

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE TURUNÇGİL ALANLARINDAKİ TRİSTEZA  
VİRÜS İZOLATLARININ KILIF PROTEİN GENLERİNİN  
KLONLAMASI, DNA DİZİLİMİNİN BELİRLENMESİ VE ANALİZİ**

**Gözde ERKİŞ**

**Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİMDALİ  
ISPARTA - 2009**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1.Turunçgil tristeza Virüsünün Yayılma Alanları .....	6
2.2.Turunçgil tristeza virüsünün Tanılanması ve İzolatlarının Karakterizasyonu.....	7
2.3.Turunçgil tristeza virüsünün Genom Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması.....	10
2.4.Turunçgil tristeza virüsünün Kılıf Protein Gen Dizisinin Belirlenmesi.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3. 1. CTV İzolatları.....	19
3. 2. Oligonükleotid Primerler.....	21
3. 3. Total RNA İzolasyonu.....	21
3. 4. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması.....	22
3. 5. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması.....	23
3. 5. 1.Ligasyon.....	23
3. 5. 2. Transformasyon.....	23
3. 6. Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	24
3. 7. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi.....	24
3. 8.Plazmid İzolasyonu.....	25
3. 9.EcoR I Restriksiyon Enzimiyle Kesme İşlemi (Digestion).....	26
3.10.Turunçgil tristeza virüsünün Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması.....	26

3.11.Turunçgil Tristeza virüsünün Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi.....	27
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4. 1. Total RNA İzolasyonu.....	28
4. 2. Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	28
4. 3. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması ve DNA Dizilemesi.....	30
4. 4. Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi.....	36
4. 4. 1. Nükleotid Dizi Analizi.....	36
4. 4. 2. Aminoasit Dizi Analizi.....	40
4. 5. Filogenetik Analiz.....	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR.....	53
7. ÖZGEÇMİŞ.....	59

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### Türkiye Turunçgil Alanlarındaki Tristeza Virüs İzolatlarının Kılıf Protein Genlerinin Klonlaması, DNA Diziliminin Belirlenmesi ve Analizi

Gözde ERKIŞ

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ  
Doç. Dr. Bayram ÇEVİK (Danışman)  
Yrd. Doç. Dr. Nejla YARDIMCI

Tüm dünyada turunçgil yetiştirilen alanlarda yaygın olarak görülen Turunçgil tristeza virüsü (Turunçgil tristeza virüsü=CTV) çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kullanılan anaç ve kaleme bağlı olarak konukçusunda yaprak damar açılmasından bitkinin ölümüne kadar farklı belirtiler meydana getirmektedir. Son yıllarda dünyada CTV'nün moleküler karakterizasyonuna yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak ülkemizde CTV'nün varlığı 1980'li yıllardan bu yana bilinmekle birlikte moleküler karakterizasyonuna yönelik çalışmalar henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada Türkiye'de turunçgil yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Doğu ve Batı Akdeniz, Ege sahil şeridi, Edremit Körfezi ve Doğu Karadeniz bölgelerindeki turunçgil üretim alanlarında bulunan ve serolojik ve biyolojik özellikleri belirlenen CTV izolatlarının 15 tanesi seçilerek moleküler özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı turunçgil üretim bölgelerinden seçilen 15 CTV izolatını içeren doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu izolatların kılıf protein genleri iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle çoğaltılarak tüm izolatlardan 672 bp büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir. RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan CTV kılıf protein genleri T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmit vektörüne klonlanıp *Escherichia coli* bakterisine aktararak çok sayıda koloni elde edilmiştir. Her bir izolat için elde edilen beyaz kolonilerden en az beş tanesi seçilerek koloni PCR yöntemiyle taranmış ve her bir izolatın kılıf protein genini içeren en az iki beyaz koloni belirlenmiştir. Bu kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra plazmidler *EcoRI* enzimiyle kesilip CTV kılıf protein geni içerdikleri teyit edilmiştir. Daha sonra plazmidlere klonlan CTV kılıf protein genlerinin dizilimi yapılarak bunların nükleotid dizilimi ve kodladığı amino asit dizilimi belirlenmiştir. Kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri analiz edilerek ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CTV izolatların birbirleriyle ve dünyadaki diğer izolatlarla benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Turunçgil, Turunçgil tristeza virüsü, kılıf protein geni, DNA dizileme, Filogenetik analiz

2009, 59 sayfa

## ABSTRACT

M. Sc. Thesis

### **Molecular Cloning, Sequencing and Analysis of the Coat Protein Genes of *Citrus tristeza virus* Isolates from Different Citrus Growing Regions of Turkey**

**Gözde ERKIŞ**

**Süleyman Demirel University, Graduate School of Applied and Natural Sciences Department of Plant Protection**

**Thesis Committee: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ**

**Assoc. Prof. Dr. Bayram ÇEVİK (Supervisor)**

**Asst. Prof. Dr. Nejla YARDIMCI**

*Citrus tristeza virus* (CTV), widespread in all citrus growing areas of the world, causes significant economical losses. CTV induces different symptoms ranging from mild vein clearing to the death of citrus trees depending on the combination of the rootstock and scion used. Recently a number of studies have been conducted about molecular characterization of CTV in the world. However, even though the existence of CTV in Turkey has been known since 1980s, the molecular characteristics of CTV isolates have not been studied. In this study, 15 CTV isolates collected from different citrus growing region of Turkey including Eastern and Western Mediterranean, Aegean Cost, Edremit Gulf, Eastern Black Sea regions and previously characterized by serological and biological assays were selected and their molecular characteristics were determined. First, total RNA was isolated from citrus bark tissue collected from CTV infected trees from different regions. Then the coat protein (CP) gene of these isolates were amplified by a two-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method and a DNA fragment of 672 bp corresponding to the CP gene of CTV was obtained from all isolates. The CP genes amplified by RT-PCR were cloned into the pGEM-T Easy plasmid vector using T-A cloning method. After the transformation of then the *Escherichia coli* a number of colonies potentially carrying the CTV CP genes were obtained. For each isolate at least five white colonies were screened by colony PCR and at least two colonies carrying the pGEM-T Easy plasmid with the CTV CP gene were identified. Plasmids were isolated from these colonies and of the presence of CTV CP gene in the plasmids was confirmed by *EcoRI* digestion. Then the CTV CP genes cloned in tho the pGEM-T Easy plasmid were sequence and their nucleotide and deduced amino acid sequences were determined. Similarity and phylogenetic relationship of the CP gene of Turkish CTV isolates with each other and with the CP genes of CTV isolates from different regions of the world were determined using the nucleotide and amino acid sequences.

**Key words:** Citrus, *Citrus tristeza virus*, Coat protein gene, Sequencing, Phylogenetic analysis

**2009, page 59**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, bu çalışmamda beni yönlendiren, yürütmemde yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bayram ÇEVİK' e, maddi ve manevi olarak bana destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŐAHİN-ÇEVİK hocama teşekkür ederim.

Ayrıca Turunçgil tristeza virüsü izolatlarını toplayan ve biyolojik özelliklerini belirleyen tezimde kullanılmasına izin veren sayın Prof. Dr. Savaş KORKMAZ hocama da teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez jürime katılan ve tezime görüşleriyle destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Nejla YARDIMCI hocama da teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime, yazım aşamasında bana evini açan Meryem ATEŐ' e yüksek lisansımda yardımlarını benden esirgemeyen tüm bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma sonsuz Őükranlarımı sunarım.

Ayrıca yüksek lisans tez çalışmamı mali yönden destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine de teşekkür ederim.

Gözde ERKIŞ  
ISPARTA-2009

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Farklı turunçgil üretim alanlarından elde edilen 15 farklı Turunçgil tristeza virüsü izolatlarından 672 bp büyüklüğünde kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren agaroz jel fotoğrafı.....	26
Şekil4.2. Transformasyonu yapılan <i>E. coli</i> bakterilerinin ampisilin ve X-gal içeren 2X YT besi ortamında oluşturdukları kolonilerinin fotoğrafı.....	28
Şekil4.3. Farklı CTV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR ile bazı izolatlardan 750 bp'lik bantların elde edildiğini gösteren jel fotoğrafları.....	31
Şekil4.4. Eco RI restiriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pGEM Teasy plazmidlerinin CTV kılıf protein genini içerdiğini gösteren jel fotoğrafları.....	33
Şekil4.5. Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein geni nükelotid dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.....	41
Şekil4.6. Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan CTV izolatlarının özellikleri.....	18
Çizelge 4.1. Ülkemizdeki CTV izolatları ile dünyadaki CTV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	35
Çizelge4.2. Ülkemizdeki CTV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları.....	36
Çizelge 4.3. Ülkemizdeki CTV izolatları ile dünyadaki CTV izolatlarının aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.....	38
Çizelge 4.4. Ülkemizdeki CTV izolatlarının aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.....	39

## 1.GİRİŞ

Ülkemiz uygun iklimi ve yer şekilleri sayesinde çok çeşitli sebze ve meyvenin yetişmesine olanak sağlamaktadır. Dünyada turunçgil yetiştiriciliği, özellikle ülkemizin güney sahillerinin de içinde bulunduğu 40° kuzey ve 40° güney enlemleri arasında yapılmaktadır (Kaygısız ve Aybak, 2000). Turunçgiller toplam 103 milyon ton üretimi ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur. Dünyada en büyük üretici ülke Brezilya olup onu sırasıyla A.B.D, Çin, Meksika, İspanya ve Hindistan izlemektedir. Türkiye toplam 2.650.000 ton üretimi ile Akdeniz ülkeleri içerisinde İspanya ve İtalya' nın ardından üçüncü büyük üretici ülke konumundadır. Bu üretim aynı zamanda dünya turunçgil üretiminin yaklaşık % 2.45' ini oluşturmaktadır ( FAO, 2005). Akdeniz İhracatçılar Birliği verilerine göre turunçgiller 676.816 ton ihracat miktarı ve 296.387.213 ABD doları gelir ile ülkemizde üretilen yaş meyve ve sebze ilk sıradadır (Akib, 2006).

Ülkemizde turunçgil üretim alanları başlıca üç bölgede yer almaktadır. En büyük üretim bölgesi olan Akdeniz bölgesini sırasıyla Ege, Marmara ve Doğu Karadeniz bölgeleri izlemektedir. Akdeniz Bölgesinde Çukurova, Hatay, Antalya; Marmara Bölgesinde Edremit Körfezi, Ege Bölgesinde sahil şeridi; Doğu Karadeniz Bölgesinde ise Rize Türkiye turunçgil üretiminin önemli miktarının yetiştirildiği yerlerdir (Hızal ve Göral, 1987). Diğer turunçgil üreticisi ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de turunçgil türleri içerisinde yaklaşık % 57' lik payla en çok portakal üretilmektedir ve bunu % 24' lük payla limon izlemektedir. Üçüncü sırada ise % 16' lık oranla mandarin olup daha sonra sırasıyla % 2 ve % 1'lik payla altıntop ve turunç gelmektedir (Hızal ve Göral, 1987).

Tüm dünyada turunçgil yetiştirilen alanlarda 80' e yakın virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmektedir. Tristeza, Kavlama (Psorosis), Palamutlaşma (Stubborn), Taşlaşma virüs hastalığı (Impietratura), Cüceleşme (Exocortis) turunçgillerde görülen başlıca virüs ve virüs benzeri hastalıklardır (Roistacher, 1991). Bunlar arasında tristeza, turunçgillerde en yaygın görülen ve en çok ekonomik kayba neden olan virüs hastalığıdır (Bar-Joseph vd., 1989).

