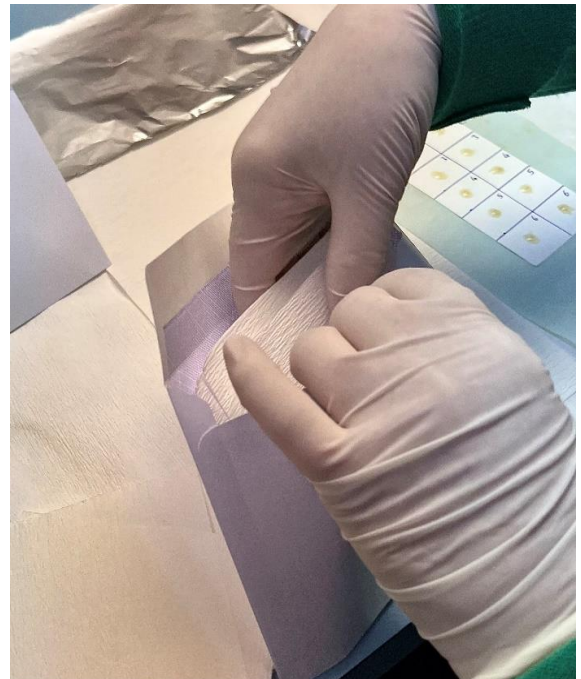
Tek bir viral etmen için; nitroselüloz filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 6 adet, kaba filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 6 adet olmak üzere toplam 12 adet kesilmiş ve steril ortamda eşit parçalara ayrılmıştır. Viral etmenler ile bulaşık olduğu bilinen bitkilerin sürgün kısımları kesilmiş ve kesilen yer henüz nemini korurken direkt olarak filtre kağıtlarına temas ettirilmiştir. Her bir kağıdının üzerine kesilen sürgünlerin nemli kısmı yaklaşık 10 kez olacak şekilde bastırılarak bitki sıvısının kağıtlara aktarılması sağlanmıştır. Bu işlem CCDaV ve CYVCV için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. Bitki materyalinin filtre kağıtlarına direkt temas ettirilmesi.

Virüsler ile Bulaşık Bitki Öz Suyunun Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtlarına Aktarılması

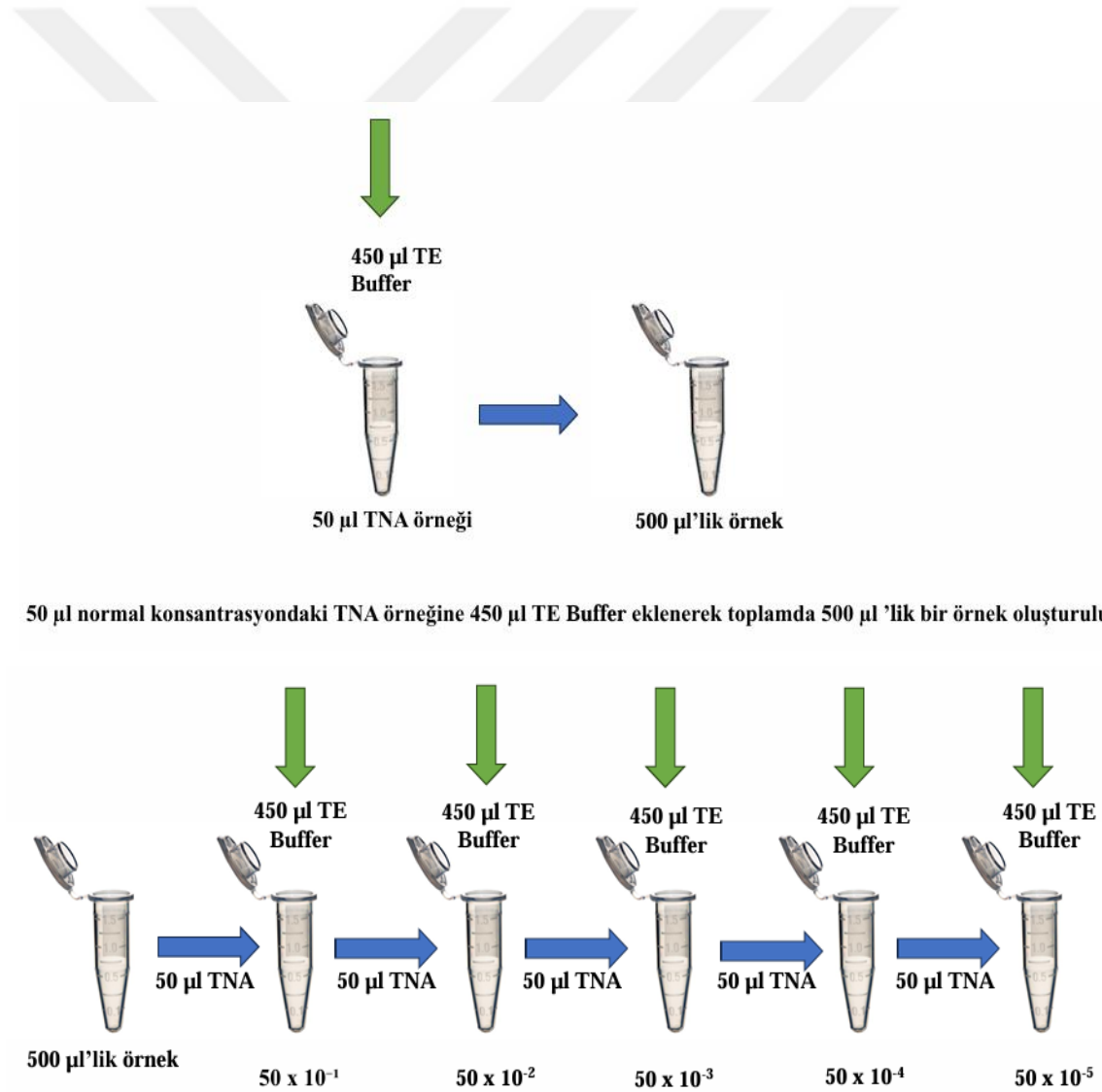
Tek bir viral etmen için; nitroselüloz filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 6 adet, kaba filtre kağıtları yaklaşık 3x3 boyutlarında 6 adet olmak üzere toplam 12 adet kesilmiş ve steril ortamda eşit parçalara ayrılmıştır. Viral etmenler ile bulaşık olduğu bilinen bitkilerin yaprak kısımları kesilmiş, kesilen yapraklar havanda dövücüler yardımı ile TE Buffer kullanılarak ezilmiş ve sonuç olarak bitki öz suyu elde edilmiştir. Elde edilen bitki öz suyu, her bir filtre kağıdına 75 µl olacak şekilde damlatılmış ve toplam 900 µl TE Buffer kullanılmıştır. Bu işlem CCDaV ve CYVCV için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



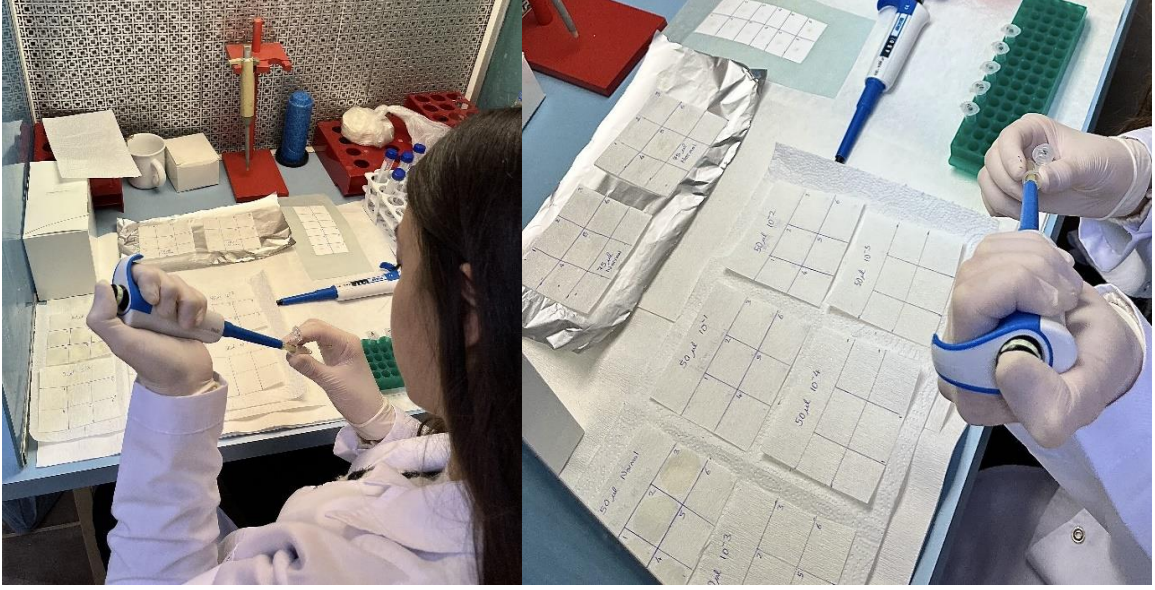
Şekil 3.6. Bitki öz suyunun filtre kağıtlarına aktarılması ve oda sıcaklığında kuruyan kağıtların steril zarflara yerleştirilmesi.

Virüslerin Kaba Filtre Kağıtlarına Dilüsyon Yöntemi ile Aktarılması

Bu yöntem, viral etmenlerin farklı konsantrasyonlarda bulunduğu TNA örneklerinin kaba filtre kağıtları üzerinde, hangi konsantrasyonda ve ne kadar süre var olabildiğinin tespit edilmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Tek bir viral etmen için; sadece kaba filtre kağıtları kullanılmış, kağıtlar yaklaşık 3x3 boyutlarında 30 adet olmak üzere kesilmiş ve steril ortamda eşit parçalara ayrılmıştır. Ardından yöntemde kullanılacak 5 adet örnek oluşturulmuştur. Çalışmada seyreltme işlemi 1:10 oranında gerçekleştirilmiş ve 50 µl normal konsantrasyondaki TNA örneğine, 450 µl TE Buffer eklenmiştir. Ardından mikrosantrifüj tüpün içerisindeki örnek vortex yardımı ile karıştırılmış, bu işlemden sonra tüpün içerisinde bulunan toplam 500 µl'lik örnekten pipet yardımı ile 50 µl çekilmiş ve diğer tüpe aktarılmıştır. Bu işlem toplam beş kez gerçekleştirilmiş ve hazırlanan her bir örnek, bir önceki örnekten konsantrasyon bakımından daha seyrek hale gelmiştir. Bu işlem CCDaV ve CYVCV için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



Elde edilen 500 µl 'lik örneğin içinden pipet yardımı ile 50 µl çekilir ve bu işlem, her bir örnek için tekrar edilir.
Şekil 3.7. Dilüsyon yöntemi ile seyreltme işlemi.



Şekil 3.8. Dilüsyon yöntemi ile seyreltilen örneklerin kaba filtre kağıtlarına aktarılması.

3.2.5. RT-PCR/PCR Uygulamaları

RT-PCR/PCR işlemleri, çalışmanın amacı gereği aşağıda belirtilen üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

- Çalışmanın başlangıç aşamasında; virüsler ile enfekteli olduğu gözlenen ve makroskobik simptom gösteren ağaçlardan alınan bitki örneklerinin, hastalıklar ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesi amacı ile RT-PCR/PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Araziden alınan ve virüsler ile enfekteli olduğu tespit edilmiş örneklerden oluşturulan TNA'ların aktarıldığı nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarında bulunan viral etmenlerin, önceden belirlenen beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde var olup olmadığının belirlenmesi amacı ile RT-PCR/PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Son olarak; indikatör bitkilerine mekanik inokulasyon uygulaması yapıldıktan sonra virüslerin turunc bitkilerinde canlılığının ve bitkide replikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespit edilmesi amacı ile RT-PCR/PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

CCDaV ve CYVCV etmenlerinin aktarıldığı nitroselüloz ve kaba filtre kağıtları; beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde RT-PCR/PCR işlemlerinde örnek olarak kullanılmıştır. Bu uygulamalar için kullanılacak her bir filtre kağıdı 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konulmuş, her bir tüpe 150 µl TE Buffer eklenerek filtre kağıtlarının üzerindeki viral etmenlerin Buffer ile karışması sağlanmış ve böylelikle RT-PCR/PCR çalışmalarında kullanılacak örnekler elde edilmiştir.



Şekil 3.9. Filtre kağıtların steril makasla kesilerek mikrosantrifüj tüplerine konulması.

CYVCV için RT-PCR Uygulaması

CYVCV için RT-PCR uygulaması, RT tamponunda cDNA sentezinin gerçekleştirildiği aşamadır. Bu işlem, aşağıda verilen çizelgelerde belirtilen kimyasallar ile karışımlar hazırlanarak her bir örnek için verilen yönteme göre yapılmıştır.

Çizelge 3.2. RT Reaksiyon-1 karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
dNTP	1 µl
Primer R	1 µl
Rnase-free su	6 µl
Örnek	4 µl
Toplam Hacim	12 µl

- Birinci iplikçik olan cDNA; 4 µl TNA, 1 µl random-hegzamer primer, 1 µl dNTP ve 6 µl nükleaz içermeyen su kullanılarak ters kopyalanmıştır.
- Elde edilen karışım thermal cycler aletine yerleştirilerek 95°C’de 3 dakika süreyle denatüre edilmiş ve ardından 10 dakika süreyle buz içerisinde soğutulmuştur.