Hastalığın orijininin turunçgillerin anavatanı olan Güneydoğu Asya olduğu düşünülmektedir (Wallace vd., 1956). Ancak hastalık ilk olarak 1910 yılında Güney Afrika'da rapor edildikten sonra, 1960' lı yıllarda Güney Amerika' da epidemi oluşturarak milyonlarca turunçgil ağacının ölümüne neden olmuştur. Bu nedenle Portekizcede "hüzün" anlamına gelen tristeza hastalığı daha sonra 1980' li yıllarda İsrail ve İspanya' da ortaya çıkmıştır. Tristeza günümüzde, bazı izole adalar hariç dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Lee ve Rocha-Pena, 1992).

Triseza hastalığının etmeni Turunçgil tristeza virüsü (CTV)'dür. CTV, *Closteroviridae* familyasında *Closterovirus* cinsi içerisinde yer alan tek sarmal RNA içeren bir bitki virüsüdür. Virüs partikülleri esnek ipliksi bir yapıdadır. 2000 nm uzunluğunda ve 10-12 nm çapında tek sarmallı RNA genomuna sahip CTV' nün genomu yaklaşık 20 kb büyüklüğündedir (Bar-Joseph vd., 1979).

CTV genomunun tamamının dizisi belirlenerek 19 protein kodlayan, 12 açık okuma çerçevesi (open reading frame; ORF) içerdiği ortaya konulmuştur (Pappu vd., 1993, Karasev vd., 1995). Bu genlerden birisi 672 baz çifti uzunluğunda kapsid protein geni (CP) olup CP geni 223 amino asit uzunluğunda ve 25kDa büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır (Sekiya vd., 1991).

Turunçgil tristeza virüsü, çok sayıda turunçgil türü, varyetesi ve hibridi yanında birçok turunçgil akrabasını da enfekte etmektedir. Ayrıca CTV, *Rutacea* familyası dışında 200 bitkiyi de enfekte ettiği bildirilmektedir. Dünyada ticari olarak üretilen turunçgil türlerinin çoğu CTV' ne karşı duyarlıdır. Buna karşın üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata*) CTV' ne karşı dayanıklıdır. Bu nedenle üç yapraklı portakal ve hibritleri bazı turunçgil yetiştirilen bölgelerde anaç olarak kullanılmaktadır (Muller ve Garnsey, 1984).

Turunçgil tristeza virüsü, turunçgillerde kullanılan anaç ve kaleme bağlı olarak konukçularda farklı belirtilere neden olmaktadır. CTV' nün farklı konukçularının oluşturduğu belirtiler Meksika laymında yaprak damar açılması, turunç üzerine aşılı tüm turunçgil türlerinde hızlı göçüren (quick decline; QD), fidan sararması (seedling

yellow; SY) ve kullanılan anaca bağı olmaksızın greylert ve portakalda gövde ve dal çukurlaşması (stem pitting; SP) olarak gruplandırılmaktadır. CTV izolatları farklı konukçularda oluşturdıkları belirtilere göre sınıflandırılmaktadır. Bu amaçla bir dizi test konukçusu belirlenerek CTV' nün biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Garnsey vd., 1987).

İlimli streyn olarak da adlandırılan ve sadece Meksika laymında yaprak damarları açılması belirtisi gösteren streynler ticari turunçgillerde kayda değer belirti meydana getirmemektedir. Meksika laymı dışındaki turunçgillerde belirti oluşturan ve ağacın ölümü dahil ekonomik açıdan önemli belirtilere neden olan CTV streynleri ise şiddetli streynler olarak adlandırılmaktadır. Bu streynlerde farklı konukçularda hızlı göçüren, gövde çukurlaşması ve fidan sararması gibi belirtilere neden olmaktadır. Hızlı göçüren belirtileri turunç anaçlarına aşılı portakal, mandarin ve greylertlerde görülebilir. Eğer üç yapraklı portakal veya mandarin gibi dayanıklı anaçlara aşılama yapılırsa, aşılama hemen sonra bitki kendini toparlayabilir. Fidan sararması; turunç, limon ve greylertlerde cüceleşmeye neden olur. Dirençli bir anaca aşılama yapıldığı takdirde bitki kendini toparlayabilir. Bu belirtiler sera koşullarında her zaman gözlemlenirken arazi koşullarında ortaya çıkmayabilir (Roistacher, 1982). Bazı toleranslı çeşitler üzerinde örneğin altıntoplarda ağaç gövdesi üzerinde anatomik bozukluk sonucu olarak gövde çukurlaşmaları (stem pitting) görülür. Ağaç kabuğu soyulduğunda gövde ve dal çukurlaşmasının floemde oluşturduğu çöküntü rahatlıkla görülebilir. Gövde ve dal çukurlaşması; cüceleşme ve kloroz yanında meyve sayısında ve büyüklüğünde azalmaya neden olarak ürünün verim ve kalitesini düşürür ( Da Graca vd., 1984).

Turunçgil tristeza virüsü genellikle enfekteli üretim materyallerinin sağlıklı bitkilere aşılama yoluyla yayılmakla beraber az da olsa kesme inokulasyon yöntemiyle mekanik olarak da taşınmaktadır (Muller ve Garnsey, 1984). Ancak CTV, doğal olarak *Toxoptera citricida*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola* vektörleri ile semi-persistent olarak taşınmaktadır (Yokomi, 1989; Roistacher, 1989). *T. citricida*, CTV' nün en etkili vektörüdür. Ülkemizde henüz varlığına ilişkin kayıt bulunmamaktadır. Ancak ülkemizin turunçgil üretim alanlarında tristeza virüsü ve

onun taşıyıcısı *A. gossypii* yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinin en yaygın olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesinde tristeza virüsüne duyarlı turunç anacı kullanılmaktadır. Tüm bu koşullar ve tristeza virüsünün en etkin vektörü olan *T. citricida*'nın son yıllarda Portekiz ve İspanya'da bulunması (Ilharco vd., 2005) göz önüne alındığında tristeza virüsü ülkemiz turunçgil yetiştiriciliği açısından önemli bir tehlike oluşturmaktadır.

CTV ile mücadele için dayanıklı anaç kullanmak, ılımlı streynlerle çapraz koruma, gen aktarımı yoluyla dayanıklılık kazandırma gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir (Lee ve Rocha-Penna, 1992). Üç yapraklı (*Poncirus trifoliata*), sitranjlar (üç yapraklı portakal melezleri), Kleopatra mandarini (*Citrus reshni*), Volkameriana (*Citrus volkameriana*), Swingle sitrumelo (Üç yapraklı ve altıntop), Kaba limon (*Citrus jambhiri*), Rangpur Laymı (*Citrus limonia*), Yuzu (*Citrus junos*) tristezaya dayanıklı anaçlardır (Garnsey vd., 1987; Davies ve Albrigo, 1994). Ancak ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesinde CTV'ne hassas olan turunç anacı kullanılmaktadır. Buna karşın Ege, Marmara ve Doğu Karadeniz bölgelerinde üç yapraklı portakal veya melezi olan Carrizo sitranjı anaç olarak kullanılmaktadır. Dayanıklı anaç kullanımı yanında turunçgillere ılımlı CTV streynleri aşılansarak şiddetli CTV streynlerine karşı dayanıklılık sağlanmasına olanak sağlayan çapraz koruma yöntemi de kullanılmaktadır (Lee vd., 1987; Lee ve Brlansky, 1990).

Turunçgil tristeza virüsü'ne karşı biyoteknoloji yoluyla dayanıklılık geliştirme çalışmaları ilk olarak CTV'nün kılıf protein geninin *Agrobacterium* bakterisi aracılığıyla turunç ve layma aktarılması ile başlanmıştır. Daha sonra CTV'nün farklı streynlerinden elde edilen kılıf protein genleri ticari olarak önem taşıyan başka turunçgil türlerine aktarılmıştır (Yang vd., 2000; Febres vd., 2003). Ancak turunçgil bitkilerinde CTV'üne karşı dayanıklılık sağlanıp sağlanmadığı henüz tam olarak bilinmemekte ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

Turunçgiller ülkemizin sahil bölgelerinde yetiştirilen ekonomik açıdan önemli bir meyve grubudur. Gerek yetiştirilen tür ve çeşitler gerekse ihracattaki payı

bakımından önemli olan turunçgillerde birçok virüs ve virüs benzeri hastalığın bulunduğu bilinmektedir. Bu hastalıklardan Turunçgil tristeza virüsü' nün yol açtığı tristeza hastalığının ülkemizde bulunduğu 1980' li yıllardan beri bilinmektedir. Ancak Doğu Akdeniz bölgesinde Çukurova yöresi dışındaki bölgelerde hastalığın varlığı ve yayılışı bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan ülkesel survey çalışmalarında CTV' nün turunçgillerin yetiştirildiği tüm bölgelerde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca bulunan bu bitkilerden bazılarının biyolojik özellikleri belirlenmiştir (Korkmaz vd., 2008).

Bu çalışmada ülkemizin farklı turunçgil üretim alanlarından elde edilen CTV izolatlarının kılıf protein genleri klonlanıp gen dizilimi belirlenmiştir. Bu çalışma ülkemizde CTV' nün moleküler karakterizasyonuna yönelik ilk çalışmadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Turunçgil tristeza virüsünün Yayılma Alanları

Turunçgil tristeza hastalığı, ilk olarak 1910 yılında Güney Afrika' da greyfurt anacına aşılı turunçgillerde rapor edilmiştir (Webber, 1943). Hastalıkla ilgili benzer kayıplar 1930' lu yıllarda Arjantin ve Brezilya' da turunç üzerine aşılı portakallarda görülmüştür (Lee ve Rocha-Penna, 1992). Turunçgillerde tristeza hastalığı günümüzde, bazı izole adalar hariç dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Lee ve Rocha-Penna, 1992). Ülkemizde ise tristeza hastalığı ilk defa Norman tarafından Adana ve çevresindeki turunçgil meyve bahçelerinde belirtildikten sonra 1967 yılında Özalp ve Azari tarafından Ege Bölgesinde bulunduğu simptomatik olarak belirlenmiştir. Daha sonra CTV' nün Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunduğu biyolojik indeksleme ve serolojik yöntemlerle tespit edilmiştir (Baloğlu, 1988). Doğu Akdeniz Bölgesinde belirlenen CTV izolatlarının serolojik ve biyolojik indeksleme yöntemleriyle karakterizasyonları yapılmıştır (Korkmaz, 2002).

Ülkemizin turunçgil üretilen tüm bölgelerinde Turunçgil tristeza virüsünün varlığı, MCA 13 antiodisi ile şiddetli streynlerini belirlemek için yapılan Western blot analizlerinde daha önce CTV' nün varlığı DAS-ELİSA ve RT-PCR yöntemleriyle belirlenen 41 örnek kullanılmıştır ve 32 pozitif sonuç elde edilmiştir. Ayrıca iki yönlü PCR metodu kullanılarak Western blot çalışmaları desteklenmiştir. Moleküler ve serolojik yöntemlere ek olarak biyolojik indeksleme yöntemi de kullanılarak izolatların biyolojik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda da izolatların hiçbiri turunç üzerine aşılı portakal ve altıntop bitkilerinde simptom oluşturmazken, Meksika laymı bitkisinde ise damar açılması simptomu oluşturmuşlardır. Ayrıca tüm Satsuma izolatları ve bir kamkat izolatu Meksika laymı bitkisinde gövde çukurlaşması simptomu oluşturmuştur. Bu sonuçlar farklı turunçgil üretim bölgelerinde turunçgil tristeza virüsünün şiddetli streynlerinin bulunduğunu göstermiştir (Korkmaz vd., 2008).