Çizelge 3.3. RT Reaksiyon-2 karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
5XBuffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RT Enzim	0.3 µl
Rnase-free su	1.7 µl
Toplam Hacim	8 µl

- Reaksiyon-1’de hazırlanan örneklerin her birine; 4 µl 5X Buffer, 2 µl 100 mM DTT, 0.2 µl RT enzimi ve 1.8 µl nükleaz içermeyen su kullanılarak karışımlardan oluşan örnekler 8 µl olacak şekilde eklenmiştir.
- Elde edilen karışım thermal cycler aletine yerleştirilerek 42°C’de 40 dakika ve 70°C’de 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Sentez edilen cDNA’nın dörtte biri kadarı PCR aşaması için kullanılmıştır. Kullanılmayan cDNA ise –20°C’de muhafaza edilmiştir.

CCDaV ve CYVCV için PCR Uygulaması

CCDaV ve CYVCV etmenleri için PCR işlemi aşağıda verilen çizelgede belirtilen kimyasallardan karışım hazırlanarak gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için verilen yönteme göre yapılmıştır (Çizelge 3.4). Çalışmada kullanılan primerler çizelge 3.6 ve 3.7’de belirtilmiştir (Locansole ve ark., 2012a; Locansole ve ark., 2012b).

Çizelge 3.4. PCR karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
Master mix	12.5 µl
Rnase-free su	8.5 µl
Primer F (10 mM)	1 µl
Primer R (10 mM)	1 µl
Örnek	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

- Buz üzerindeki steril mikrosantrifüj tüplerinde 8.5 µl ddH₂O, Master mix Primer F (10 mM) ve Primer R (10 mM) eklenerek hazırlanmıştır.
- PCR tüplerinde 25 µl miktarında hazırlanan son hacim, thermal cycler aletine yerleştirilmiştir.

- Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PCR koşulları ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır. Bu çalışmada modifiye edilen PCR koşulları çizelge 3.5’te verilmiştir.
- Elde edilen tüm PCR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları

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

Çizelge 3.6. CCDaV etmeninin PCR aşamasında kullanılan primer

Genom Sıralama	Primer	Genom Uzunluğu (bp)	Tanılanan Bölge
3202fw	GTTCTGTGTTTCGACCCGTT	444	Manto protein
6rev	GGGATTCGCATGGATAGCTCATCAA		ORF V1 (CP)

Çizelge 3.7. CYVCV etmeninin PCR aşamasında kullanılan primer

Genom Sıralama	Primer	Genom Uzunluğu (bp)
7081fw	ACCTCACGATGGACCACGTT	479
7560rev	CAGAAAATGGAAACTGAAAGCCT	

3.2.6. Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi

Yürütülen bu çalışmada “Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi” kullanılmıştır. Bu yöntem, Önelge (1997)’ye göre modifiye edilerek yürütülmüştür. Yöntemin uygulamasında gerçekleştirilen aşamalar aşağıda belirtilmiştir.

- 100 ml 1X TAE tamponu çözeltisi ve 1.5 gram agar maddesi kullanılarak hazırlanan karışım, mikrodalga fırında 2-3 dakika süre ile agar maddesi iyi bir şekilde eriyinceye kadar ısıtılmıştır.
- Jel tepsisi düz bir zemin üzerinde ayarlanmış ve yüklenecek örnek sayısına uygun tarak yerleştirilmiştir. Hazırlanan agar karışımı jel tepsisine kabarcık oluşmayacak şekilde dökülerek agar jelin donması için oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir.

- Katılaşan jeldeki tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve ardından jel tepsi ile birlikte tankın içine yerleştirilmiştir. Daha sonra tankın içerisine jelin üzerini kapatacak şekilde 1X TAE tamponu çözeltisi dklmştir.
- Jel çukurlarının başlangıç çukuruna 8 µl 100 veya 1000 bp DNA markörü, diğerk çukurlara ise örnekler 10 µl hacminde olacak şekilde yüklenmiştir. En sondaki çukurlara pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril distile su) yüklenmiştir.
- Elektroforez aparatı elektrik akımını sağlayan güç kaynağına bağlanarak örnekler 80-100 volt ayarında 45-60 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez işlemi tamamlanan agar jel tepside ayrılarak biraz soğuması sağlandıktan sonra saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür çözeltisi içerisinde yaklaşık 10 dakika süre ile bekletilmiştir.
- Bekleme aşaması tamamlanan agar jel, UV transilluminator aleti aracılığı ile görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.7. CCDaV ve CYVCV Etmenlerinin Turunç Bitkilerine Mekanik İnokulasyon ile Aktarılması

Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtları üzerinden elde edilen örneklerin agaroz jel elektroforez görüntülemesi sonucu pozitif çıkan izolatları; tohumdan yetiştirilen turunç bitkilerine, belirlenen periyodik zamanlarda gövde çizme (stem slash) yöntemi ile inokule edilmiştir (Roistacher, 1995). Filtre kağıtlarına 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde aktarılmış ve CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulmuş örneklerin mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılması sağlanmıştır. Çalışmada belirlenen 7. günün örnekleri birinci izolat, 14. günün örnekleri ikinci izolat, 21. günün örnekleri üçüncü izolat, 28. günün örnekleri dördüncü izolat ve 35. günün örnekleri beşinci izolat olmak üzere toplamda beş izolat olarak belirlenmiştir. Her bir izolat için dört turunç bitkisi kullanılmıştır. Saksıların boyutu göz önüne alınarak her saksıda iki bitki yetiştirilmiştir. Saksılardaki bitkilerin biri inkübe edilirken kalan diğerk bitkiye ise sadece 100 µl TE Buffer zeltisi aktarılmış ve negatif kontrol amaçlı kullanılmıştır. İnokulasyon için her bir izolata 150 µl TE Buffer eklenerek vortex yardımı ile karıştırılmış, indikatör bitkilerin gövdesine iğne ile çizik atılmış ve ardından inokulasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Gövde parafin bant ile sarılarak neminin korunması sağlanmıştır.



Şekil 3.10. Mekanik inokulasyon uygulamasında indikatör olarak kullanılan turunc bitkileri.



Şekil 3.11. Viral etmenlerin gövde çizme yöntemi uygulanarak turunc bitkilerine inokulasyonu.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

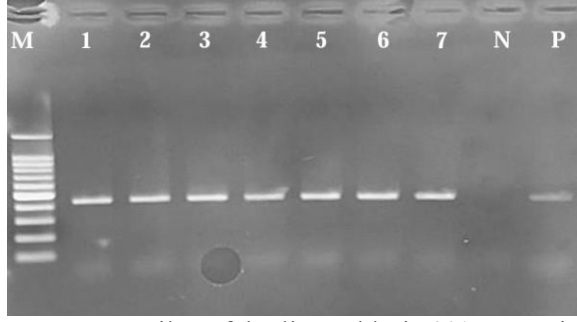
4.1. Virüsler ile Enfekteli Bahçelere Ait Hastalık Simptomları Gösteren Ağaçlardan Alınan Örneklerin RT-PCR/PCR Çalışmaları ile İlgili Bulgular ve Tartışma

Çalışmada kullanılan CCDaV ile enfekteli yaprak ve dal örnekleri, makroskobik belirtilerle değerlendirilen ve hastalık etmeni ile enfekteli olduğu gözlenen limon ağacından alınmıştır (Şekil 4.1). Tipik olarak yaprak damar aralarında renk açılması, yapraklarda V şeklinde bir girinti, kıvrıkcılaşma, deformasyon, ters gondol ve kayık şekli oluşumu, küçülme ve kloroz şeklinde belirtiler gösteren ağaçlardan örnek alınmıştır.



Şekil 4.1. CCDaV ile enfekteli bitkilerde görülen yapraklarda V şeklinde bir girinti oluşumu, kıvrıkcılaşma, deformasyon, küçülme ve kloroz şeklindeki belirtiler.

Makroskobik belirtiler gösteren ağacın yapraklarından elde edilen ve filtre kağıtlarına aktarılacak örneklerin, CCDaV ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesi amacı ile PCR çalışması yapılmıştır. Çalışmada 20 adet TNA örneği oluşturulmuş ve toplam 2000 µl TNA elde edilmiştir. Yapılan PCR çalışması sonucu, örneklerin hepsi pozitif çıkmıştır. Pozitif çıkan örneklerin bir kısmı Şekil 4.2’de verilen jel görüntüsünde belirtilmiş ve örnekler yapılacak çalışmalarda filtre kağıtlarına aktarılacak amacı ile -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.2. Araziden alınan CCDaV ile enfekteli örneklerin %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol, 1-2-3-4-5-6-7: Araziden alınan örnekler.

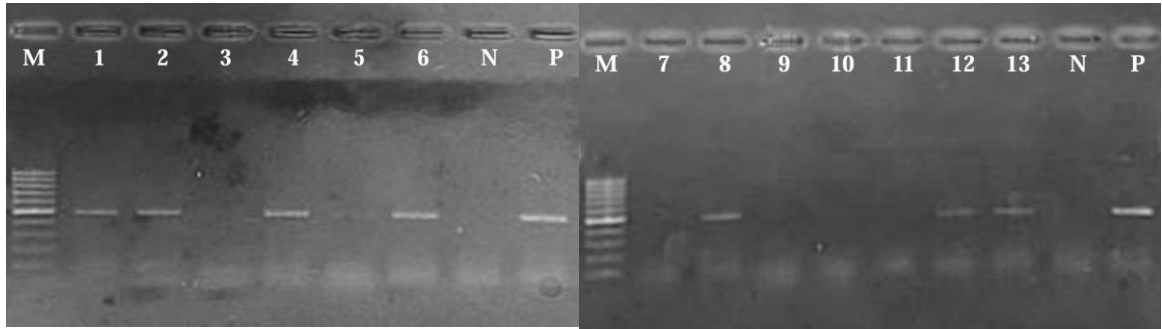
CCDaV dünyada ilk kez Türkiye’de ortaya çıkmış ve 1980 yılında Mersin ili ve ilçelerinde rapor edilmiştir (Çınar ve ark., 1993; Korkmaz ve ark., 1994; Kersting ve ark., 1996). Korkmaz ve ark. (1997) tarafından hastalığın karakteristik belirtileri; yapraklarda V şeklinde girinti, kloroz, renk açılması, deformasyon ve yaprak ayasında küçülme şeklinde belirtilmiştir. Locansole ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada CCDaV’nin hastalık belirtileri arasında kırışma, kıvrılma, ters çukurlaşma, yapraklarda deformasyon ve bozulmanın olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapraklarda küçülme ve klorotik desenler görülebileceği ve etkilenen ağaçlarda bodur bir görünüm oluşabileceği de bildirilmiştir. Bozan ve Önelge (2018) tarafından yapılan bir diğer çalışmada CCDaV’nin genç ve yaşlı yapraklarda, yaprak damar aralarında renk açılmaları ve klorotik lekelenmeler şeklinde semptom gösterdiği bildirilmiştir. Bu semptomlarla birlikte yapraklarda buruşukluk, kırışıklık, çarpıklıklar, yaprak alanının küçülmesi ve bazı yaprakların ters gondol şeklinde gelişmesinin en belirgin semptomlar arasında olduğu ve hastalığın tipik semptomlarından olan yaprak kenarlarında V şeklinde meydana gelen girintiler olduğu bildirilmiştir. Yang ve ark. (2020) tarafından Tayland’ın Nakhon kentindeki Pomelo’da CCDaV varlığı ilk kez rapor edilmiş ve greyfurt bahçelerindeki ağaçların genç sürgünlerinde yapraklarda kıvrılma, bozulma ve kloroz semptomları görüldüğü tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada araziden alınan örneklerin, literatürde belirtilen hastalık semptomları ile benzer semptomlar gösterdiği açıkça görülmektedir.

Çalışmada kullanılan CYVCV ile enfekteli yaprak ve dal örnekleri, makroskobik semptomlarca değerlendirilen ve hastalık etmeni ile enfekteli olduğu gözlenen limon ağacından alınmıştır (Şekil 4.3). Tipik olarak yapraklarda küçülme, buruşukluk, sarı renklenme, yaprak kenarlarında kıvrılma ve deformasyon şeklinde semptom gösteren ağaçlardan örnek alınmıştır.



Şekil 4.3. CYVCV ile enfekteli ağaçta görülen yapraklarda küçülme, buruşukluk, damarlarda sarı renklenme ve yaprak kenarlarında kıvrılma şeklindeki belirtiler.

Makroskobik belirtiler gösteren ağaçtan elde edilen ve filtre kağıtlarına aktarılan örneklerin, CYVCV ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada 27 adet TNA örneği oluşturulmuş ve toplamda 2700 µl TNA elde edilmiştir. Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu 19 örnek pozitif çıkarken, kalan 8 örnek ise negatif çıkmıştır. Pozitif çıkan örneklerin bir kısmı Şekil 4.4'te verilen jel görüntüsünde belirtilmiş ve örnekler yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.4. Araziden alınan CYVCV ile enfekteli örneklerin %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol, 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13: Araziden alınan örnekler.

Önelge (2003) tarafından Türkiye'de limonlarda CYVCV varlığı ilk kez rapor edilmiş ve yapraklarda buruşukluk, sarı renklenmeler, ana ve yan damarlarda uzunlamasına renk açılmaları, yapraklarda ve kenarlarında değişen şiddette kıvrılmalar, yaprağın alt kısmında damarlar boyunca hafif kahverengileşme, yaprak boyutunda küçülme ve meyve büyüklüğünde %50 oranında küçülme şeklinde belirtiler görüldüğü tespit edilmiştir. Chen ve ark. (2009) tarafından Çin'in Yunnan eyaletindeki limonda CYVCV varlığı ilk kez rapor edilmiş ve bitkilerin yaklaşık %10'luk kısmının

yan damarlarında sarı damar açılması, yaprak kırışması ve genç yaprakların eğrilmesi şeklinde belirtilen hastalığın, bu tür hastalıkların yaygın olduğu alanlarda da görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca olgun yapraklarda da belirtilen hastalıkların tespit edilmiş ve yapraklardaki hastalıkların ilkbahar ve sonbahar döneminde, yaz aylarına göre daha şiddetli olduğu ve üründe yaklaşık %20 verim kaybının ortaya çıktığı belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada araziden alınan örneklerin, literatürde belirtilen hastalık belirtileri ile benzer belirtiler gösterdiği açıkça görülmektedir.

4.2. Viral Etmenlerin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma

4.2.1. *Citlodavirus citri* (CCDaV) Etmeninin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma

Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılan CCdAV etmeninin filtre kağıtları üzerindeki kalıcılığının tespit edilmesi amacıyla, beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde, birer hafta aralıklar ile PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmaları sonucu elde edilen bulgular çizelge 4.1’de verilmiştir.

Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu viral etmenin her iki tip filtre kağıdında 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.

Hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyali filtre kağıtlarına direkt temas ettirilmiş ve yapılan PCR çalışmaları sonucu viral etmenin, nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarında 7., 14. ve 21. günlerde pozitif çıktığı tespit edilmiştir. Ancak 28. ve 35. günlerdeki izolatlara ait örneklerin her iki tip filtre kağıdında da negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu filtre kağıtlarına aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu nitroselüloz filtre kağıdına aktarılan örneklerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Ancak kaba filtre kağıdına aktarılan örneklerin 7., 14. ve 21. günlerde pozitif çıktığı; 28. ve 35. günlere ait izolatların ise yapılan PCR çalışmalarında agar jel üzerinde bant oluşturmuyarak negatif sonuç verdiği görülmüştür.

Diğer çalışmada ise dilüsyon yöntemi kullanılarak 1:10 oranında seyreltilmiş beş adet örnek oluşturulmuştur. Dilüsyon örnekleri sadece kaba filtre kağıtlarına aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu 10^{-1} ve 10^{-2} olarak belirlenen ve kaba filtre kağıtlarına aktarılan örneklerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen örneklerin ise 7., 14. ve 21. günlerde pozitif çıktığı ancak 28. ve 35. günlere ait izolatların negatif çıktığı belirlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

Çizelge 4.1. CCDaV ile enfekteli örneklerin PCR çalışmaları sonucunda filtre kağıtları üzerinde gösterdiği kalıcılık süreleri

Filtre Kağıtlarına Aktarılan Örnekler	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28. GÜN	35. GÜN
Kaba filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Kaba filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻¹ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻² dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻³ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁴ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁵ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif

Yapılan önceki çalışmalara bakıldığında; Ndunguru ve ark. (2005) tarafından; mısır, manyok, domates ve tütün bitkilerinde görülen bazı DNA virüsleri olarak Doğu Afrika manyok mozaik virüsü, Afrika manyok mozaik virüsü, Mısır çizgi virüsü ve Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü hastalıklarının tespiti için selüloz yapısındaki FTA kartları kullanılmıştır. Çalışmada bitkilerden elde edilen yaprak örnekleri FTA kartlara preslenmiş ve FTA kartlarından ayrıştırılan viral nükleik asitlerin PCR tabanlı teknikler ile tanısal moleküler analiz için uygun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca FTA kartlarının kontrollü koşullar altında ve sahada çalışırken viral patojenlerin ve bitki genomik dizilerinin örneklenmesi, saklanması ve alınması için pratik, ekonomik ve hassas bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Bitkiler ile ilgili yapılan çalışmaların yanı sıra insanlarda görülen hastalıkların teşhisinde de filtre kağıdı kullanımı oldukça yaygındır. Smit ve ark. (2014) tarafından insanlarda

görülen sıtma, cüzzam, verem vb. pek çok hastalığın tanılanmasında Whatman filtre kağıtlarının kullanımı klinik olarak araştırılmış ve yapılan çalışmada filtre kağıtlarının, hastalıkların teşhisinde pek çok avantaj sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca tanısal veya epidemiyolojik araştırmalar yapılırken uzak bölgelerde ve kaynakların yetersiz olduğu ortamlarda kan ve donmuş örnekleri muhafaza eden tesislerin çoğunlukla mevcut olmadığı, bu sebeple filtre kağıdı üzerinde örnek saklamanın yararlı ve ucuz bir yöntem olduğu ve örneklerin posta yolu ile gönderilebileceği bildirilmiştir. Doni ve ark. (2016) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, Türkiye'nin Şanlıurfa ilinde Sıtma hastalığı olduğu düşünülen 153 çiftçiden parmak ucu kan örnekleri alınmış ve bu kan örnekleri, kullanılan 31ET Chr modeli Whatman filtre kağıtlarına emdirilerek nPCR ile analiz edilmiştir. Çalışmada kağıtların hava ile kurutulması sağlanmış ve laboratuvar koşullarında, kağıtlar üzerinden DNA ekstraksiyonu ile analizine kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

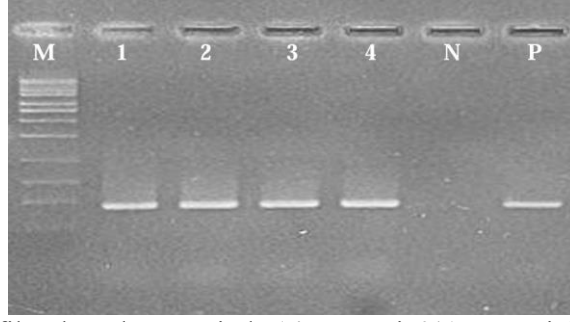
Bu çalışmada ise CCDaV etmeni, CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler şeklinde hazırlanmış ve örneklerin nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılması sonucu her iki membranda da 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Çalışmada standart bir laboratuvar ortamında uygulanan ve CTAB protokolüne göre oluşturulmuş TNA örneklerinin avantaj sağladığı ve DNA virüsünün her iki filtre kağıdı üzerinde de kalıcı olabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmada oldukça pahalı olan nitroselüloz filtre kağıdı yerine kaba filtre kağıdının da rahatlıkla kullanılabileceği görülmektedir.

Önceki çalışmalarda, viral patojenlerin yanı sıra bakteriyel patojenler ile ilgili de filtre kağıtları üzerine yapılan araştırmalar olduğu bilinmektedir. 1932 yılında Chediak tarafından yapılan bir çalışmada, cam bir slayt üzerinde kurutulmuş kandan *Treponema pallidum* adı verilen bakteriyel etmenin sebep olduğu Frengi hastalığını tanımlamaya yönelik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu gelişmenin ardından Almanya'da Zimmermann tarafından yapılan bir çalışmada Frengi hastalığını teşhis etmek için parmaktan veya kulaktan alınan kan örneği, filtre kağıdı üzerinde kurutularak Chediak'ın geliştirdiği yöntem uyarlanmıştır. 1950 yılında Joe tarafından yapılan bir çalışmada Hollanda'nın Leiden kentinde, Endonezya'dan posta yoluyla gönderilen filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş dışkı örneği alınarak *Shigella* bakterisinin neden olduğu Şigelloz hastalığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, filtre kağıdı üzerine inokule edilen hastalık etmenlerinin dünyanın farklı ülkelerine veya bölgelerine gönderilebileceğini kanıtlamış ve patojenlerin filtre kağıdı kullanılarak teşhis edilebileceğini göstermiştir. Chandrashekara ve ark. (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, bitkilerde görülen Bakteriyel solgunluk hastalığı *Ralstonia solanacearum*'un moleküler karakterizasyonu için FTA kartlarının kullanıldığı bildirilmiş ve kartın küçük bir parçası (<1 mm) PCR çalışmasına tabi tutularak elde edilen sonuçlar geleneksel yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucu *R. solanacearum*'un hızlı ve güvenilir tanısı için FTA kart tekniğinin uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada ise nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına CCDaV etmeni ile bulaşık bitki materyali direkt temas ettirilmiş ve viral etmenin her iki tip membranda da 7., 14. ve 21. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü fakat 28. ve 35. günlerde kağıtlar üzerindeki varlığını yitirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Çalışmada nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına CCDaV ile bulaşık bitki öz suyunun aktarıldığı örneklerde ise viral etmenin nitroselüloz filtre kağıdında 35 gün süresince, kaba filtre kağıdında ise 21 gün süresince kalıcılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Bu durumun, kullanılan filtre kağıtları arasındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir. Kullanılan nitroselüloz filtre kağıdının gözenek boyutu ve büyüklüğü gibi birbirinden farklı pek çok özelliğe sahip olan bir membran türü olmasıyla birlikte özellikle uzman araştırmacılar tarafından hassas filtrasyon çalışmalarında ve laboratuvar ortamlarında kullanılmaktadır. Kullanılan kaba filtre kağıdı ise standart bir laboratuvar ortamında bulunabilecek ve nitroselüloz membrana göre daha basit filtrasyon çalışmalarında kullanılacak bir membran türüdür. Genel olarak filtre kağıtlarının çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olması ve pek çok tip ve yapıda üretilmesi, farklı alanlardaki bilimsel çalışmalarda kullanılmasına olanak sağlamış ve yapılan bu çalışmada da farklı bulgular elde edilmesine sebep olmuştur. Bitki materyalinin direkt temas ettirildiği her iki tip filtre kağıdına ait örnekler için elde edilen bulgulara herhangi bir farklılık gözlenmezken, bitki öz suyunun aktarıldığı nitroselüloz membranda, etmenin daha uzun süre kaldığı ve 5 hafta boyunca belirlenen günlerde gerçekleştirilen PCR çalışmalarında pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu durumda, virüsün kalıcılığında nitroselüloz filtre kağıdının daha başarılı olduğunu söyleyebiliriz.

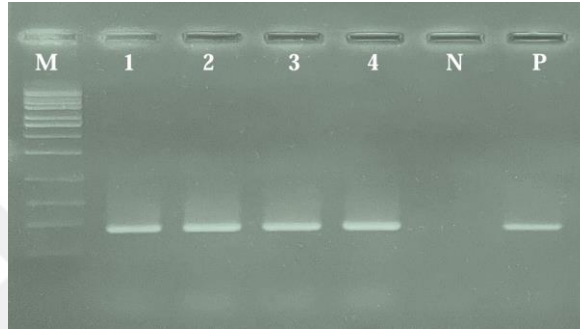
Daha önce yapılan araştırmalarda, dot blot hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda örneklerin iki veya beş katlı olarak dilüsyon yöntemi ile seyreltilerek oluşturulduğu bildirilmiştir (Arda, 2000). Mahrous ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, turuncğil yetiştiriciliğinde görülen *Spiroplasma citri*'nin izolasyonu ve tanınmasında dot blot hibridizasyon yönteminde nitroselüloz filtre kağıdı kullanıldığı ve etmenin başarıyla tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise bir DNA virüsü olan CCDaV, dilüsyon yöntemi kullanılarak kaba filtre kağıtlarına aktarılmış ve oluşturulan tüm örneklerin, her iki membran üzerinde de 7., 14. ve 21. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.9). Fakat çalışmanın 28. ve 35. günlerinde 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen örneklerin, yapılan PCR çalışmaları sonucu jel üzerinde herhangi bir bant oluşturmayarak membranlar üzerinde var olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bakterilerin DNA'larında olduğu gibi virüslerin DNA'larının da düşük bir konsantrasyonu, PCR çalışmalarında pozitif sonuç verebilmektedir. Yapılan PCR çalışmaları, viral patojenin 10^{-2} şeklinde seyreltilerek oluşturulan örneklerinin 5 hafta boyunca kaba filtre kağıtlarında kalıcılığını sürdürebildiğini ve CCDaV'nin düşük konsantrasyonlarda bile izole edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak çalışmada uygulanan yöntemlere baktığımızda, CTAB protokolü ile izole edilen TNA örneklerinin kullanıldığı ve her iki tip filtre kağıdına aktarılan virüsün kalıcılığının daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Kullanılan yöntemler ile virüsün filtre kağıtlarına aktarılması sonucu elde edilen jel görüntüleri arasında, genel anlamda bir farklılık gözlenmemiştir.