## 2.2. Turunçgil tristeza virüsünün Tanınması ve İzolatlarının Karakterizasyonu

Turunçgil tristeza virüsünü tanılamak ve izolatlarının karakterizasyonu için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler farklı indikatör bitkilerde belirti oluşturma (biyolojik indeksleme) (Garnsey vd.,1987 ; McClean, 1977 ) afidlerle taşınma (Roistacher ve Bar-Joseph, 1984.) gibi biyolojik yöntemlerle, monoklonal (MCA 13) ( Permar vd. 1990; Vela vd., 1986) ve poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan ELISA, western blot gibi serolojik yöntemler, DNA probe hibridizasyonu (Rosner vd.,1986; Lee ve Bar-Joseph, 1986 ), çift-sarmallı RNA (dsRNA ) analizi (Dodds, vd. 1987), polipeptit harita analizi (Guerra vd., 1990), restriksiyon parçalarının uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi (Gillings vd., 1993; Akbulut, 1995), Multiple moleküler markerler (Hilf vd., 1995), tek sarmala uygun polimorfizm (SSCP) (Rubio vd., 1996) çift yönlü tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Cevik vd., 1996), ırka spesifik problarla hibridizasyonu (Cevik vd., 2005) gibi moleküler yöntemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır.

Turunçgil tristeza virüsünün 3 izolatu ile afidlerle taşınma çalışmasında, *Aphid gossypii*' nin 1, 3, 9, 27' inci bireyleri kullanılmıştır. Virüsün taşınmasında 1, 3, 9, 27' inci aphid uygulamalarında sırasıyla %1.1, 6.7, 23.3, 56.7 enfeksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada Güney Amerika'da *T.citricida* kullanılarak yapılan çalışmaya benzer sonuçlar alındığı görülmüştür. Enfeksiyon eğrisi değerlendirildiğinde 52 aphid uygulamasında 24°C de 24 saat besleme periyodundan sonra 33 canlı aphid bulunmuştur. Bu sonuçlar Kaliforniya'da tristeza virüsü streynlerinin *A. gossypii* ile etkin bir şekilde taşındığını göstermektedir ( Roistacher vd., 1984).

Biyolojik indeksleme yöntemleri çok fazla iş gücü gerektirmekte olup, büyük ölçekli testlerde maliyeti çok yüksektir. Çevre, konukçu, değerlendirme sistemleri ve terminolojideki farklılıklardan dolayı farklı alanlardan elde edilen CTV izolatlarının şiddetinde belirsizlikler olmaktadır. Bu nedenle standardize edilmiş konukçu testleri geliştirilmiştir. Bu amaçla beş farklı indikatör bitki ( Meksika laymı, turunç, Duncan greyfurdu, Madam vinous portakalı, turunç üzerine aşılı navel portakalı)

kullanılmıştır. Üç önemli hastalık belirtisi belirlenmiştir. Bireysel ve toplam konukçu indeks skorları, her bir izolatın biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Garnsey, 1987).

Serolojik yöntemler içerisinde enzime bağlı immunosorbent testi (ELISA) ile direk dokuya bastırma (DTBA) testi en çok kullanılan yöntemlerdir. 1970'lerden beri kullanılan serolojik yöntemler, daha güvenilir, daha hızlı ve daha düşük maliyetlidir. CTV'nün belirlenmesi için spesifik bağlanma bölgelerine (epitop) uygun çeşitli monoklonal antikorlar (Mab) geliştirilmiştir. MCA13 monoklonal antikor yumuşak ırklarla reaksiyon vermiyken sadece şiddetli CTV streynlerini tanıdığı için yumuşak ve şiddetli streynlerin ayrımında başarıyla kullanılmaktadır (Permar vd., 1990). CTV'nün yumuşak ve şiddetli streynlerinin MCA 13 monoklonal antikor ile ayrımı kılıf proteininin 124. pozisyonundaki bir amino asit farklılığı sayesinde gerçekleşmektedir. Bu aminoasidin şiddetli streynlerde fenilalanin iken yumuşak streynlerde tiyrosin olduğu belirlenmiştir (Pappu vd., 1993).

CTV'nün de gövde çukurlaşmasına neden olan izolatları hızlı bir şekilde belirlemek amacıyla İndirekt ELISA (I-DAS-ELISA) testi ve farklı yakalayıcı ve saptayıcı antikorların bir çok kombinasyonu değerlendirilmiştir. Bu antikorların iki kombinasyonu, enfekteli portakal bitkilerinde gövde çukurlaşmasına sebep olan streynleri belirlemek için uygun oldukları bulunmuştur. Bu antikorlardan bir tanesi yakalayıcı olarak kullanılan ve bakteride üretilen kılıf proteinine karşı oluşturulan poliklonal serum diğeri ise saptayıcı olarak kullanılan ve bakteride üretilen kılıf proteinine karşı geliştirilen 3E10 monoklonal antikorudur. Turunçgil yetiştirilen 20 farklı ülkeden alınan ve 35 tanesi portakalda gövde çukurlaşmasına neden olan 76 CTV izolatı, yakalayıcı ve ara saptayıcı poliklonal ve monoklonal antikorların farklı kombinasyonları kullanılarak I-DAS ELISA' da analiz edilmiştir. ELISA'nın bu çok kapsamlı formatı veriler ile birleştirildiğinde portakal bitkilerinde gövdede çukurlaşmaya neden olan CTV izolatlarının güvenilir bir şekilde serolojik olarak ayrımına olanak sağladığı görülmüştür (Nikolaeva vd., 1996).

Kong ve arkadaşları 1999 yılında her bir CTV izolatında dizi değişkenleri (haplotipleri) belirleyip, analiz etmişlerdir. CTV izolatlarının 4 farklı genom bölgesi tek zincir konformasyon polimorfizm (SSCP) analizi kullanılarak, beş farklı Kaliforniya CTV izolatının popülasyon yapısı araştırılmıştır. Ayrıca haplotip nükleotid dizi analizinden elde edilen sonuçlarla, izolatlar içinde ve arasında genetik çeşitlilik olduğu belirlenmiştir. Çalışılan CTV izolatlarının çoğunun genetik açıdan birbirleriyle ilişkili olduğu ve içlerinden birinin baskın olduğu haplotip popülasyonundan oluştuğu anlaşılmıştır. Fakat bir tanesinde, aynı izolatın haplotiplerinin nükleotid dizileri arasında yüksek oranda farklılık olduğu belirlenmiştir. Bu haplotiplerin diğer izolatların haplotipleri ile karşılaştırılması sonucunda, bazı CTV izolatlarının, sapma gösteren iki izolatın karışık enfeksiyonu sonucunda ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

Hung ve arkadaşları 2000 yılında CTV' nün farklı streynlerinin belirlenmesi için tek basamaklı tersine transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PCR) bağlı bir yöntem kullanmışlardır. Bu yöntem, etkili enzim karışımı ve uygun bir tampon çözeltisi kullanılarak tek bir tüp içerisinde PCR ve RT-PCR' in birleştirilmesini içermektedir. Tek aşamalı RT-PCR yöntemi, iki basamaklı RT-PCR ve ELISA testleriyle karşılaştırıldığında, CTV' nün konukçuda çok düşük konsantrasyonda olduğunda dahi çok yüksek bir hassasiyet sağladığı belirlenmiştir.

Rubio ve arkadaşları tarafından Kaliforniya ve İspanya' dan alınan 30 CTV izolatının, hem kendi içinde hem de bu izolatlar arasında, 4 genom bölgesinin genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı incelenmiştir. Analizler, izolatların çoğunun değişkenlerden birinin baskın olduğu dizi farklılıkları gösteren bir popülasyon içerdiği gösterilmiştir. Dört izolat, bazı genom bölgelerinde iki büyük dizi değişkenliği göstermiştir. Bu izolatlardan üçüne ait iki ana değişken birbirleri arasında çok düşük bir nükleotid benzerliği gösterirken diğer izolatların nükleotid benzerliği yüksek bulunmuştur. Bu da sapma gösteren iki izolatın karışık enfeksiyon oluşturduğu olasılığını düşündürmektedir. Farklı genom bölgelerinde yapılan istatistiksel analizlerin ve filogenetik ilişkilerin uyumsuzluğu, bazı CTV dizi değişkenlerinin genomlarının, sapma gösteren dizi değişkenleri arasındaki

rekombinasyon etkinliklerinden kaynaklandığını göstermiştir. Genetik açıdan bakıldığında, nükleotid farklılığı ve coğrafi orijin arasında hiçbir ilişki gözlenmemiştir. Burada analiz edilen İspanya ve Kaliforniya izolatlarının aynı popülasyonun üyeleri olduğu düşünülmektedir (Rubio, 2001).

Çoklu moleküler markerlar ile T3, T30, T36 ve VT CTV izolatlarının belirli bölgelerinden ya da tüm genomundan elde edilen diziye spesifik primerler ile birbirine bitişik olmayan üç bölge çoğaltılmıştır. Uluslararası koleksiyondan genetik olarak birbiriyle ilişkili olduğu düşünülen 372 izolat için bu genetik markerlar kullanılmıştır. Bunlardan 85 izolat T3 izolatıyla, 81 izolat T30 izolatıyla, 11 izolat T36 izolatıyla, 89 izolatta VT izolatıyla benzerlik göstermiştir. Geriye kalan 106 izolattan 51 tanesinde iki veya daha fazla tanınabilir viral genotipleri içeren karışık enfeksiyon tespit edilmişken, 55 tanesi için net bir grup tespit edilememiştir. Bu çalışmada CTV izolatlarını sınıflandırmak için kombine çoklu moleküler markerlar ve nükleotid dizi verilerinin kullanılabileceği gösterilmiştir (Hilf, 2005).

CTV popülasyon yapısı ile moleküler ve biyolojik karakterizasyonu arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması için Çin' in beş ilinden alınan 72 CTV örneği biyolojik indeksleme, p25/*Hinf* I restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RFLP), çoklu moleküler markerlar ve RT-PCR analizlerinden yararlanılarak araştırılmıştır. Şiddetli gövde çukurlaşmasına sebep olan izolatların karışımının bölgede yaygın olduğu bulunmuştur. p25/*Hinf* I RFLP grup 3 ve p23/BD-PCR grup 1, 3'e bağlı izolatlar yaygınlığın temel sebebi olmuştur. İzolatların çoğu T30 ve VT genotiplerinin karışımı olduğu görülmüştür. Bölgedeki streyn karışımlarının daha doğru bir şekilde saptanması ve izolatların biyolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılması üç moleküler metodu eş zamanlı uygulayarak başarılmıştır (Zhou vd., 2007).

### **2.3. Turunçgil tristeza virüsünün Genom Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması**

Şu ana kadar dünyanın farklı turunçgil bölgelerinden elde edilen sekiz CTV izolatının tüm genomunun dizilemesi yapılarak, her birinin farklı biyolojik aktiviteye

sahip olduğu belirlenmiştir (Karasev vd., 1995; Mavassi vd., 1996; Yang vd.,1999; Vives vd., 1999; Suastika vd., 2000; Albiachi-Marti vd., 2000; Ruiz-Ruiz vd., 2006; Amin vd., 2006).

Florida T36 tristeza izolatının tđm genomunun dizisinin belirlenmesi Karasev ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılmıştır. Genomun 19.296 nđkleotide sahip olduğu ve 12 tane açık okuma erevesi (ORF) içerisinde organize olduğu belirlenmiştir. Bu ORF' lerin potansiyel olarak en az 17 tane protein őrünü kodlayabildikleri belirlenmiştir. Birinci ORF bđlgesi, 108' inci nđkleotidden başlamakta ve protease benzeri 2 papain (P-PRO), metiltransferaz (MT), helikaz (HEL) içeren 349 kDa bđyüklüğünde bir polipeptid kodlamaktadır. ORF 1b bđlgesi, a+1 ribozomal frameshift őrzerinden ifade edilen 57 kDA bđyüklüğünde RNA'ya bağımlı RNA polimeraz kodlamaktadır.