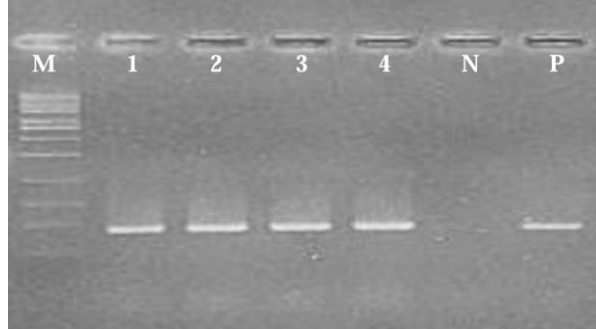
Şekil 4.5. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1-2)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA **3-4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA.



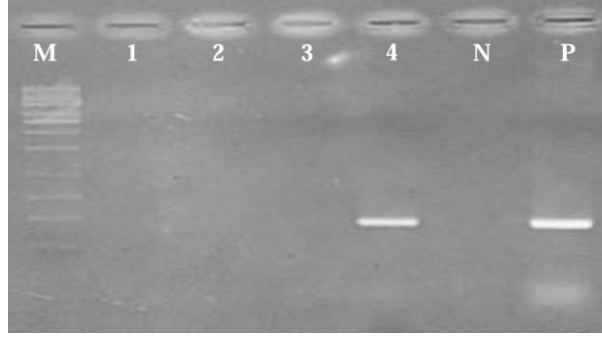
Şekil 4.6. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1-2)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA **3-4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA.



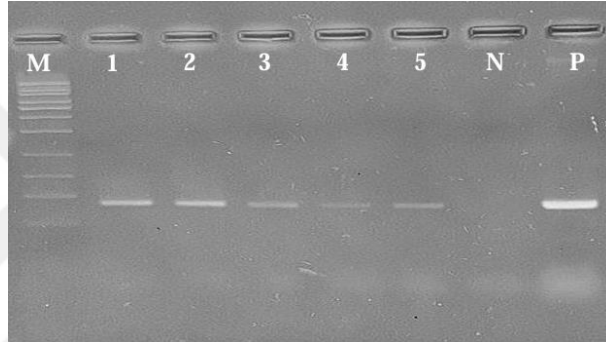
Şekil 4.7. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 21. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1)** Kaba filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **2)** Nitroselüloz filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **3)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu **4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu.

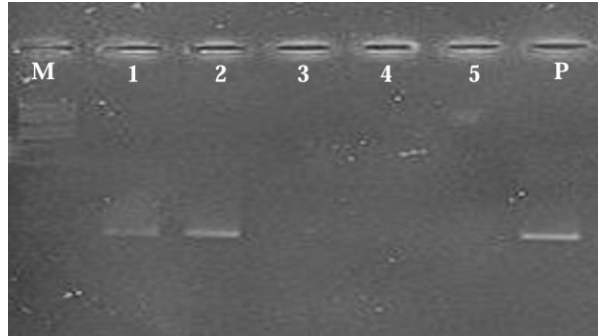


Şekil 4.8. CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 28. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1)** Kaba filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **2)** Nitroselüloz filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **3)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu **4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu.



Şekil 4.9. CCDaV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 21. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.
Dilüsyon örnekleri sırasıyla: **1)** 10^{-1} **2)** 10^{-2} **3)** 10^{-3} **4)** 10^{-4} **5)** 10^{-5}



Şekil 4.10. CCDaV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 28. güne ait %1.5 agar jeldeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, P: pozitif kontrol.
Dilüsyon örnekleri sırasıyla: **1)** 10^{-1} **2)** 10^{-2} **3)** 10^{-3} **4)** 10^{-4} **5)** 10^{-5}

4.2.2. *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) Etmeninin Aktarıldığı Nitroselüloz ve Kaba Filtre Kağıtları ile İlgili Bulgular ve Tartışma

Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılan CYVCV'nin varlığının tespit edilmesi amacıyla, beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde, birer hafta aralıklar ile RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RT-PCR çalışmaları sonucu elde edilen bulgular çizelge 4.2'de verilmiştir.

Filtre kağıtlarına CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler aktarılmış ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu örneklerin her iki tip filtre kağıdında 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.

Hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyali filtre kağıtlarına direkt temas ettirilmiş ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu; nitroselüloz filtre kağıtlarına aktarılan örneklerin, TNA örneklerinde olduğu gibi 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde kalıcılığını sürdürdüğü ve RT-PCR çalışmaları sonucunda agar jel üzerinde pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Kaba filtre kağıtlarına temas ettirilen örneklerin ise 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda agar jel üzerinde negatif sonuç verdiği ve kağıtlarda hiçbir izolatinin kalıcılık göstermediği tespit edilmiştir.

Hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu filtre kağıtlarına aktarılmış ve her iki tip filtre kağıdına ait örneklerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda agar jel üzerinde negatif sonuç verdiği ve bitki öz suyu ile oluşturulan örneklerin filtre kağıtları üzerinde kalıcılık sağlayamadığı tespit edilmiştir.

Diğer çalışmada ise dilüsyon yöntemi kullanılarak 1:10 oranında seyreltilmiş beş adet örnek oluşturulmuş ve örnekler sadece kaba filtre kağıtlarına aktarılmıştır. Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen tüm örneklerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde agar jel üzerinde pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. CYVCV ile enfekteli örneklerin RT-PCR çalışmaları sonucunda filtre kağıtları üzerinde gösterdiği kalıcılık süreleri

Filtre Kağıtlarına Aktarılan Örnekler	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28. GÜN	35. GÜN
Kaba filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻¹ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻² dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻³ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁴ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁵ dilüsyonu	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif

Yapılan önceki çalışmalara bakıldığında; Tanaka ve ark. (1997) tarafından Tayland'da bulunan 24 farklı cinse ait 442 orkide bitkisi, etmeni RNA olan Cymbidium mosaic virus ve Odontoglossum ringspot virus açısından hızlı immün filtre kağıdı metodu ile incelenmiş ve çalışmada Whatman GA/A modeli filtre kağıdı kullanıldığı belirtilmiştir. Haber ve Knapen (1989) tarafından yapılan bir diğer çalışmada Filtre Kağıdı Sero-Analizi adında bir yöntem uygulanmış ve bir RNA virüsü olan Arpa çizgili mozaik virüsü antijeni, 7 mm boyutunda Whatman No.1 filtre kağıt disklerine damlatılmıştır. Çalışmanın sonunda, bitki viral antijenlerinin basit bir prosedürle filtre kağıdında kolayca tespit edilebildiği belirtilmiş ayrıca yöntemin ELISA veya RIA gibi serolojik

yöntemlere kıyasla daha basit, ucuz ve hızlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise CYVCV etmeni, CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler şeklinde hazırlanmıştır. Örneklerin filtre kağıtlarına aktarılması sonucunda viral etmenin, her iki tip filtre kağıdında da tüm deneme süresi boyunca kalıcılığını sürdürdüğü ve ardışık 5 hafta boyunca yapılan RT-PCR çalışmalarında jel üzerinde bant oluşumu göstererek pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12).

Roy ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, domates yetiştiriciliğinde görülen Pepino mosaic virus ve üzüm yetiştiriciliğinde görülen Grapevine rupestris stem pitting associated virus etmenlerinin FTA kartları üzerindeki doku baskılarından tespit edildiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada her iki RNA virüsünün FTA kartları üzerindeki doku baskılarından, oda sıcaklığında aylarca saklandıktan sonra bile tespit edilebildiği ve bu durumun örnek toplama ve saklama için uygun bir prosedür olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ise nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına CYVCV ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyali direkt temas ettirilmiş ve yapılan analiz sonucuna göre viral etmenin nitroselüloz filtre kağıdında 35 gün süresince kalıcılığını sürdürdüğü, kaba filtre kağıdında ise 35 süresince varlık göstermediği belirlenmiştir. (Şekil 4.13 ve 4.14). Viral etmenin 35 gün süresi içerisinde nitroselüloz filtre kağıdında var olup kaba filtre kağıdında var olmaması; virüsün nitroselüloz membranda daha kalıcı olduğunu, bu membranın kullanılması ile etmenin daha uzun süre saklanabileceğini ve yurt dışına örnek gönderiminde daha başarılı olacağını ortaya koymuştur.

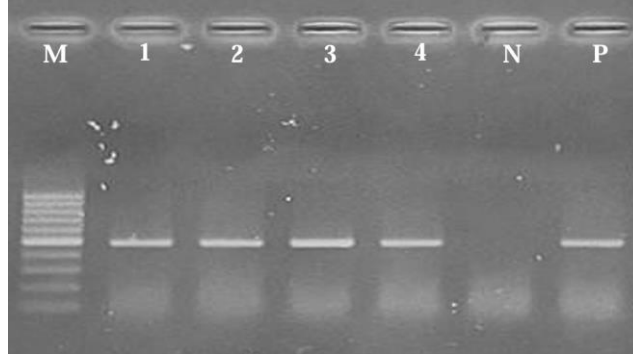
Mathews ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, Kaliforniya'daki ağaçların Avokado güneş lekesi viroidi ile enfekteli olup olmadığını hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmek amacıyla filtre kağıdı metodu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak meyve ve yaprak örneklerinin, büyüklük ve dallanma oranında farklılık gösteren ağaçlardan toplanması sağlanmış ve RNA kaynağı olarak 1 gr öğütülmüş yaprak dokusundan elde edilmiş ve tamponlanmış ekstraktı içeren etanol kullanılmıştır. Ekstrakt, Whatman No.1 filtre kağıdının küçük parçalarına emdirilmiş ve kağıtlar daha sonra kurutulmuştur. Çalışmanın sonucunda filtre kağıdı disklerine inokule edilen RNA'nın oldukça stabil olduğu, kağıt disklerin 1 yıldan fazla bir süre boyunca saklanabildiği ve ortaya çıkan RT-PCR ürünlerinin kalitesinde veya miktarında gözle görülür bir düşüş olmadan dünyanın her yerine gönderilebileceği bildirilmiştir. Ádám J. ve ark. (2015) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, Bulgaristan ve Macaristan'da sert çekirdekli meyve ağaçlarında büyük kayıplara yol açan Şarka hastalığının tespiti ve saklama koşulları FTA kartları kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada viral etmenin daha iyi araştırılması için Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden 64 örnek toplanmış ve konvansiyonel posta ile Macaristan'a FTA kartları üzerinde gönderilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Şarka hastalık etmeninin FTA kartları üzerinde 7 ay boyunca saklandığı, bu örneklerin incelenmesi sırasında herhangi bir RNA bozunması yaşanmadığı ancak güvenilir bir protokol oluşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına CYVCV ile bulaşık bitki öz suyu aktarılmış ve çalışmanın sonunda viral etmenin her iki tip membranda da 35 gün süresi içerisinde var olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14). Ayrıca CYVCV ile bulaşık bitki öz suyunun aktarıldığı filtre kağıtlarından elde edilen bulgular, filtre kağıdı ile saklama yöntemi için birbirinden farklı patojenler üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Korkmaz (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, Turunçgil tristeza virüsüne ait izolatların, doku blotlama tekniği kullanılarak saptandığı bildirilmiş ve çalışmada blotlanmış membranlar 4°C ve 25°C'de %65 bağıl nemde saklanmıştır. Analizler, ilk blotlar yapıldıktan 1, 2, 3 ve 4 hafta sonra gerçekleştirilmiş ve çalışmanın sonunda direk doku bastırmanın, Turunçgil tristeza virüsünün tanısı için hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğu ve yöntem için küçük miktardaki örneklerin yeterli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca örnek bastırılan membranların 25°C'de en az 4 hafta süreyle bozulmadan saklanabildiği bildirilmiştir.

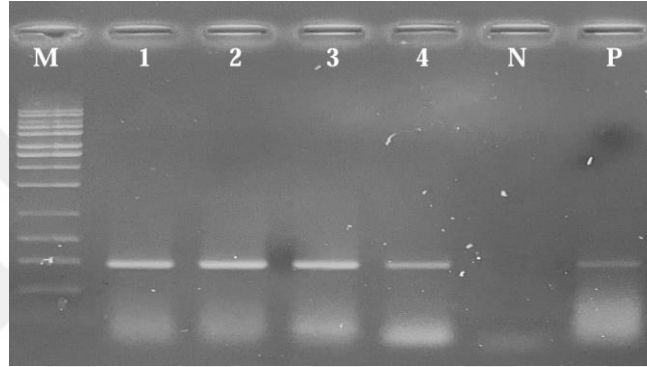
Bitkilerde görülen patojenler üzerine yapılan çalışmaların yanı sıra hayvanlarda ve insanlarda görülen hastalıkların teşhis çalışmalarında da filtre kağıtlarının kullanımı oldukça yaygındır. Moscoso ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, kuşlarda görülen Enfeksiyöz bronşit virüsünün FTA kartları üzerinden moleküler tespiti yapılmıştır. Çalışmada viral RNA'nın tespiti için FTA kartları üzerinden RT-PCR uygulamasının gerçekleştirilebileceği bildirilmiş, ayrıca viral RNA'nın kartlar üzerinde uygun olmayan çevre koşulları (41°C) altında en az 15 gün saklanması durumunda moleküler karakterizasyonun mümkün olabildiğini belirtilmiştir. Jennings-Gaines ve ark. (2020) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, ABD'nin Wyoming kentinde tavşanlarda görülen bir RNA virüsünün neden olduğu Tavşan hemorajik hastalığı, Nobuto filtre kağıt şeridi tip 1 kullanılarak tanılanmıştır. Çalışmada 77 adet filtre kağıt şeritleri üzerine kan örneği aktarılmıştır. Ardından kağıtlar oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve alınan örneklerle 2., 4. ve 6. haftalarda RNA ekstraksiyonu uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, filtre kağıtlarından elde edilen karaciğer ct değerleri ile çalışmanın başlangıcında alınan karaciğer ct değerlerinin 2., 4. ve 6. haftalar arasında benzerlik gösterdiği ve filtre kağıdı ile tanılama yöntemi kullanılarak tutarlı veriler elde edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise CYVCV etmeni, dilüsyon yöntemi kullanılarak kaba filtre kağıtlarına aktarılmış ve oluşturulan tüm örneklerin 35 gün süresince kağıtlar üzerinde var olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). Yapılan bu araştırmada kullanılan filtre kağıdı türleri, mevcut koşullar, viral etmenlerin konsantrasyonu ve virüslerin farklı yöntemler kullanılarak filtre kağıtlarına aktarılması gibi birbirinden farklı pek çok değişkenin mevcut olduğu görülmektedir. Değişkenlerin varlığı çalışmanın çok yönlü olmasına ve birbirinden farklı pek çok veri elde edilmesine olanak sağlamıştır.



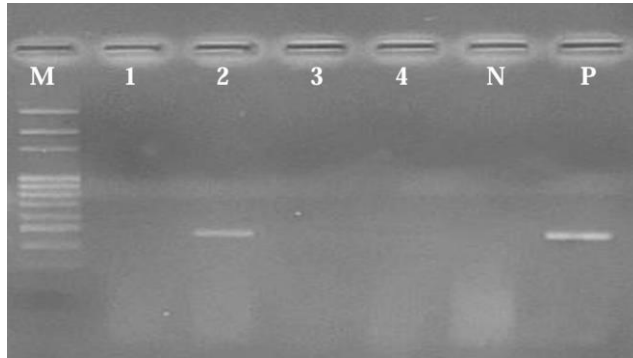
Şekil 4.11. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jeldeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1-2)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA **3-4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA.



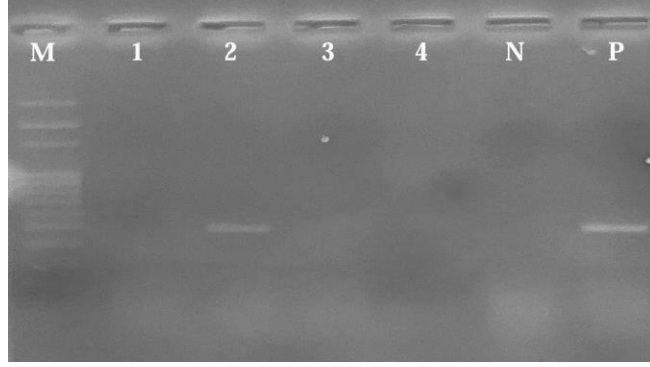
Şekil 4.12. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jeldeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1-2)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA **3-4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CTAB ile oluşturulan 75 µl TNA.



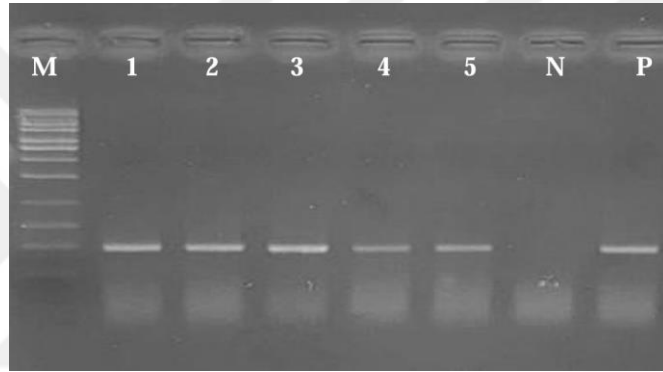
Şekil 4.13. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1)** Kaba filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **2)** Nitroselüloz filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **3)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu **4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu.



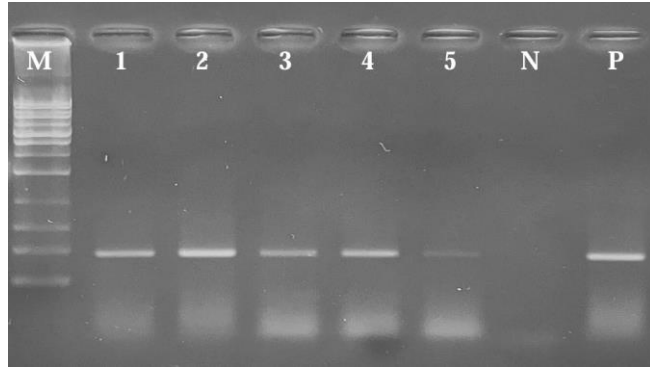
Şekil 4.14. CYVCV'nin filtre kağıtları üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Örnekler sırasıyla: **1)** Kaba filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **2)** Nitroselüloz filtre kağıdına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyalinin direkt teması **3)** Kaba filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu **4)** Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu.



Şekil 4.15. CYVCV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 14. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Dilüsyon örnekleri sırasıyla: **1)** 10^{-1} **2)** 10^{-2} **3)** 10^{-3} **4)** 10^{-4} **5)** 10^{-5}



Şekil 4.16. CYVCV'nin kaba filtre kağıdı üzerinde 35. güne ait %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü. M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol.

Dilüsyon örnekleri sırasıyla: **1)** 10^{-1} **2)** 10^{-2} **3)** 10^{-3} **4)** 10^{-4} **5)** 10^{-5}

Bu çalışmada filtre kağıtları üzerinde canlılık sürelerinin araştırıldığı her iki turuncgil virüs etmeni, birbirleri ile karşılaştırılıp özetlenmiştir (Çizelge 4.3). Her iki viral etmen CTAB protokolü ile izole edilip nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarıldığında, membranlar üzerinde 35 gün süresince pozitif kalarak varlığını sürdürmüştür. Kaba filtre kağıtlarına bitki materyalinin direkt teması ile oluşturulan örneklerde CCDaV'nin 21 gün süresince membranlar üzerindeki varlığını sürdürdüğü belirlenmiş fakat CYVCV'nin 35 gün süresince hiçbir izolatinin pozitif sonuç vermediği görülmüştür. Nitroselüloz filtre kağıtlarına bitki materyalinin direkt teması ile oluşturulan örneklerde CCDaV'nin 21 gün süresince, CYVCV'nin ise 35 gün süresince membranlar üzerindeki varlığını sürdürdüğü görülmüştür. Kaba filtre kağıtlarına bitki öz suyunun aktarılması ile oluşturulan örneklerde CCDaV'nin 21 gün süresince pozitif sonuç verdiği, CYVCV'nin ise 35 gün süresince hiçbir izolatinin pozitif sonuç vermediği görülmüş ve elde edilen bu sonuç, kaba filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması ile oluşturulan örnekler ile benzerlik göstermiştir. Nitroselüloz filtre kağıtlarına bitki öz suyunun aktarılması ile oluşturulan örneklerde CCDaV'nin 35 gün süresince membranlar üzerinde pozitif sonuç verdiği, CYVCV'nin ise negatif sonuç verdiği görülmüştür. Viral etmenlerin kaba filtre kağıtlarına dilüsyon yöntemi ile aktarıldığı çalışmada 10^{-1} ve 10^{-2} olarak belirlenen örneklerin 35 gün süresince membranlar üzerindeki varlığını koruduğu belirlenmiştir. 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen örneklerde ise CCDaV'nin filtre kağıtları üzerinde 21 gün süresince, CYVCV'nin ise 35 gün süresince varlığını koruduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Filtre kağıtlarına CCDaV ve CYVCV patojenlerinin aktarılması sonucunda elde edilen RT-PCR/PCR sonuçları

Filtre Kağıtlarına Aktarılan Örnekler	Viral Etmen	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28. GÜN	35. GÜN
Kaba filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	CCDaV	+	+	+	+	+
	CYVCV	+	+	+	+	+
Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılan CTAB ile oluşturulmuş 75 µl'lik TNA	CCDaV	+	+	+	+	+
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	–	–	–	–	–
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki materyalinin direkt teması	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	–	–	–	–	–
Nitroselüloz filtre kağıdına bitki öz suyunun aktarılması	CCDaV	+	+	+	+	+
	CYVCV	–	–	–	–	–
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻¹ dilüsyonu	CCDaV	+	+	+	+	+
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻² dilüsyonu	CCDaV	+	+	+	+	+
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻³ dilüsyonu	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁴ dilüsyonu	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	+	+	+	+	+
Kaba filtre kağıdına aktarılan 10 ⁻⁵ dilüsyonu	CCDaV	+	+	+	–	–
	CYVCV	+	+	+	+	+

(+ : pozitif, – : negatif)

4.3. Filtre Kağıtları Üzerinden İzole Edilen Viral Etmenler Kullanılarak İndikatör Bitkilerine Yapılan Mekanik İnokulasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular ve Tartışma

Nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarının RT-PCR/PCR çalışmalarından sonra belirlenen örnekler, mekanik inokulasyon yöntemi ile indikatör olarak kullanılan turunc bitkilerine aktarılmıştır. Buradaki amaç; filtre kağıtları üzerinde kalıcılığını sürdürdüğü tespit edilen izolatların, indikatör bitkilerinde replike olup olmayacağını ve canlılık gösterip göstermeyeceğinin tespit edilmesidir.

Mekanik inokulasyon uygulamasında; nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarına aktarılmış olan ve CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler kullanılmıştır. Kağıtlar üzerinden izolasyonu sağlanan viral etmenler, çalışmada kullanılan indikatör turunc bitkilerine gövde çizme yöntemi ile aktarılmıştır. Bu uygulamadan sonra her iki viral etmene ait bitkiler iklim odasına alınarak takip edilmiştir. Elde edilen bulgular çizelge 4.4'te belirtilmiştir. CCDaV etmenine ait örneklerin, indikatör turunc bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile aktarılması sonucunda her iki tip filtre kağıdının 7., 14. ve 21. güne ait örneklerinin bitki içerisinde enfeksiyon sağladığı ve pozitif sonuç verdiği; 28. ve 35. günlere ait örneklerinin ise bitkide enfeksiyon sağlayamadığı ve negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. CYVCV etmenine ait örneklerin ise mekanik inokulasyon yöntemi ile bitkiyi enfekte edip etmediğinin araştırılması sonucunda yapılan RT-PCR çalışmaları negatif sonuç vermiş ve viral patojenin bitkide enfeksiyon sağlayamadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Mekanik inokulasyon ile indikatör bitkilerine aktarılan örneklerin RT-PCR/PCR çalışmaları sonucu elde edilen canlılık reaksiyonları

Mekanik İnokulasyonda Kullanılan Örnekler	7. GÜN	14. GÜN	21. GÜN	28. GÜN	35. GÜN
Kaba filtre kağıdına aktarılmış CCDaV ile enfekteli 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CCDaV ile enfekteli 75 µl'lik TNA	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
Kaba filtre kağıdına aktarılmış CYVCV ile enfekteli 75 µl'lik TNA	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış CYVCV ile enfekteli 75 µl'lik TNA	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif

Viral etmenler bazen bitkilerde gözle görülebilecek makroskobik belirtiler göstermese de bitki içerisinde varlığını sürdürebilmekte ve replikasyonu sağlayabilmektedir. Bitkilerde hastalık belirtilerinin gözle görülmemesi böyle durumlarda yanıltıcı olabilir. Ancak hastalığın var olduğu konukçuların latent enfeksiyonları üzerine yapılan bir araştırma, bazı bitkilerin herhangi bir belirgin belirtiler olmaksızın virüslerle enfekte olabileceğini ortaya koymuştur (Roossinck, 2005, 2010;

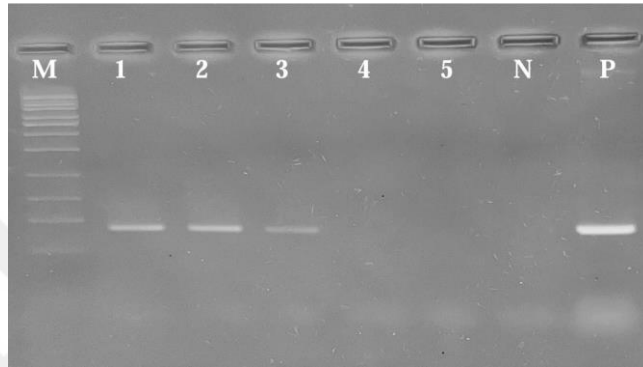
Richert-Pöggeler ve Minarovits, 2014). Metagenomik bir yaklaşım kullanılarak yapılan yeni çalışmalar, virüslerin asemptomatik enfeksiyonlarının doğadaki varlığının, bitkilerin ilk kez ortaya çıktığı zaman kadar eski ve yaygın bir olay olabileceğini ortaya koymuştur (Kreuze ve ark., 2009; Barba ve ark., 2014; Stobbe ve Roossinck 2014; Kamitani ve ark., 2016; Pooggin, 2018; Zhang ve ark., 2018). Bu durumda yanlış sonuçlara ulaşmamak ve bitkilerin hastalıklar ile enfekteli olup olmadığının net olarak anlaşılması amacıyla RT-PCR/PCR, metagenomik analizler veya NGS (Next Generation Sequencing) gibi detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi daha doğru sonuçlara ulaşmada başarı sağlayacaktır.