Mawassi ve arkadaşları tarafından 1996 yılında, CTV' nđn fidan sararmasına neden olan VT izolatının 19.226 nđkleotid içeren RNA genomunun dizilemesi yapılmıştır. Dizisi őrnceden tamamlanan CTV' nđn T-36 izolatı ile ORF1 bđlgesi hariç benzer genom organizasyonuna sahip olduğu bulunmuştur. CTV VT izolatının ORF1 bđlgesinde, gđrđlen nđkleotid eksikliklerinden dolayı 70 nđkleotid daha kısa olduğu belirlenmiştir. VT ve T36 izolatlarının tđm genom dizilerinin karşılaştırılmasında, 3' ucunda bulunan 10 ORF boyunca ortalama % 89'luk benzerlik bulunurken, ORF1 boyunca yalnızca %60–70' lik benzerlik bulunmuştur. 5' ucundaki gen kodlamayan bđlgelerde (UTR), yalnızca %60' lık bir benzerlik varken, 3' ucundaki gen kodlamayan bđlgelerde ise %97' lik bir benzerlik bulunmuştur. Mawassi ve arkadaşları tarafından closterovirus grup őryelerinin iki streynin genomları arasındaki değişikliğin ilk defa ayrıntılı bir şekilde karşılaştırılması yapılmıştır. Bđyükle RNA genomlarına sahip iki CTV streyni arasında farklı virüs grupları arasındakinden daha fazla farklılık olabileceği gözlemlenmiştir.

Yang ve arkadaşları tarafından 1999 yılında CTV' nđn SY568 izolatının genom dizisi belirlenmiştir. Daha őrnceden genom dizisi belirlenen T36 ve VT izolatlarıyla genom organizasyonlarının benzer olduğu ortaya konulmuştur. Kaliforniya' dan elde

edilen şiddetli gövde çukurlaşmasına neden olan SY568 izolatu, İsrail' den elde edilen fidan sararmasına neden olan VT izolatu ile %87' den fazla tüm genom dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Florida' dan elde edilen hızlı göçüren T36 izolatu ise, SY568 ile % 81 dizi benzerliği gösterdiği ortaya konulmuştur. Dizi benzerliği genomun 3' ucunda % 90' nın üzerinde iken 5' ucunda % 56' ya kadar düştüğü belirlenmiştir. Bu üç izolatu dizilerine bağlı olarak genomun 3' ucu iyi korunmuşken, 5' ucunda nispeten sapmalar bulunmuştur.

Turunçgil tristeza virüsünün T385 İspanyol izolatuının genom dizisinin belirlenmesi de Vives ve arkadaşları (1999) tarafından yapılmıştır. Bu izolatuın genom dizisi, T36 (Florida), VT (İsrail), SY568 (İsrail) izolatları ile karşılaştırıldığında genomu 19.259 nükleotid uzunluğu olan T385 izolatu, T36 izolatuının genomundan 37 nükleotid daha kısayken, VT izolatından 33 nükleotid, SY568 izolatından ise 10 nükleotid daha uzun olduğu belirlenmiştir. T385 izolatu, T36 ile %81.3, VT izolatıyla %89.3, SY 568 izolatıyla % 94 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. T385 izolatuının 5' UTR' nin VT ile %67, SY568 ile %66.3, T36 ile %42.5 benzerlik gösterirken, 3' UTR' ın bütün izolatlarda %97 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Kodlanan bölgede, T385 ve VT arasındaki nükleotid farklılıkları genom boyunca dağılmıştır (%90 benzerlik). T385 ile diğer izolatlar arasında böyle bir durum gözlemlenmemiştir. T385 ve SY 568 izolatları, genomun sekizinci 3' ucundaki ORF' leri %90 nükleotit benzerliğine sahipken yalnızca ORF 1 a' da %72.3 benzerlik görölmüştür.

Albiach-Marti ve arkadaşları tarafından biyolojik olarak farklı özelliklere sahip dört izolatuın genom dizisinin tamamı belirlenmiştir. Nükleotid dizilerinde %60' dan fazla farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir. Ilımlı T30 izolatuının tüm genom dizisinin İspanyol T385 (ılımlı) izolatıyla çok benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca farklı bölgelerden, farklı konukçulardan, farklı zamanlarda alındığı ileri sürölen (B252 Tayvan, B272 Kolombiya, B354 Kaliforniya) diğer izolatların dizi örnekleri T30 dizisiyle tamamen benzer olduğu bulunmuştur. Bu izolatlar arasındaki dizi farklılıkları, T30 popölasyonunun değişkenlik aralığından kaynaklandığı düşünölebilir (Albiach-Marti vd., 2000).

Turunçgil tristeza virüsünün fidan sararmasına neden olan izolatı NuagA' nın tam nükleotid dizisi belirlenmiştir. Genom 19.302 nükleotidden oluşmuştur ve önceden genom dizilimi belirlenen izolatlarla benzerlik gösterdiği ve 12 açık okuma çerçevesine (ORF) sahip olduğu bulunmuştur. Bu genom, son zamanlarda dizisi belirlenen CTV genomları arasında en büyüğü olan T36 (çabuk göçüren, Florida)' dan 6 nükleotid (nt); VT (fidan sararması, İsrail)' den 76 nt; T385 (ılımlı, İspanya)' den 43 nt ve SY568 (gövde çukurlaşması, Kaliforniya)' den 53 nt daha uzun olduğu saptanmıştır. NUagA ve diğer izolatlar arasındaki dizi karşılaştırması, genomun 3' ucu boyunca yaklaşık % 90 oranında benzerlikler ortaya çıkarırken genomun 5' ucu T36' nın ki ile % 70 benzerlik gösterirken VT, SY568 ve T385' inkilerle % 90 oranında benzerlik göstermiştir. NUagA ile VT, SY568 ve T385 yakından ilişkilirken NUagA ile T36 arasındaki ilişkinin daha az olduğu belirlenmiştir (Suastika vd., 2000).

Şiddetli gövde çukurlaşmasına neden olan T318A İspanyol (19252 nükleotid) izolatının tüm genomunun dizilemesi yapılmıştır. SY568 (Kaliforniya) ve NUagA (Japonya) izolatlarıyla genom dizisi benzerlik gösterirken, T385 (İspanya) ve T30 (Florida) izolatlarıyla dizi benzerliği olarak farklılık göstermiştir. Diğer şiddetli izolatlardan farklı olarak T318A izolatının önceden gövde çukurlaşması izolatlarıyla ilişkili 5' ucunda gen kodlanmayan bölgede benzer bir dizi değişkenliğine (tipII) sahip olduğu bulunmuştur (Ruiz-Ruiz vd., 2005).

Mısır'da bulunan CTV izolatlarının karakterizasyonunda CP geni kullanılmıştır. Bu amaçla iki farklı bölgeden alınan üç Mısır CTV izolatının CP genleri, İmmocapture RT-PCR ile çoğaltılarak ve tek zincir konformasyon polimorfizm (SSCP) yöntemiyle analiz edilerek farklı dizilime sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Daha sonra bu izolatlardan bazılarının CP gen dizilimi karşılaştırılmıştır. Dünyanın başka bir yerinden alınan referans dizilerle yapılan karşılaştırma, bu haplotiplerin hızlı göçüren ve gövdede çukurlaşmaya neden olan şiddetli streyn Florida T3 ile çok yakın bir şekilde kümelendiğini göstermiştir. Elde edilen aminoasit dizilerinin analizi MCA13 antikoruyla spesifik epitop taşıdığını göstermiştir. Gen bankasında bulunan

Mısır izolatının dizileriyle yapılan dizi karşılaştırması %8' lik bir farklılıkla bu izolatın farklı bir kökene sahip olduğu belirlenmiştir (Amin, 2006).

#### **2.4. Turunçgil tristeza virüsünün Kılıf Protein Gen Dizisinin Belirlenmesi**

Turunçgil tristeza virüsünün kılıf protein gen dizilişindeki farklılıkları ortaya koyarak bunları biyolojik özelliklerle ilişkilendirmek amacıyla ilk olarak Florida' da kılıf protein geni dizi belirleme ve karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada dsRNA' lardan cDNA sentezlenerek kılıf protein genleri çoğaltılmıştır. Biyolojik özellikleri farklı olan yedi Florida izolatı ile dört yabancı izolatın kılıf protein genleri klonlanmıştır. Klonların CP genleri dizilimi belirlenerek bu genin 669 baz çifti uzunluğunda ve 223 amino asit protein kodladığı tespit edilmiştir. Tüm izolatların hem nükleotid hem de amino asit dizilimleri arasında %80' den fazla benzerlik bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca karşılaştırmalar sonucunda her bir izolatın benzersiz amino asit dizilimine sahip olduğunu ve bu amino asitlerden bir kısmının bloklar halinde bütün izolatlarda korunduğu bulunmuştur. Soy ağacı analizleri, ılımlı ve şiddetli Florida izolatıyla oluşturan farklı coğrafi bölgelerden alınan yabancı CTV izolatları arasında önemli benzerlikler olduğu ve soy ağacındaki gruplarla izolatların biyolojik özellikleri arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur (Pappu vd., 1992).

İsrail' de tristeza virüsünün fidan sararmasına neden olan streyni (SY) ile fidan sararmasına neden olmayan streyninin (NSY) kılıf protein gen dizilimi belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar sonucunda VT grubunu oluşturan altı izolatın nükleotid ve amino asit dizilerinde büyük benzerlikler ortaya çıkmıştır. Bu grup, turunca aşılaman portakaldan oluşan duyarlı kombinasyon üzerinde çok ılımlı CTV reaksiyonuna sebep olan NSY izolatı ile şiddetli fidan sararmasına ve portakal/turunç reaksiyonuna sebep olan üç SY izolatından oluşmuştur. *Aphis gossypii* tarafından sürekli olarak taşınmayan bir CTV izolatı olan MT' nin, *Aphis gossypii* ile taşınan CTV izolatlarının her birinin iki amino asitinde (Val 103 ve Glu 113) farklılık bulunmuştur. Değişken bir şekilde taşınan CTV izolatı ST' den alınan cDNA klonlarının dizilemesi yapılarak, test edilen klonlar arasında büyük bir dizi çeşitliliği

olduğu gösterilmiştir. Bu dizi karşılaştırmaları sonucunda İsrail’ de son zamanlardaki CTV salgınlarının, kılıf protein genlerinde büyük farklılıklar gösteren en az iki CTV streyninden (VT ve HT) kaynaklandığı gösterilmiştir (Mawassi vd., 1992).

Çevik ve arkadaşları tarafından 1995 yılında Meyer limonlarından elde edilen CTV izolatlarının kılıf protein genleri klonlanıp dizisi belirlenmiştir. Dizi analizlerine bağlı olarak bu izolatlar ve diğer bilinen izolatlar arasındaki akrabalık ilişkileri ortaya konmuştur. Bu izolatların bazıları şiddetli Florida T36 izolatıyla nükleotid dizisi olarak %90-99, aminoasit dizisi olarak %91-100 benzerlik gösterdiği görölmüştür. Yapılan dizi analizlerinde Meyer limonlarından elde edilen 203C ve 204D izolatlarının CTV’ nün ılımlı streynleri olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlarla Florida T30 ılımlı streyni ile bir grup oluşturulmuştur (Cevik vd., 1995).

Hindistan’ da turunçgil tristeza virüs izolatlarının kılıf protein gen dizilerine ve RFLP’ lere göre gruplandırılması ve karşılaştırılması yapılmıştır. Hindistan’ da dört farklı bölgeden alınan CTV örnekleri (Bangalor (CTV-B), Delhi (CTV-D), Nagpur (CTV-N) ve Pune (CTV-P)) Kagzi laymlarına (*Citrus aurantifolia*) aşılanmıştır. Aşılanmadan sonraki 6-8 hafta içinde bütün izolatlar, tipik damarda beyazlaşma ve beneklenme simptomlarını göstermiştir. Buna ek olarak, 8-10 ay sonra CTV-B ve CTV-P izolatlarında gövde çukurlaşması görölmüştür. Bu izolatların CTV kılıf protein geni, bütün izolatlar için 672 bp’ lik kılıf protein geni spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Dört Hint izolatının kılıf protein geni dizi analizi yapıldığında, Hint izolatları ile gövde çukurlaşmasına neden olan Kaliforniya CTV SY568 izolatı arasında %93-94 oranında nükleotid dizi benzerliği olduğu; Hint izolatları ile fidan sararmasına neden olan Japon NuagA ve İsrail VT p346 izolatlarıyla arasında %92-93 oranında benzerlik olduğu gösterilmiştir. Filogenetik analizde Hint CTV izolatları ayrı bir bölüm oluşturdukları ve diğer izolatlardan oldukça farklı oldukları ortaya çıkmıştır (Roy vd., 2002).