Yapılan PCR çalışmaları sonucu agar jel üzerindeki bantların varlığı, CCDaV etmeninin 7., 14. ve 21. güne ait örneklerinin turunc bitkilerinde enfeksiyon sağladığını göstermektedir (Şekil 4.17 ve 4.18). RT-PCR çalışmalarında ise elde edilen bulgular, CYVCV etmeninin kağıtlar üzerinden izolasyonu sağlanarak turunc bitkilerine aktarıldığında enfeksiyon sağlayamadığı ortaya koymaktadır (Şekil 4.19 ve 4.20). Her iki viral patojen için elde edilen bulgular arasında görülen bu farklılık; CCDaV etmeninin bir DNA, CYVCV etmeninin ise bir RNA virüsü olması ile açıklanabilir. Michaud ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, kullanılacak örnekleri hızlıca toplamak için filtre kağıdı kullanımını ve hastalık oluşturan virüslerin yüksek sıcaklık koşullarında uzun süre saklandığında moleküler tespitini ve genotiplenmesini açıklamak amacıyla bir araştırma yapılmıştır. Çalışmada biri DNA virüsü olan Afrika domuz vebası ve diğeri RNA virüsü olan Koyun-keçi vebası olmak üzere iki hayvan virüsü kullanılmış ve viral patojenler ile enfekteli kan örnekleri filtre kağıdına inokule edilmiştir. Ardından kağıtlar kurutulmuş ve farklı sıcaklıklarda ve çeşitli süreler boyunca saklanmıştır. Çalışmanın sonunda her iki virüsten gelen nükleik asidin 32°C sıcaklık koşullarında 3 ay sonra tespit edilebildiği bildirilmiş ayrıca DNA virüsünün varlığının 37°C'de muhafaza edildikten 9 ay sonra bile tespit edilebildiği ve filtre membranlar üzerinde RNA'ya göre daha uzun süre saklanabildiği belirtilmiştir. Ádám J ve ark. (2015) tarafından yapılan bir diğerk çalışmada FTA kartlarının bitkilerde görülen RNA virüslerinin toplanması ve tespiti için uygun olduğu ancak RNA'nın bozunması nedeniyle oda sıcaklığında saklanması için uygun olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca RNA bozunmasının nükleik asidi içeren hücrelere ve aynı zamanda bitki dokusunun türüne bağlı olarak görüldüğü de yapılan çalışmada bildirilmiştir.

Yapılan bu çalışmada da bir DNA virüsü olan CCDaV, filtre kağıtları üzerinden izolasyonu sağlanmış ve mekanik inokulasyon sonucu bitki içerisinde replikasyon sağlayarak canlılık göstermiştir. Fakat bir RNA virüsü olan CYVCV, filtre kağıtları üzerinden izolasyonu sağlanıp turunc bitkilerine aktarıldığında varlık gösterememiş ve bitkide enfeksiyon sağlayamamıştır.

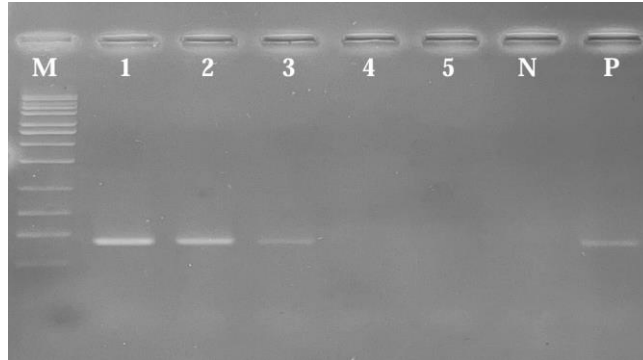
Bitkilerde görülen DNA ve RNA virüslerinin kalıcılıkları; virüsün türüne, genetik yapısına, enfekte olduğu bitkideki davranışına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. DNA virüslerinin genetik materyalleri, RNA virüslerine kıyasla daha stabil olduğu için çevresel koşullara daha fazla dayanıklılık göstermektedir. Ancak RNA virüsleri, çevresel koşullara karşı daha hassastır. Bununla birlikte RNA virüslerinin hızlı bir şekilde mutasyon geçirerek konukçulara uyum sağlama

konusunda avantajlı olması, viral etmenin canlılığını korumasına yardımcı olabilmektedir. Virüslerin en önemli taşınma yollarından biri de vektör böcekler olarak karşımıza çıkmaktadır. DNA virüslerinin RNA virüslerine kıyasla vektörlerde kalıcılığı genellikle daha uzun sürmektedir. Bu durum DNA virüslerinin daha fazla yayılım göstermesine ve daha uzun süre varlığını korumasına sebep olmaktadır. Genel olarak DNA virüslerinin daha stabil, çevresel koşullara daha dayanıklı ve bitkide uzun süreli kalıcı enfeksiyonlar oluşturabildiği; RNA virüslerinin ise daha az stabil ve hızlı mutasyon geçirme yeteneği sebebiyle çevresel koşullara karşı daha hassas olduğu belirlenmiştir (ICTV, 2024).



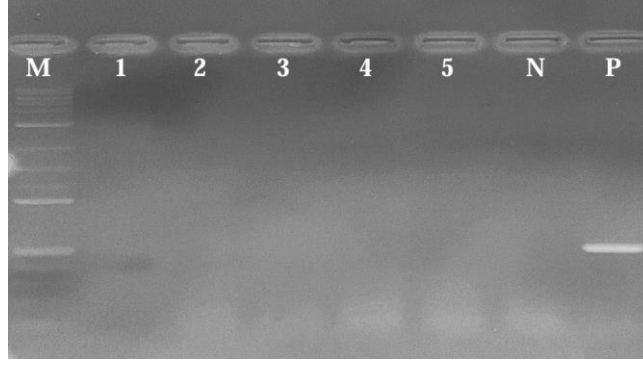
Şekil 4.17. CCDaV ile enfekteli kaba filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.

M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol. Kaba filtre kağıdına aktarılmış 75 µl'lik TNA örnekleri sırasıyla: 1) 7. gün 2) 14. gün 3) 21. gün 4) 28. gün 5) 35. gün



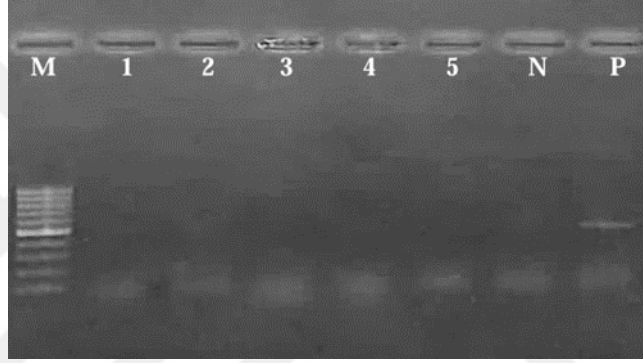
Şekil 4. 18. CCDaV ile enfekteli nitroselüloz filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 444 nt baz seviyesi görüntüsü.

M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol. Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış 75 µl'lik TNA örnekleri sırasıyla: 1) 7. gün 2) 14. gün 3) 21. gün 4) 28. gün 5) 35. gün



Şekil 4.19. CYVCV ile enfekteli kaba filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.

M: 1000 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol. Kaba filtre kağıdına aktarılmış 75 µl TNA örnekleri sırasıyla: **1)** 7. gün **2)** 14.gün **3)** 21. gün **4)** 28. gün **5)** 35. gün



Şekil 4.20. CYVCV ile enfekteli nitroselüloz filtre kağıtları kullanılarak indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyon sonucu elde edilen bulguların %1.5 agar jel üzerindeki 479 nt baz seviyesi görüntüsü.

M: 100 bp markör, N: negatif kontrol, P: pozitif kontrol. Nitroselüloz filtre kağıdına aktarılmış 75 µl’lik TNA örnekleri sırasıyla: **1)** 7.gün **2)** 14. gün **3)** 21. gün **4)** 28. gün **5)** 35. gün



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada turunçgil bitkilerinde görülen ve bir DNA virüsü olan *Citlodavirus citri* ile bir RNA virüsü olan *Potexvirus citriflavivenae* etmenlerinin, beş haftalık zaman içerisindeki 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde nitroselüloz ve kaba filtre kağıtları üzerindeki varlığı araştırılmıştır. Hastalık etmenleri filtre kağıtlarına farklı yöntemler kullanılarak aktarılmış ve viral etmenlerin; hangi yöntem kullanılarak daha uzun süre kontrol materyali olarak kullanılabileceği, bitki öz suyu konsantrasyonunun bu duruma etkisi ve filtre kağıtları üzerinde ne kadar süre canlı kalabildiği araştırılmıştır.

5.1. *Citlodavirus citri* (CCDaV) Etmeni için Elde Edilen Sonuçlar

- a) Filtre kağıtlarına CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu örneklerin her iki tip filtre kağıdında da 35 gün süresince varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.
- b) Filtre kağıtlarına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyali direkt temas ettirilmiş ve yapılan PCR çalışmaları sonucu örneklerin her iki tip filtre kağıdında da 21 gün süresince pozitif çıktığı ancak 28. ve 35. günlere ait izolatların negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- c) Filtre kağıtlarına hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu nitroselüloz filtre kağıdına aktarılan örneklerin 35 gün süresince pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kaba filtre kağıdına aktarılan örneklerin ise 21 gün süresince pozitif kaldığı, 28. ve 35. günlere ait izolatların ise negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- d) Hastalık etmeni kaba filtre kağıtlarına dilüsyon yöntemi ile aktarılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucu 10^{-1} ve 10^{-2} olarak belirlenen örneklerin 35 gün süresince pozitif çıktığı tespit edilmiştir. 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen örneklerin ise 21 gün süresince pozitif sonuç verdiği ancak 28. ve 35. günlere ait izolatlarının negatif çıktığı tespit edilmiştir.
- e) Mekanik inokulasyon işlemlerinin üzerinden yaklaşık 3 ay geçtikten sonra filtre kağıtlarından elde edilen *Citlodavirus citri* etmeninin bitkiyi enfekte edip etmediği araştırılmış ve yapılan PCR çalışmaları sonucunda her iki tip filtre kağıdının 7., 14. ve 21. güne ait örneklerinin bitki içerisinde enfeksiyon sağladığı ve pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Ancak kağıtların 28. ve 35. günlere ait örneklerinin bitkide enfeksiyon sağlamadığı ve negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

5.2. *Potexvirus citriflavivenae* (CYVCV) Etmeni için Elde Edilen Sonuçlar

- a) Filtre kağıtlarına CTAB protokolü uygulanarak TNA ekstraksiyonu ile oluşturulan 75 µl'lik örnekler aktarılmış ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu örneklerin her iki tip filtre kağıdında da 35 gün süresince varlığını sürdürdüğü tespit edilmiştir.
- b) Filtre kağıtlarına hastalık etmeni ile bulaşık olduğu bilinen bitki materyali direkt temas ettirilmiş ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu; nitroselüloz filtre kağıdında bulunan etmenlerin 35 gün süresince pozitif sonuç verdiği, kaba filtre kağıdında bulunan etmenlerin ise 35 gün süresince negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- c) Filtre kağıtlarına hastalık etmeni ile bulaşık bitki öz suyu aktarılmış ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu, her iki tip filtre kağıdına ait örneklerin 35 gün süresince negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- d) Hastalık etmeni kaba filtre kağıtlarına dilüsyon yöntemi ile aktarılmış ve yapılan RT-PCR çalışmaları sonucu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olarak belirlenen tüm örneklerin 35 gün süresince pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.
- e) Mekanik inokulasyon işlemlerinin üzerinden yaklaşık 3 ay geçtikten sonra filtre kağıtlarından elde edilen *Potexvirus citriflavivenae* etmeninin bitkiyi enfekte edip etmediğinin araştırılması amacıyla yapılan RT-PCR çalışmaları negatif sonuç vermiş ve viral patojen bitkide enfeksiyon sağlamamıştır.

Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; viral etmenler filtre kağıtları üzerindeki varlığını, belirli bir zaman süresince koruyabilmektedir. Kağıtlar üzerinde varlığını koruduğu süreç, çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Çalışmada kullanılan nitroselüloz ve kaba filtre kağıtlarının özelliklerinin fonksiyonel olarak farklılık göstermesi ve viral etmenlerin membranlara aktarımı sırasında belirlenen konsantrasyon düzeyleri, elde edilen sonuçlar açısından oldukça belirleyici olmuştur. Bazı örneklerin farklı koşullarda ve düşük konsantrasyonlarda kağıtlar üzerinden izolasyonu sağlanmış olsa da standart bir laboratuvar ortamında uygulanan CTAB protokolüne göre oluşturulmuş TNA örneklerinin çok daha avantaj sağladığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte viral etmenin DNA ya da RNA virüsü olması da çalışmada elde edilen sonuçlar açısından belirleyici olmuştur.

Bitki viral hastalıkları, tarımsal üretim için büyük kısıtlamalar oluşturmaktadır. Virüslerin enfekte ettiği bitkilerden doğru bir şekilde örnek alınması, viral patojenlerin moleküler çalışmalarını kolaylaştırmak ve bitki koruma ve iyileştirme programlarının geliştirilmesi için oldukça gereklidir. Özellikle örnek boyutları büyük olduğunda ve laboratuvar tesislerinden uzak olan ilçelerde ve bölgelerde çalışma gerçekleştirildiğinde, örneklenen bitki dokuları içerisindeki virüslerin bütünlüğünün korunması zor olabilmektedir. Her viral patojende ya da başka bir hastalık etmeninde aynı sonuçları almak mümkün değildir. Fakat önceki çalışmalarda belirtilen araştırmalar ve yapılan bu çalışma, herhangi bir hastalık etmenin filtre kağıtlarında belirli sürelerde varlığını koruduğunu göstermiştir. Ayrıca patojenlerin ileriki zamanlarda yapılacak bilimsel çalışmalarda kullanılmak amacıyla steril zarflarda saklanabilmesi araştırmacılara kolaylık sunmaktadır. Bu durum, çalışmalarda kullanılacak materyale rahatlıkla ulaşılabilmesini ve araştırmaların çok daha kısa zamanda sonuç vermesini sağlayacaktır. Özellikle bitki materyallerinin ülkeler bazında geçişine sınırlamalar getirilmesi, bir ülkeden diğerine gönderim sırasında bitki materyalinin çürümesi ve canlılığını kaybetmesi gibi sorunların da en aza indirilmesi sağlanacaktır. Bütün bunlar, farklı pek çok patojende ve çalışmanın yapıldığı koşullar altında değişkenlik gösterecek olsa da yapılan bu çalışma, farklı ülkelerdeki araştırmacılar tarafından hastalıkların incelenmesi ve genetik farklılıkların ortaya konması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca bu çalışma, bitki patojenlerinin tarımsal üretim sürecinde daha hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi için alternatif bir yöntem sunmaktadır.

Bu araştırmanın olumlu kazanımlarının yanında, doğurabileceği olumsuz durumlara da değinmek gerekmektedir. Viral etmenlerin filtre kağıtları üzerinde varlığını koruyabiliyor olması, bu durumun biyolojik bir silah olarak kullanılabileceğini de ortaya koymuştur. Günümüzde hastalık etmenlerinin bir ortama bulaşması için direkt olarak bitki materyaline ihtiyaç kalmamıştır. Çalışmada kullanılan filtre kağıtları üzerinde var olabilen viral patojenlerin posta yoluyla gönderilebiliyor olması oldukça büyük bir risk taşıyabilmektedir. Herhangi bir şehirde ya da ülkede mevcut olan ve hastalıktan arı bir tarımsal üretim alanı, bu şekilde gönderilebilecek bir patojen ile bulaştırılabilir ve ortaya epidemik ya da pandemik alanlar ortaya çıkabilir. Bu durum, herhangi bir bölgeyi tarımsal üretim ve ekonomik açıdan zor duruma düşürmek isteyen kötü niyetli kişilerin kullanabileceği bir

yöntem olarak karşımıza çıkabilir. Bu sebeple ülkelerin karantina uygulamalarını daha dikkatli ve sıkı olarak yönetmesi, ülke vatandaşlarının ve özellikle tarım sektöründe çalışanların yabancı yerlerden gönderilen ve bilgisi dahilinde olmayan mektup, posta vb. materyalleri açarken daha dikkatli olması tavsiye edilmektedir.



KAYNAKLAR

- Ádám J., Stefanova B., Dragoyski K., Tóbiás I., Palkovics L., 2015. USE OF FTA® (WHATMAN) MEMBRANE FOR COLLECTION AND DETECTION OF BULGARIAN PPV ISOLATES. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 18, 2, (334-343), Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan.
- Afloukou F.B., 2020. Alternative hosts, vectors transmission, and molecular characterization of Citrus yellow vein clearing virus (CYVCV) isolates. PhD THESIS, Cukurova University, Adana, 91 s.
- Anonymous, 2023. Filter Paper. Web Sitesi: https://en.wikipedia.org/wiki/Filter_paper Erişim Tarihi: 02.11.2023
- Anonymous, 2024. James Whatman (papermaker). Web Sitesi: [https://en.wikipedia.org/wiki/James_Whatman_\(papermaker\)](https://en.wikipedia.org/wiki/James_Whatman_(papermaker)) Erişim Tarihi: 28.01.2024
- Anonim, 2024. Dot blot. Web Sitesi: https://tr.wikipedia.org/wiki/Dot_blot#:~:text=Dot%20blot%2C%20molek%C3%BCler%20gnetikte%20kullan%C4%B1lan%20hibridizasyon%20y%C3%B6ntemlerinden%20biridir Erişim Tarihi: 08.10.2024
- Arda M., 2000. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi no 46, Ankara. Web Sitesi: <http://eskitite.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp?dosya=891111001> Erişim Tarihi: 06.01.2023
- Barba, M., Czosnek, H., and Hadidi A., 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6, 106–136. doi: 10.3390/v6010106
- Blab Market, 2023. Süzgeç Kağıdı (Filtre Kağıdı) Nedir? Web Sitesi: <https://www.blabmarket.com/blog/icerik/suzgec-kagidi-nedir-ve-nasil-kullanilir#:~:text=%C3%9Cretim%20s%C4%B1ras%C4%B1nda%20%C3%BCreticiler%20%20ka%C4%9F%C4%B1d%C4%B1%20k%C3%BCls%C3%BCz,g%C3%B6z%20ard%C4%B1%20edilebilecek%20kadar%20minimumdur> Erişim Tarihi: 14.10.2023
- Bozan O., Önelge N., 2018. Adana, Mersin ve Hatay İllerinde Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) Hastalığının Yaygınlığı. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 33(1), 57-62. Web Sitesi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/cutarim/issue/38663/368555> Erişim Tarihi: 18.02.2023
- Burlakoti R.R., Hsu C-f., Chen J-r., Sheu Z-M., Bihon W., Kenyon L., 2019. Capture of Ralstonia solanacearum species complex strains directly from plant tissue sampled on FTA cards for molecular characterization. Journal of Plant Pathology 102(4). <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00361-z> Erişim Tarihi: 22.04.2023
- California Department of Food and Agriculture, Citrus Yellow Vein Clearing Virus Pest Profile. Web Sitesi: https://www.cdffa.ca.gov/citrus/pests_diseases/cyvcv.html Erişim Tarihi: 27.12.2023

- Carl Roth, 2024. Whatman FTA. Web Sitesi: <https://www.carlroth.com/medias/DE-FTA-Whatman.pdf?context=bWFzdGVyfGRvY3VtZW50c3wzMTE0NTd8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGRvY3VtZW50cy9oOTAvGlzLz5MzQwNDE1ODM2NDYucGRmfGQyNmRjNjcYmMxZTY4Yjg1ZDhiYTI5NTY5NGlzM2E2ZjViZTJiOGE1Y2M5YmM0YzhkMWZhZDk1ZTA4Y2VmODQ> Erişim Tarihi: 19.10.2024
- Chandrashekara K.N., Prasannakumar M.K., Deepa M., Vani A., 2012. A RAPID, SENSITIVE AND RELIABLE METHOD FOR DETECTING RALSTONIA SOLANACEARUM USING FTA (WHATMAN) CARD. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 219-221.
- Chen H., Zhou Y., Wang X., Zhou C., Yang X., LI Z., 2016. Detection of Citrus yellow vein clearing virus by Real-time RT-PCR. *Horticultural Plant Journal*, 2(4), 188-192. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.07.001> Erişim Tarihi: 27.05.2024
- Correll J.C., Puhalla J.E., Schneider R.W., 1986. Vegetative compatibility groups among nonpathogenic root-colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. *Can J Bot* 64: 2358-2361.
- Cytiva Life Sciences, 2024. A Guide to Whatman Filter Paper Grades. Web Sitesi: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/lab-filtration/knowledge-center/a-guide-to-whatman-filter-paper-grades> Erişim Tarihi: 07.10.2024
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S., Şaş, G., 1993. Citrus virus and virus- like disease in the eastern Mediterranean region of Turkey. In: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. (Eds.). *Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologist, IOCV. Riverside*, pp. 397400.
- Dey K., McVay J., 2022. Citrus yellow vein clearing virus. Florida Department of Agriculture and Consumer Services Division of Plant Industry, FDACS-P-01982. Web Sitesi: <https://www.fdacs.gov/content/download/104334/file/citrus-yellow-vein-clearing-virus-1982.pdf> Erişim Tarihi: 30.07.2024
- Dikilitaş M., Katırcıoğlu Y.Z., Altınok H.H., 2011. Fungus ve Fungal Materyallerin Uzun Dönem Saklanması, Korunması ve Geri Kazanımı Üzerine Varılan Son Gelişme ve Yöntemler. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15(1), 55-69. Web Sitesi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/harranziraat/issue/18434/194120> Erişim Tarihi: 14.12.2023
- Doni N.Y., Zeyrek F. D., Seyrek A., 2016. Detection of Plasmodium using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey. *Malaria Journal*, 15-299. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1334-2> Erişim Tarihi: 29.07.2024
- Drake J.W., Holland J.J., 1999. Mutation Rates Among RNA Viruses. *PNAS*. 96(24):1391-13913.
- Fisher Scientific, 2024. Filter Papers for the Laboratory and Industry. Web Sitesi: https://web.archive.org/web/20151122011251/https://static.fishersci.com/cmsassets/download/s/segment/Scientific/pdf/filter_papers.pdf Erişim Tarihi: 06.08.2024
- Flores R., 1988. Detection of citrus exocortis viroid in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. Tenth IOCV Conference. 192-196.

- Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (FAO), 2024. Web Sitesi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Erişim Tarihi: 10.10.2024
- Fujita Y., Kubo S., 2006. Application of FTA® technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. Legal Medicine Volume 8, Issue 1, Pages 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.06.007> Erişim Tarihi: 13.05.2024
- Gezer A., Karadağ Sarı E., 2019. IN SITU HYBRIDIZATION METHOD. HEALTH SCIENCES RESEARCH PAPERS. Gece Kitaplığı Yayınevi, ss 1-9, Ankara.
- Göçmen M., Taşdemir T., Kelten M., Güneş S., Polat İ., 2003. TURUNÇGİL EXOCORTİS VİROİDİNİN RT-PCR ve DOT BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİYLE TANISI. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16(2), 221-228. Web Sitesi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/18272> Erişim Tarihi: 11.03.2024
- Guo J., Lai X.P., Li J.X., Yue J.Q., Zhang S.Y., Li Y.Y., Gao J.Y., Wang Z.R., Duan H.F., Yang J.D., 2015. First Report on Citrus Chlorotic Dwarf Associated Virus on Lemon in Dehong Prefecture, Yunnan, China. Plant Disease, 99-9. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0011-PDN> Erişim Tarihi: 11.07.2023
- Gustavsson I., Lindell M., Wilander E., Strand A., Gyllensten U., 2009. Use of FTA card for dry collection, transportation and storage of cervical cell specimen to detect high-risk HPV. J Clin Virol. 46(2):112-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.06.021> Erişim Tarihi: 29.08.2024
- Gücer N., 2020. Erdemli İlçesi Limon Ağaçlarında Turunçgil Klorotik Cüceleşme Virüs (TKCV) Hastalığının Yaygınlığının Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 106 s.
- GVS Filter Technology, 2024. Membran ve Kağıt Filtreler. Web Sitesi: <http://www.gvslifesciences.com.tr/urunler/4-membran-ve-kagit-filtreler.html/1> Erişim Tarihi: 28.01.2024
- Haber S., Knapen H., 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA): A rapid, sensitive technique for sero-diagnosis of plant viruses. Canadian Journal of Plant Pathology, 11:2, 109-113. <https://doi.org/10.1080/07060668909501123> Erişim Tarihi: 25.09.2023
- Harper K., Creamer R., 1995. Hybridization Detection of Insect-Transmitted Plant Viruses with Digoxigenin-Labeled Probes. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside 92521. Plant Dis. 79:563-567. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0563> Erişim Tarihi: 19.10.2024
- Hawach Scientific, 2023a. The Composition and Application of Filter Paper. Web Sitesi: <https://www.hawachfilterpaper.com/the-composition-and-application-of-filter-paper/> Erişim Tarihi: 07.10.2023
- Hawach Scientific, 2023b. The Main Function, Classifications, and Properties of Filter Paper. Web Sitesi: <https://www.hawachfilterpaper.com/the-main-function-classifications-and-properties-of-filter-paper/> Erişim Tarihi: 08.10.2023