İran’ın iki farklı coğrafi bölgesinden alınan 22 Turunçgil tristeza virüsü izolatının, kılıf protein genlerine göre karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla İran’ ın CTV enfeksiyon dağılımı yüksek olan kuzey bölgelerinden 13 izolat alınırken, 9 izolat da

CTV' nün varlığı ve afidlerle taşınması önceden saptanan güney bölgesinden alınmıştır. Alınan tüm izolatlar CTV' nün çeşitli belirtilerini göstermektedir. Önce turunçgil örneklerinde virüs varlığı hem poliklonal hem de monoklonal antikor kullanılarak serolojik olarak ispatlanmıştır. Bütün tristeza izolatlarının, 672 bp büyüklüğünde kılıf protein genlerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kılıf protein genleri klonlanıp dizilimi belirlenerek hem nükleotid ve amino asit dizilerinin karşılaştırılması hem de birbirleriyle ve gen bankasındaki diğer tristeza izolatlarının kılıf protein dizileriyle karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen verilere göre İran izolatlarının, Kaliforniya SY 568 izolatı ve Japon NUagA izolatıyla büyük oranda (%97'ye varan) benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ancak kuzey ve güney bölgelerden elde edilen izolatlar arasında büyük bir ayrım görülmemiştir (Barzegar vd., 2005a).

Yine İran' da yapılan benzer bir çalışmada, Japonya' dan ithal edilen ve İran' ın kuzeyindeki turunçgil bahçelerinde yetişen virüslü Satsuma ağaçlarından alınan dört CTV izolatının biyolojik ve moleküler özellikleri araştırılmıştır. CTV enfeksiyonlu örnekler portakal ağaçlarından alınarak Alemow (*Citrus macrophylla* Wester) fidelerine aşılansmıştır. İndikatör bitkilerden bu izolatlar biyolojik olarak Meksika laymı, Alemow ve *Citrus hystrix*' te damarda beyazlaşmaya ve gövdede çukurlaşma; turunç ve greyfurt fidelerinde sararma ve büyüme geriliğine yol açmıştır. Bu turunçgil örneklerinin serolojik yöntemlerle CTV enfekteli oldukları belirlenmiştir. Bu izolatların kılıf protein geni, bütün izolatlar için 672 bp ampikon sağlayan spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Dizi analizi, İran izolatlarıyla gövde çukurlaşmasına neden olan Kaliforniya CTV SY568 izolatı arasında % 98-99 oranında dizi benzerliği olduğunu; İran izolatlarıyla fidan sararmasına neden olan Japon izolatı NUagA arasında % 97-98 oranında benzerlik olduğu ortaya çıkmıştır (Barzegar vd., 2005b).

Kıbrıs' da yapılan bir çalışmada konukçularda farklı belirtiler oluşturan 12 CTV izolatının kılıf protein gen dizisi, bilinen izolatlar ile karşılaştırılmıştır. Nükleotid dizi analizleri, bu izolatların coğrafi özelliklere göre gruplanma göstermediğini ortaya koymuştur. Tüm diziler, beş farklı grubu oluşturan önceden bilinen izolatlarla

benzerlik göstermiştir. Kıbrıs izolatlarından bazıları greyfurt ve portakalda gövde çukurlaşması simptomlarını göstermiştir. Bu izolatların Venezuela izolatı olan ve gövde çukurlaşmasına neden olan B249 izolatıyla benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir (Papayiannis vd., 2007).

Çin' in güneyinden toplanan CTV izolatlarının karakterizasyonu, turunçgil bitkilerinde biyolojik indeksleme, restriksiyon parçalarının uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve kılıf protein genlerinin bi-directional tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (BD-RT-PCR) ile yapılmıştır. Biyolojik testlerde 30 izolattan sadece iki tanesinde görünür simptomlar oluşturmazken, 28 izolat gövde çukurlaşması, damarlarda beyazlaşma, bitkilerde bodurlaşma ile Meksika laymında, Duncan greyfurtlarında ve turunç fidanlarında yapraklarda sararma simptomları oluşturmuştur. BD-PCR analizinde, N3 ve N4 izolatlarından ılımlı streynler için spesifik olan 392 bp büyüklüğünde bant elde edilirken, diğer 28 izolat için şiddetli streynlere spesifik 320 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Kılıf protein genine ait RT-PCR ürünlerinin *HinfI* restriksiyon enzimiyle kesilerek RFLP analizinde, Gillings tarafında tanımlanan yedi gruptan farklı olarak yeni bir grup daha tanımlanmıştır. On iki Çin CTV izolatından elde edilen kılıf protein gen dizileri nükleotid seviyesinde %91.5-99.7 oranında amino asit seviyesinde %94.2-99.6 oranında benzerlik göstermiştir. Çin'den elde edilen CTV popülasyonlarının kompozisyonun kılıf protein genlerinde yüksek oranda genetik çeşitlilik olduğunu göstermiştir (Jiang vd., 2008).

Meksika'da *Citrus aurantifolia*' nın yapraklarında kılıf protein genine spesifik RT-PCR yapılmıştır. Portakal ağaçlarının bazıları, poliklonal antikora yapılan başlangıç testlerinde ve CTV'ye özel monoklonal antikor MCA-13 ile yapılan takip eden testlerde pozitif sonuç vermiştir. Aynı zamanda karakteristik CTV benzeri partiküller elektron mikroskobu ile gözlemlenerek CTV enfeksiyonu doğrulanmıştır. Bu izolatlar indikatör bitkilere aşılmalıdır. Ancak indikatör bitkilerde sadece yaprak damarlarının sararması simptomsu gözlemlenmiştir. İndikatör bitkilerden birinin RNA'sı, CTV teşhisini ve PCR yöntemlerini doğrulamak ve izolatlardan birini klonlamak ve dizisini belirlemek için kullanılmıştır. Bu izolatın kılıf protein geni

spesifik primerler kullanılarak nükleotid dizileri belirlenmiştir. Tahmin edildiği gibi yaklaşık (672bp) 700 bp' lik RT-PCR ürünü elde edilmesine rağmen; beklenmedik bir şekilde kılıf protein geninin 618. pozisyonunda EcoRI kesme bölgesi bulunmuştur. CTV' nün şiddetli streynlerinde olduğu gibi (2), fenilalanin bulunmuştur. Meksika izolatlarının kılıf protein gen dizileri (U32116) ve gen bankasından alınan diğer diziler arasındaki benzerlik M76485 için %91.17 oranında, L12175 için %90.14 oranında ve S67800 için % 89.32 oranında bulunmuştur (Cepeda-Nieto vd., 1997 ).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 CTV İzolatları**

Çalışmanın ana materyalini ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Akdeniz Bölgesi'nden Adana , Mersin ve Antalya, Ege Bölgesi'nden İzmir ve Aydın, Marmara Bölgesi'nden Edremit körfezi ve Karadeniz Bölgesi'nden Rize ilinden alınan ve önceden ELISA ve ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemleriyle CTV pozitif olduğu belirlenen ve biyolojik karakterizasyonu yapılan CTV izolatları oluşturmaktadır (Korkmaz vd., 2007). CTV izolatları seçilirken her bölgeden en az iki tane olmasına ve bu izolatların farklı turunçgil türlerinden elde edilmiş olmasına dikkat edilmiştir. Kullanılan CTV izolatların özellikleri Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan CTV izolatlarının özellikleri (Korkmaz vd., 2008).

İzolat	Bitki/Anaç	Bölge	Toplama Zamanı	Belirtiler Meksika laymı	Tanılama	
					ELISA	RT-PCR
A22(BA-1)	W. Navel/Turunç	Batı Akdeniz	Şubat 2006	vc, sp?	+	+
A23(BA-2)	W. Navel/Turunç	Batı Akdeniz	Şubat 2006	vc	+	+
AD1(DA-1)	Yafa/Turunç	Doğu Akdeniz	Nisan 2006	vc	+	+
AD3(DA-2)	Yafa/Turunç	Doğu Akdeniz	Nisan 2006	vc	+	+
AD7(DA-3)	Satsuma/Turunç	Doğu Akdeniz	Nisan 2006	vc, sp (zayıf)	+	+
AD15(DA-5)	Kamquat/Turunç	Doğu Akdeniz	Nisan 2006	vc, lc, ch, sp (zayıf)	+	+
E5(EK-1)	Satsuma/ <i>P. trifoliata</i>	Edremit Körfezi	Aralık 2005	vc, lc, ch, sp (zayıf)	+	+
E11(EK-2)	Satsuma/ <i>P. trifoliata</i>	Edremit Körfezi	Aralık 2005	vc, lc, sp (zayıf)	+	+
E28(EK-5)	Satsuma/ <i>P. trifoliata</i>	Edremit Körfezi	Aralık 2005	vc, lc, sp (zayıf)	+	+
I-5(KE-1)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Kıyı Ege	Mart 2006	vc, lc, ch, sp (orta)	+	+
I-10(KE-3)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Kıyı Ege	Mart 2006	vc, sp (zayıf)	+	+
I24(KE-4)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Kıyı Ege	Mart 2006	vc, sp (zayıf)	+	+
R7(DK-1)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Doğu Karadeniz	Nisan 2006	vc, lc, ch, sp (zayıf)	+	+
R20(DK-3)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Doğu Karadeniz	Nisan 2006	vc, lc, ch, sp (zayıf)	+	+
R38(DK-4)	<i>Satsuma/P. trifoliata</i>	Doğu Karadeniz	Nisan 2006	vc, lc, sp (zayıf)	+	+

E: Edremit Körfezi , A:Antalya, I:İzmir, R:Rize, AD: Adana

<sup>2</sup> vc:yaprak ve damar açılması (vein clearing), lc:yaprak kıvrılması (leaf cupping), ch: kloroz, sp:gövde ve dal çukurlaşması(stem pitting)

### 3.2. Oligonükleotid primerler

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması için kullanılacak olan oligonükleotid primerler, kılıf protein geninin 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş bölgelere spesifik ve daha önce CTV'nün klonlanmasında kullanılan primerlerine dayanarak ME24 5' ATGGACGACGAAACAAAG 3' ve BC25 5' TCAACGTGTGTTAAATTTC 3' adı ve dizisine sahip bir çift primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler primer sentezi konusunda faaliyet gösteren bir ticari firma (Iontek) tarafından sentezlenmiştir.

### 3.3. Total RNA İzolasyonu

Turunçgil tristeza virüsü bir RNA virüsü olduğundan dolayı kılıf protein geninin çoğaltılması için öncelikle enfekteli bitkilerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla enfekteli bitkilerden toplanan genç sürgülerden 100 mg kabuk dokusu alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüpü içerisinde sıvı azot kullanılarak ezilmiştir. Ezilen kabuk dokusuna BioBasic (Kanada) firmasından sağlanan tek aşamalı RNA izolasyon solüsyonundan (One Step RNA Solution) 1 ml eklenip, vorteksle iyice karıştırılarak homojenizasyonu sağlandıktan sonra, üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda belirtildiği şekilde total RNA izolasyonu yapılmıştır. Önce örnekler 4 °C 'de 12000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüj yapılarak çözünmez bitki dokuları çöktürülerek RNA içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Tüpler 5 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra 100 µl kloroform eklenmiştir. Örnekler kloroform ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında tekrar 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra tüpler 12000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüj yapılarak faz ayrımı yapılmış ve RNA içeren (süpernatant) üst fazdan 500 µl alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine 500 µl isopropyl eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüpler 12000 g hızda 10 dakika süreyle santrifüj yapılarak RNA' lar çöktürülmüştür. Sıvı kısım atıldıktan sonra çöktürülen RNA, 1 ml %75 etil alkol ile yıkandıktan sonra tüpler 12000 g hızda 5 dakika süreyle santrifüj yapılarak RNA'ların yıkanması sağlamıştır. Etanol içeren sıvı kısım döküldükten sonra tüpler ağzı açık olarak oda sıcaklığında 5 dakika süreyle

bekletilerek çöktürülen RNA'lar kurutulmuştur. Son olarak elde edilen RNA'lar 50 µl steril saf suda çözdürülerek kullanılmaya kadar -80 °C' de saklanmıştır.