- Hawach Scientific, 2023c. The Role of Filter Papers. Web Sitesi: <https://www.hawachfilterpaper.com/the-role-of-filter-paper/> Erişim Tarihi: 08.10.2023
- Hull R., 2009. Comparative Plant Virology. Elsevier Academic Press, UK.
- Interlab Laboratuvar Ürünleri, 2023. ISOLAB TR Catalog 2023-2025. Web Sitesi: <https://katalog.interlab.com.tr/#114> Erişim Tarihi: 01.10.2023
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2024. Website: <https://ictv.global/> Erişim Tarihi: 13.12.2024
- Internet Archive Wayback Machine, 2023. Filter Papers and Membranes. Web Sitesi: https://web.archive.org/web/20151122045201/http://www.chimica.unipd.it/nicola.tiso/publica/_private/Utile/catalogo%20whatman.pdf Erişim Tarihi: 15.10.2023
- Jennings J.E., Luukkonen K.L., Robbins K.M., Edwards W.H., Vogt N.A., Vogt A.A., Allen S.E., 2022. Utilizing blood filter paper and ear punch samples for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 by RT-rtPCR. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 34-5. doi:10.1177/10406387221116157
- Kızılkoca S.N., Koç B.T., Tan M.T., 2021. Viruslarda Genetik Değişiklere Bağlı Konakçı Değişimleri. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 14(1), 77-82. <https://doi.org/10.47027/duvetfd.827886> Erişim Tarihi: 08.06.2024
- Korkmaz S., Çınar A., Bozan O., Kersting U., 1994. Distribution and natural transmission of a new whitefly-borne virus disease of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. In: Proceedings of the 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, pp. 437-439.
- Korkmaz S., 2002. Application of Direct Tissue Blot Immunoassay in Comparison with DAS-ELISA for Detection of Turkish Isolates of Citrus Tristeza Closter Closterovirus (C virus (CTV). Turkish Journal of Agriculture and Forestry: Vol. 26: No. 4, Article 5. Website: <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/vol26/iss4/5> Erişim Tarihi: 14.12.2023
- Labsan Laboratuvar Sanayi, 2024. Nylon Membran Whatman Nytran. Web Sitesi: https://www.labsan.com/index.php?route=product/product&product_id=680 Erişim Tarihi: 08.10.2024
- Lauring A.S., Frydman J., Andino R., 2013. The Role of Mutational Robustness in RNA Virus Evolution. Nat Rev Microbiol. 11(5):327-336.
- Loconsole G., Saldarelli P., Doddapaneni H., Savino V., Martelli G.P., Saponari M., 2012a. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. Virology Volume 432, Issue 1, Pages 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.005> Erişim Tarihi: 28.01.2023
- Loconsole G., Önelge N., Potere O., Giampetruzzi A., Bozan O., Satar S., Stradis A. De, Savino V., Yokomi R. K., Saponari M., 2012b. Identification and Characterization of Citrus yellow vein clearing virus, A Putative New Member of the Genus Mandarivirus. Phytopathology, 102(12),1168-75. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R> Erişim Tarihi: 28.01.2023

- Lustig A., Levine A.J., 1992. One Hundred Years of Virology. Journal of Virology, 66(8), Washington, D.C.: American Society for Microbiology. ss. 4629-4631.
- Mahrous Rasha M., Moustafa T.A., Farag A.Z., Sadik A.S., El-Afifi Sohair I., Gamal El-Din A.S., 2005. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF Spiroplasma citri USING SOME SENSITIVE METHODS. Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, 13(3), 625-639. <https://doi.org/10.21608/ajs.2005.15263> Erişim Tarihi: 03.03.2024
- Mathews D.M., Bodaghi S., Heick J.A., Dodds J.A., 2021. Detection of Avocado Sunblotch and Other Viroids Using RNA Filter Paper Capture and RT-PCR. Methods in Molecular Biology, 2316, 219-233. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1464-8_19 Erişim Tarihi: 09.09.2023
- Mayer A., 1886. "Über die Mosaikkrankheit des Tabaks". Die Landwirtschaftliche Versuchstationen. Cilt 32. ss. 451-467.
- Michaud V., Gil P., Kwiatek O., Prome S., Dixon L., Romero L., Le Potier M.F., Arias M., Couacy-Hymann E., Roger F., Libeau G., Albina E., 2007. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. Journal of Virological Methods, 146(1-2), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.006> Erişim Tarihi: 02.02.2024
- Milli Eğitim Bakanlığı, 2015. Laboratuvar Hizmetleri Dilüsyon Hazırlama, Ankara. Web Sitesi: [https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/m.apan/133663/Dil%C3%BCsyon%20Haz%C4%B1rlama%20\(Laboratuvar%20Hizmetleri\).pdf](https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/m.apan/133663/Dil%C3%BCsyon%20Haz%C4%B1rlama%20(Laboratuvar%20Hizmetleri).pdf) Erişim Tarihi: 28.01.2024
- Moscoso H., Raybon E.O., Thayer S.G., Hofacre C.L., 2005. Molecular Detection and Serotyping of Infectious Bronchitis Virus from FTA® Filter Paper. Avian Diseases, 49(1), 24-29. <https://doi.org/10.1637/7220> Erişim Tarihi: 05.01.2024
- Murray, M.G., W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nuc. Acids Res. 8:4321-4325.
- Ndunguru J., Taylor N.J., Yadav J., Aly H., Legg J.P., Aveling T., Thompson G., Fauquet C.M., 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. Virology Journal, 2:45. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-45> Erişim Tarihi: 02.02.2024
- Owor B.E., Shepherd D.N., Taylor N.J., Edema R., Monjane A.L., Thomson J.A., Martin D.P., Varsani A., 2007. Successful application of FTA Classic Card technology and use of bacteriophage phi 29 DNA polymerase for largescale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. Journal of Virological Methods 40:100105.
- Önelge N., 1997. Direct nucleotide sequencing of Citrus exocortis viroid (CEV). Turkish Journal of Agriculture and Forestry 21: 419-422.
- Önelge N., 2003. Türkiye’de Limonlarda Sarı Damar Açılması İle İlgili İlk Rapor. J. Turk. Phytopath. 32:1, 53-55.

- Önelge N., Satar S., Elibuyuk O., Bozan O., Kamberoğlu M., 2011. Transmission studies on Citrus yellow vein clearing virus. In 18th Conference of the International Organization of Citrus Virus, Brazil, pp. 11-14.
- Önelge N., Bozan O., Gök Güler P., 2016. First report of Citrus yellow vein clearing virus infecting new natural host plants in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 98(2), 369-377.
- Özdemir Yıldırım K., Kanev M.O., Gökalp Muranlı F.D., 2015. In situ Hibridizasyon Yöntemleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 3(2):613-621. Web Sitesi: https://www.researchgate.net/publication/282322214_In_situ_Hibridizasyon_Yontemleri_In_situ_Hybridization_Techniques Erişim Tarihi: 17.08.2024
- Pooggin B.B., 2018. Small RNA-Omics for plant virus identification, virome reconstruction, and antiviral defense characterization. *Front. Microbiol.* 9:2779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02779> Erişim Tarihi: 19.01.2024
- Prakash S., Johnson R.E., Prakash L., 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, vol 74. ss. 317-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250> Erişim Tarihi: 16.10.2024
- Richert-Pöggeler K.R., Minarovits J., 2014. Diversity of latent plant-virus interactions and their impact on the virosphere. *Plant Virus Host Interact.* 14, 263-275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411584-2.00014-7> Erişim Tarihi: 19.01.2024
- Roistacher C.N., 1995. A historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. *FAO Rome (Eds.)* 89 p.
- Roossinck M.J., 2005. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 917-924. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1285> Erişim Tarihi: 19.01.2024
- Roossinck M.J., 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1899-1905. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0057> Erişim Tarihi: 22.05.2024
- Roy Y., Nassuth A., 2005. Detection of plant genes, gene expression and viral RNA from tissue prints on FTA cards. *Plant Molecular Biology Reporter* 23(4) 383. <https://doi.org/10.1007/BF02788886> Erişim Tarihi: 14.11.2024
- Seyer A., Karasartova D., Ruh E., Güreser A.S., İmir T., Taylan-Özkan A., 2016. Is “dried stool spots on filter paper method (DSSFP)” more sensitive and effective for detecting *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and sequencing? *Parasitology Research*, 115, 4449-4455. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5231-y> Erişim Tarihi: 18.12.2023
- Smit P.W., Elliott I., Peeling R.W., Mabey D., Newton P.N., 2014. An Overview of the Clinical Use of Filter Paper in the Diagnosis of Tropical Diseases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 195-210. <https://doi.org/10.4269%2Fajtmh.13-0463> Erişim Tarihi: 22.12.2023

- Stobbe A.H., Roossinck M.J., 2014. Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more. *Front.Plant Sci.* 5:150. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00150> Erişim Tarihi: 19.01.2024
- şahin F., Aras B.D., Sayitoğlu M.A., 2013. Genetik Terimler Sözlüğü. Türk Hematoloji Derneği, ss 38-39, İstanbul.
- Takahashi H., Fukuhara T., Kitazawa H., Kormelink R., 2019. Virus Latency and the Impact on Plants. *Front. Microbiol.* 10:2764. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02764> Erişim Tarihi: 29.03.2024
- Tanaka S., Nishii H., Ito S., Kameya-Iwaki M., Sommartya VeP., 1997. Detection of Cymbidium Mosaic Potexvirus and Odontoglossum Ringspot Tobamovirus from Thai Orchids by Rapid Immunofilter Paper Assay. *Bitki Disease*, 81(2), 167-170. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.167> Erişim Tarihi: 30.03.2024
- Tarım ve Orman Bakanlığı, 2011. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bitki Patojeni Virüsler. Web Sitesi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ktae/Belgeler/brosurler/Bitki%20Patojeni%20Vir%C3%B9sler.pdf> Erişim Tarihi: 20.11.2023
- Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017a. Turunęgil Entegre Mücadele Teknik Talimatı, Ankara. Web Sitesi: <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Turun%C3%A7gil%20Entegre-29.08.2017.pdf> Erişim Tarihi: 21.06.2023
- Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017b. Turunęgil Sarı Damar Açıılması Virüsü, Citrus Yellow Vein Clearing Virus (CYVCV). Web Sitesi: https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Bitki_Sagligi/Survey/10-Turunçgil_sari_damar_acilmasi_virusu_Survey_Talimati_2017.pdf Erişim Tarihi: 21.06.2023
- Tarım ve Orman Bakanlığı Tarım Reformu Genel Müdürlüğü Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, 2024. Turunęgiller Ürün Raporu, Ankara. Web Sitesi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/2024%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/Turun%C3%A7giller%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporu%202024-408%20TEPGE.pdf> Erişim Tarihi: 28.01.2025
- Tezel G.G., 2012. Elektroforez, Western Blot, Southern Blot, Northern Blot. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı. Web Sitesi: https://turkpath.org.tr/pdf/7kasim/gaye_guler_tezel_molekuler2.pdf Erişim Tarihi: 08.10.2024
- Vasyukova I., Zakharova O., Altabaeva Yu., Kondakov S., Snegin E., Romanova T., Gusev A., 2020. Glass-fiber membranes for storing, transportation and further characterization of agricultural plant biomaterial. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 433, 012011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/433/1/012011> Erişim Tarihi: 12.05.2023

- Vintage Paper Co, 2024. J. Whatman – The Master of Western Papermaking. Web Sitesi: <https://vintagepaper.co/blogs/news/drying-paper-at-whatmans-springfield-mill> Erişim Tarihi: 28.01.2024
- Yang Z., Zhang L., Zhao J., Li T., Liu Q., Cao M., Zhou V., 2020. First Report of Citrus Chlorotic Dwarf-Associated Virus on Pomelo in Nakhon, Thailand. Plant Disease, 104-4. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2093-PDN> Erişim Tarihi: 14.12.2023
- Yardımcı N., 2018. Bitki Virüsleri. B. Yaşar (Ed), Ziraat Mühendisliğinde Bitki Koruma, s.150-151, Isparta: Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi.
- Zaitlin M., 1998. The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease, Kung, S. D.; Yang, S. F. (Ed.). Discoveries in Plant Biology. Hong Kong: World Publishing Co. ss. 105-110.
- Zhang Y., Shi M., Holmes E.C., 2018. Using metagenomics to characterize an expanding virosphere. Cell 172, 1168-1172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.043> Erişim Tarihi: 24.06.2024
- Zhang Y., Liu Y., Wang Y., Wang Q., He S., Li X., Zhou Y., 2019. Transmissibility of citrus yellow vein clearing virus by contaminated tools. Journal of Plant Pathology, 101, 169-171. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0141-8> Erişim Tarihi: 02.04.2023

ÖZGEÇMİŞ

Nida YALÇIN, İlkokul, Ortaokul ve Lise eğitimini Adana’da tamamladı. Eylül 2017’de Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalında Lisans eğitime başladı ve bölümden Temmuz 2021’de mezun oldu. Eylül 2021’de Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında Turunçgil Virüsleri alanında Yüksek Lisans eğitime başladı. Ekim 2019’da Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Tarih Bölümünde İkinci Üniversite olarak Lisans eğitime başladı ve bölümden Ocak 2025’te mezun oldu.