### **3.4. Kılıf Protein Genlerinin Çoğaltılması**

Kılıf protein genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır. RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lar dan Random primer ve Power Script reverse transkriptaz enzim kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla 1 µl total RNA, 200 pmol random primer 1 µl bir tüp içerisine konularak su ile 10 µl ye tamamlanmıştır. Karışım 65 °C 5 dakika bekletildikten sonra buza konulup 2 dakika bekletilerek RNA'ların denatürasyonu sağlamıştır. Denatürasyonu yapılan RNA ve primer karışımına 1X Reverse transkriptaz tampon solüsyonu (50mM Tris HCl pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 mM dNTP, 200 pmol Random primer, 20 ünite PrimerScript Reverse transkriptaz, 20 ünite RNase İnhibitörü ve su eklenerek 20 µl RT karışımı hazırlanmıştır. PCR makinesi 30 °C 10 dakika 45 °C 1 saat ve 75 °C 15 dakika daha sonra da 4°C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra sentezlenen cDNA' lardan Ex Taq DNA Polimeraz enzimi CTV kılıf protein genine spesifik BC24-25 primerleri kullanılarak kılıf protein genleri çoğaltılmıştır. Bu amaçla 1X PCR tampon solüsyonu, (50Mm KCl, 10mM Tris HCl 25 °C pH9.0, 1%Triton X-100), 2µl cDNA, 0.5 mM dNTP, 20 pmol BC24 ve BC25 primerleri ve 2.5 ünite Takara Ex Taq DNA polimeraz enzimi içeren ve su ile 50 µl' ye tamamlanan PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı 94 °C 3 dakika, 40 defa tekrarlanan 95 °C' de 30 sn 55 °C' de 30 sn ve 72°C' de 1,5 dakika, 72 °C' de 5 dakika daha sonra da 4°C' de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak kılıf protein genlerinin çoğaltılması yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri lamda *Hind* III DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Doc-It jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek 672 bp büyüklüğündeki CTV kılıf protein geninin çoğaltıldığı belirlenmiştir.

### 3.5. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan CTV kılıf protein genleri pGEM-T Easy plazmid vektörüne (Promega, ABD) T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmıştır. Klonlama işlemi üretici firmanın önerileri göz önüne alınarak aşağıdaki gibi yapılmıştır.

#### 3.5.1. Ligasyon

Ligasyon PCR 'la çoğaltılan ve klonlanacak olan kılıf protein genlerinin, pGEM-Teasy plazmid vektörü ile birleştirilmesi işlemidir. Bu aşamada PCR ile çoğaltılan CTV kılıf protein geninden çoğaltılan genin miktarını gösteren bandların yoğunluğuna bağlı olarak 2-5 µl alınarak 50 ng pGEM T easy plazmidi, 5 ünite T4 DNA ligaz enzimi ve 1X ligasyon tampon çözeltisi (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.01 M MgCl<sub>2</sub> 1 mM ATP ve 50 ug/ml bovine serum albumin) içeren 15 µl' lik ligasyon karışımına eklenerek ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 16 saat süreyle 4°C' de bekletilerek ligasyon işlemi tamamlanmıştır.

#### 3.5.2. Transformasyon

Transformasyon işlemi, ligasyon karışımının bir kısmının hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu amaçla *E. coli* bakterisinin JM109 ırkının -80°C' de dondurulmuş ve buzda çözündürülmüş competent hücrelerinden 100 µl alınarak 1.5 ml tüpe konulmuştur. pGEM-T easy plazmidi ve CTV kılıf protein genlerini içeren ligasyon karışımından 5 µl alınarak tüplerdeki *E. coli* JM109 competent hücrelere eklenerek 30 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Daha sonra karışım 42°C' de 90 saniye süreyle bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır ve tekrar birkaç dakika buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

### 3.6. Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Transformasyonu yapılan bakterilere SOC bakteriyel sıvı besi ortamından (2% bacto-trytone, 0.5% bacto-yeast ekstrakt, 0.05 M NaCl, 0.01M KCl, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 0.01M MgSO<sub>4</sub> ve 0.2M glukoz) 1 ml eklenerek bakteriler 37° C’ de 220 devir/dakika hızla çalkalamalı inkübatörde 1 saat süreyle büyütülmüştür. Son olarak büyütülen bakteriler 60 µg/ml ampisilin ve 20mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-galactopyranoside (X gal) maddesi içeren 2X YT (yeast extract trytone) katı ortamı (2 % bacto-trytone, 0.5 % bacto-yeast ekstrakt, 0.05 M NaCl,) bulunan petri kaplarına ekilerek 37°C’ de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. CTV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler 100 µg/ml ampisilin ve 20 mg/ml X gal maddesi içeren 2X YT katı ortamında büyüyerek beyaz renkli koloniler oluştururken, sadece pGEM-T Easy plazmidini içerenler ise mavi renkli koloniler oluşturacağından dolayı rekombinant yani CTV kılıf protein genini içeren ve içermeyen bakteri kolonileri renklerine göre belirlenmiştir. Böylece CTV kılıf protein genini içeren plazmidleri taşıyan beyaz kolonilerin seçimi yapılmıştır.

### 3.7. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi

Mavi-beyaz koloni seçimi istenilen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde yararlı olmasına rağmen bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazı beyaz kolonilerde istenilen geni içermeyebilir. Bu nedenle oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten CTV kılıf protein genini taşıyan pGEM-T easy plazmidini içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan koloni PCR yöntemiyle taranarak daha kesin olarak belirlenmiştir. Bu amaçla önce elde edilen beyaz koloniler steril bir pipet ucuyla alınarak 2X YT ortamı içeren yeni bir petri kabına 1 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde bir alana çizme yoluyla inokule edilerek 37 °C de 16 saat boyunca büyütüldükten sonra kullanılmak üzere 4 °C’ de saklanmıştır. Daha sonra 1X PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris HCl 25 °C pH9.0, 1%Triton X-100), 10mM dNTPs, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol plazmid TA klonlaması yapılan bölgenin alt ve üst kısımlarına spesifik universal M13R ve M13F primerleri ve 2.5 ünite Taq

DNA polimeraz (Bioron, Almanya) eklenerek PCR karışımı hazırlanıp PCR tüplerine konulmuştur. Koloni PCR için hazırlanıp PCR tüplerine konulan karışıma çizilerek büyütülen beyaz renkli bakteri kolonilerinden steril bir pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Bakteri eklenen koloni PCR karışımı 94 °C de 3 dakika 40 defa tekrarlanan 94 °C de 30 saniye, 50°C de 30 saniye, 72 °C de 1 dakika ve 72°C de 5 dakika daha sonra da 4 °C de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinasında yapılmıştır. Her bir izolat için en az beş beyaz koloni seçilerek koloni PCR yöntemiyle test edilmiştir. Koloni PCR' ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri *Hind* III DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jeline elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Doc-It jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

### **3.8. Plazmid İzolasyonu**

Koloni PCR' dan elde edilen sonuçların elektroforez yöntemiyle analiz edilmesinden sonra CTV kılıf protein genini içeren pGEM-T easy plazmidini içerdiği kesin olarak belirlenen koloniler seçilerek bunlardan plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir izolat için koloni PCR' da pozitif sonuç veren en az iki koloni seçilerek plazmid izolasyonu yapılmıştır. Her bir CTV izolatu için koloni PCR sonuçlarına göre seçilen koloniler, 60 µg/ml ampisilin içeren 5 ml 2X YT sıvı besi ortamına inokule edilerek 37°C' de 16 saat boyunca 220 devir/dakika hızda çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Steril bir mikrofuj tüpüne 1000 µl gliserol ve 1000 µl büyütülen bakterilerden alınarak gliserol stokları hazırlanmıştır. Geriye kalan kısmı BioBasic firmasından (Kanada) sağlanan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır

Bakteri hücrelerinin parçalanması için her bir örneğe 100 µl solüsyon I eklenip 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Parçalanmayan bakteri hücrelerini tamamen parçalamak için 200 µl solüsyon II eklenip tekrar 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Örnekler 12000 g ve 4 °C'de 5 dakika santrifuj yapıp kolona dökülmüştür. Kolonlar 10000 g ve 4 °C'de 2 dakika santrifuj yapılmıştır. Daha sonra

plazmidi diğer maddelerden temizlemek için yıkama solüsyonu eklenip yine 10000 g ve 4 °C de 2 dakika süreyle santrifüj yapılmıştır. İstenmeyen maddeleri tamamen uzaklaştırmak ve daha temiz bir plazmid elde edebilmek için yıkama solüsyonu ekleme işlemi tekrarlanmış ve son olarak 50 µl elution tampon solüsyonu eklenerek plazmid saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

### **3.9. EcoR I Restriksiyon Enzimiyle Kesme (Digestion) İşlemi**

Elde edilen bu pGEM-T Easy plazmit DNA'larından 10 µl, 20000 ünite *EcoR I* enzimi, 1X *EcoR I* enzimi tampon solüsyonu ve 0.2 µl bovine serum albumin (BSA) ve steril saf su eklenerek bir tüp içerisinde toplam 20 µl' lik bir digestion karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 37 °C' de 16 saat bekletilerek plazmitlerin kesilme işlemi yapılmıştır. *EcoR I* enzimiyle kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA'lar *HindIII* DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Doc-It jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve 672 bp' lik CTV CP genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir.

### **3.10. Kılıf Protein Geninin Dizisinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması**

CTV kılıf protein genlerini kesin olarak taşıdıkları belirlenen saflaştırılmış plazmidlerden bir tanesi seçilerek CTV kılıf protein genlerinin dizilimi yapılmıştır. DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. DNA dizilimi pGEM-T Easy plazmidinin T-A klonlama bölgesinin yaklaşık 50 bp üst ve alt kısmındaki bölgelere spesifik M13F ve M13R universal primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla yapılmıştır. Her bir izolat için bir klonun iki yönden M13F ve M13R primerleri kullanılarak CTV kılıf protein geninin dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen ham DNA dizilimleri Vector NTI DNA dizi analiz programına aktararak öncelikle pGEM-T easy plazmid vektörüne ait DNA dizileri temizlenerek CTV kılıf protein genine ait nükleotid dizilimi elde edilmiştir. Daha sonra nükleotid diziliminden yararlanılarak CTV kılıf protein geninin amino asit dizilimleri elde edilmiştir. Ülkemizin farklı

turunçgil üretim bölgelerinden alınan izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri Alingn X programında çoklu dizi karşılaştırma yapılarak birbirleriyle olan benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Daha sonra gen bankasında DNA ve protein veri tabanlarında araştırma yapılarak dünyanın farklı turunçgil üretim bölgelerinde elde edilen CTV izolatlarına ait kılıf protein geni nükleotid ve amino asit dizileri elde edilmiştir. Bu diziler ülkemizin farklı turunçgil üretim alanlarından elde edilen izolatların kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileriyle AlingnX programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ülkemizdeki tüm CTV izolatlarının dünya izolatlarıyla benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Ayrıca ülkemizde bölgesel olarak elde edilen CTV izolatlarının kendi aralarında benzerlik gösterip göstermediği ve benzerlik oranları yine yüzde olarak belirlenmiştir.

### **3.11 Kılıf Protein Geninin Filogenetik Analizi**

Ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden alınan CTV izolatlarının Alingn X programında çoklu nükleotid ve amino asit dizi karşılaştırmaları yapılan CTV kılıf protein genine ait çoklu karşılaştırma dosyaları Clotal X programına aktararak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik analiz verileri kullanılarak Kiamura iki parametre alogaritması uygulanan neighbor-joining ve UPGMA yöntemleriyle filogenetik soy ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiki olarak belirlemek amacıyla 1000 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmıştır. Son olarak oluşturulan soy ağaçları TreeView soy ağacı görüntüleme programı kullanılarak görüntülenerek ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden toplanan CTV izolatlarının birbiriyle yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Aynı şekilde dünyanın diğer turunçgil üretim bölgelerinden elde edilen izolatların gen bankasında bulunan kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilerinin çoklu karşılaştırmaları yukarıda belirtildiği gibi filogenetik analizlere tabi tutularak soy ağaçları oluşturularak TreeView programında görüntülenmiştir.

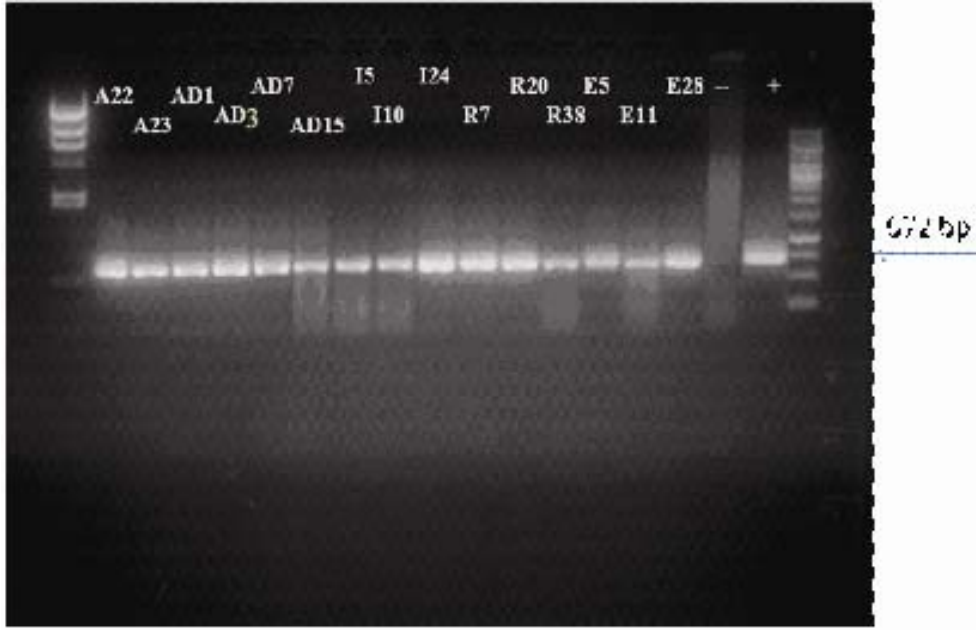
## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1.Total RNA İzolasyonu

Turunçgil tristeza virüsü bir RNA virüsü olduğundan dolayı kılıf protein geninin çoğaltılması için öncelikle enfekteli bitkilerden elde edilen total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu tek aşamalı RNA solüsyonu (Biobasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen toplam RNA'ların niteliğini ve miktarını belirlemek amacıyla RNA'ların bir kısmı %1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak görüntülenmiştir. Jelde ayrıştırılan toplam RNA'lar incelendiğinde 28S ve 18S ribozomal RNA'larının belirgin bantlar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu örneklerden başarılı bir şekilde total RNA izolasyonunun yapıldığı ve elde edilen RNA'ların parçalanmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar enfekteli bitki dokularından izole edilen toplam RNA'ların bitki RNA'ları yanında CTV' üne ait genomik ve subgenomik RNA'ları da içerdiğini ve CTV' nün kılıf protein geninin çoğaltılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

### 4.2.Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan iki aşamalı tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak önce random primer ile tamamlayıcı (komplementer) DNA (cDNA) sentezlenmiştir daha sonra kılıf protein geninin 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş bölgelere spesifik BC24 ve BC25 primerleri kullanılarak ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden elde edilen CTV izolatlarının kılıf protein genleri PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. RT-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin bir kısmı lamda *Hind* III DNA büyüklük markörüyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sağlıklı turunçgil bitkisinden elde edilen toplam RNA'da herhangi bir bant çoğaltılamazken pozitif kontrol olarak kullanılan CTV Iğdır izolatu ve farklı bölgelerden elde edilen 15 izolatu içeren örneklerden elde edilen toplam RNA'ların hepsinden 672 bp büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir. Ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden elde edilen CTV izolatlarının RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan kılıf

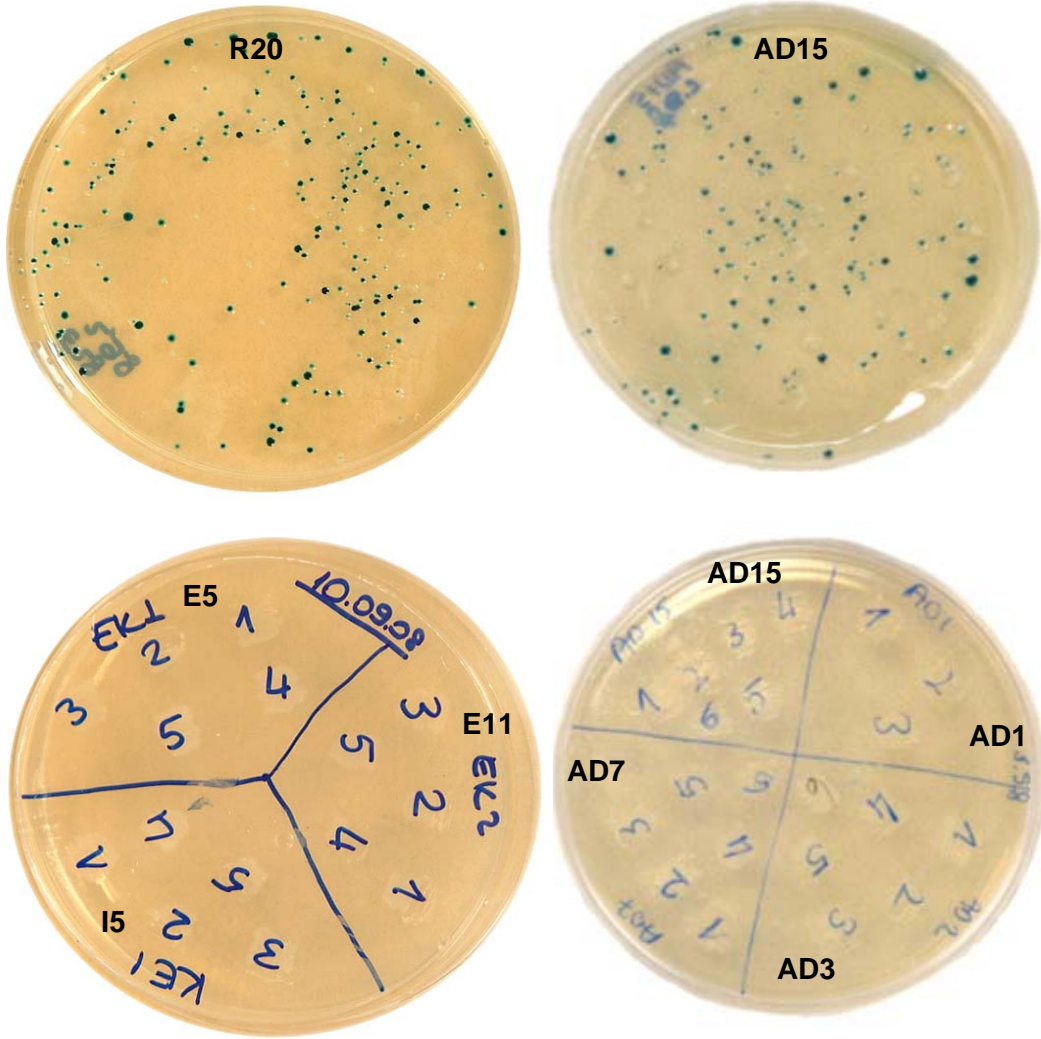


Şekil4.1. Farklı turunçgil üretim alanlarından elde edilen 15 farklı Turunçgil tristeza virüs izolatlarından 672 bp büyüklüğünde kılıf protein geninin çoğaltıldığını gösteren agaroz jel fotoğrafı. – negatif kontrol olarak kullanılan sağlıklı turunçgil örneğini, + ise pozitif kontrol olarak kullanılan I izolatını göstermektedir. A: Antalya, AD; Adana I: İzmir R: Rize ve E: Edremit M1: Lamda Hind III DNA büyüklük markörü M2: 1 kb DNA büyüklük markörü.

protein genleri Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Tüm izolatlardan çoğaltılan kılıf protein genlerinin büyüklüğü aynı olmasına rağmen farklı izolatlardan çoğaltılan bantların yoğunluklarında bazı farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıkların total RNA izolasyonunda kullanılan enfekteli dokularda bulunan virüs miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sağlıklı bitki dokusundan elde edilen toplam RNA’dan herhangi bir bant elde edilmemişken enfekteli dokulardan elde edilen RNA’ların tamamından 672 bp büyüklüğündeki bandın elde edilmesi CTV kılıf protein geninin spesifik olarak çoğaltıldığını göstermiştir.

### 4.3. Kılıf Protein Genlerinin Klonlanması ve DNA Dizilemesi

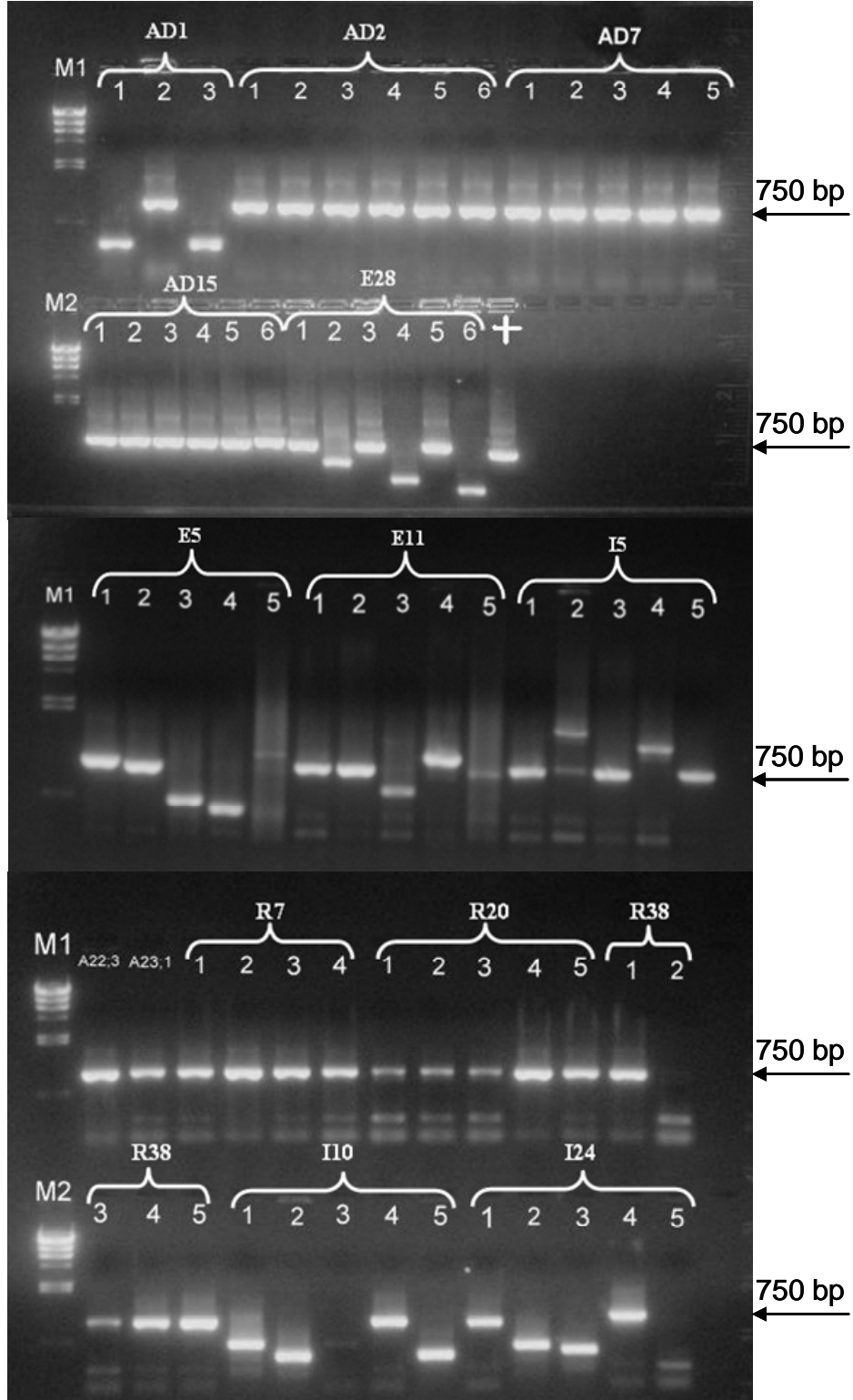
RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan CTV izolatlarının kılıf protein genleri T-A klonlaması yöntemiyle yapılmıştır. T-A klonlama yöntemi *Taq* DNA polimeraz gibi 3’→5’ eksonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla yapılan PCR çoğaltımı sırasında çoğaltılan DNA’ların 3’ ucuna fazladan bir Adenin (A) eklenmesine dayalıdır. Bu şekilde çoğaltılan 3’ ucunda fazladan bir A içeren DNA’lar 5’ ucunda bir tane Timin (T) taşıyan T-A klonlama vektörleri olarak adlandırılan plazmidlerle birleştirilerek PCR ürünlerinin DNA ligaz enzimi yardımıyla plazmid vektörlerine klonlanması sağlanmaktadır. Ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden elde edilen izolatların kılıf protein genleri yukarıda belirtildiği gibi iki aşmalı RT-PCR kiti kullanılarak yapılmıştır. PCR aşamasında *Ex Taq* DNA polimeraz (Takara, Japonya) enzimi kullanıldığından dolayı PCR’ da çoğaltılan CTV kılıf protein genlerine ait cDNA’ ların 3’ uçlarına çoğaltım sırasında fazladan bir A eklenmiştir. Bu DNA’lar 5’ ucunda fazladan bir T içeren pGEM T Easy (Promega, ABD) T-A klonlama plazmid vektörüne T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak klonlanmıştır. CTV kılıf protein genlerini içeren pGEM T easy plazmidler ısı şoku transformasyon yoluyla *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin ve X-gal içeren 2X YT besi ortamına ekilerek ampisilin antibiyotikine dayanıklılık ve mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla CTV kılıf protein genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu yapılmıştır. Bu seleksiyon sonucunda çok sayıda mavi ve beyaz bakteri kolonileri



Şekil 4.2. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterilerinin ampisilin ve X-gal içeren 2X YT besi ortamında oluşturdukları kolonileri gösteren fotoğraf.

elde edilmiştir. Elde edilen mavi koloniler CTV kılıf protein geni taşımayan pGEM-T easy plazmidlerini içermekte olup klonlamanın gerçekleşmediğini yani CTV kılıf protein genleri ile pGEM-T Easy plazmidinin birleştirilemediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise CTV kılıf protein geni taşıyan pGEM Teasy plazmidlerini içermekte olup klonlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Farklı CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin klonlanması sonucunda her bir izolat için çok sayıda mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir. Farklı izolatlar için farklı sayılarda mavi ve beyaz koloniler görülmesine rağmen her izolat için yeterli sayıda kılıf protein genini içerdiği düşünülen beyaz koloni elde edilmiştir. Bazı izolatların kılıf protein genlerinin klonlanması sonucu elde edilen koloniler Şekil 4.2’ de gösterilmektedir. Seçilen beyaz kolonilerin daha sonra kullanılmak üzere tekrar büyütüldüğü mastır petri kapları da Şekil 4.2’ de gösterilmektedir.

Mavi-beyaz koloni seleksiyonu klonlanan genleri içeren bakterilerin belirlenmesinde kullanılmasına rağmen beyaz kolonilerin istenilen CTV kılıf protein genlerini gerçekten içerip içermediğini kesin olarak belirlemek amacıyla beyaz kolonilerin koloni PCR yöntemiyle taraması yapılmıştır. Bu amaçla her bir izolat için elde edilen beyaz kolonilerden en az beş tanesi seçilerek pGEM-T easy plazmidine spesifik M13F (ileri) ve M13R (geri) primerleri kullanılarak bunlardan primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan ve plazmid içerisindeki CTV kılıf protein genini ve vektör dizilerini içeren DNA’ nın çoğaltılması yapılmıştır. Her bir izolat için en az 5 beyaz koloninin koloni PCR yöntemiyle taraması yapılmış ve her bir izolatın kılıf protein genini içeren en az iki beyaz koloni belirlenene kadar taramalara devam edilmiştir. Koloni PCR’ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri DNA büyüklük markörleriyle birlikte % 1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir. Farklı CTV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR sonuçları Şekil 4.3’ de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde bazı izolatlar için taranan tüm kolonilerin yaklaşık 750 bp’ lik bir DNA bantı çoğaltılarak pozitif sonuç verdiği yani hepsinin CTV kılıf protein geni içerdiği belirlenmiştir. Bazı izolatlar (AD1, E5, E11, E28, I5, I10 ve I24) için yapılan taramalarda beyaz kolonilerin bazılarında 750 bp’lik bant çoğaltılarak



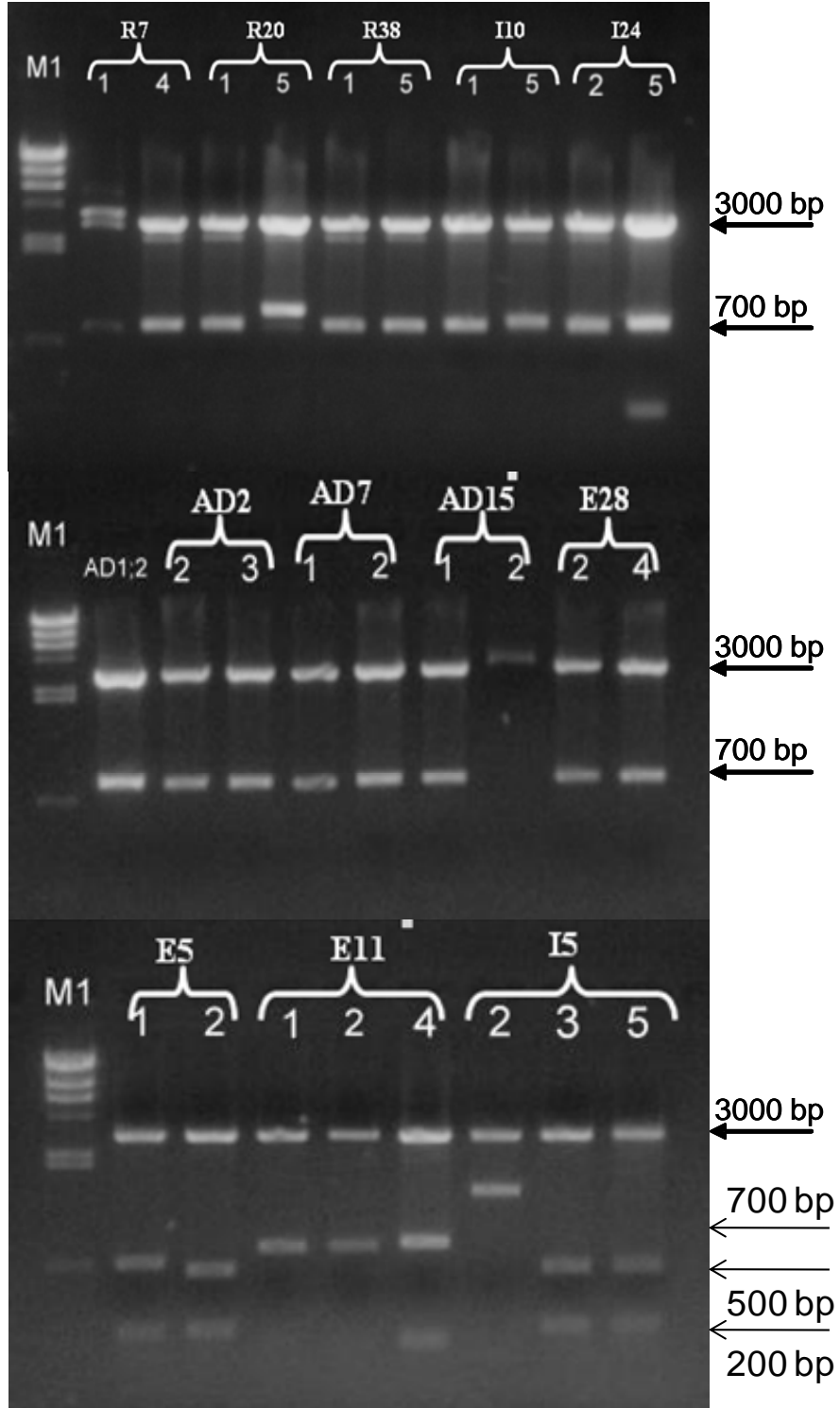
Şekil 4.3. Farklı CTV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR ile bazı izolatlardan 750 bp'lik bantların elde edildiğini gösteren jel fotoğrafları.

pozitif sonuç elde edilirken bazılarında ise daha küçük bir DNA bantı çoğaltılarak negatif sonuç verdiği yani CTV kılıf protein geni içermediği belirlenmiştir.

Koloni PCR' da pozitif sonuç vererek CTV kılıf protein genlerini içerdiği kesin olarak belirlenen beyaz kolonilerden her bir izolat için beş tanesi seçilerek ampisilin içeren 2X YT sıvı ortamı içerisinde 37°C' de çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca büyütülmüştür. Bunların hepsinden bir kısmı alınarak gliserol stok hazırlanıp daha sonra kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Büyütülen ve gliserol stokları hazırlanan bakteri kolonilerinden ikisi seçilerek bunlardan MiniPrep plazmid DNA izolasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Elde edilen bu plazmid DNA' lar A-T klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *EcoRI* restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden kesim yaparak klonlanan DNA parçasını plazmidden ayıran *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Kesilen DNA' lar daha sonra %1' lik agaroz jelinde büyüklük markörleriyle birlikte yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında incelendiğinde pozitif olan yaklaşık 3000 bp büyüklüğünde pGEM-T Easy plazmid DNA' sı ve yaklaşık 700 bp büyüklüğünde CTV kılıf protein genine ait bant elde edildiği görülmüştür. Tüm CTV izolatlarının kılıf protein genlerini içeren plazmidlerin *EcoRI* enzimiyle kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.4' de gösterilmiştir. Bu sonuçlar yakından incelendiğinde bazı izolatlardan (E5, E11 ve I5) 700 bp bant yerine daha küçük iki bant olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Bu sonuçlar bu CTV izolatlarının kılıf protein genlerinde *EcoRI* enzimi kesme bölgesinin bulunduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda ise klonladığımız izolatların CTV kılıf protein genini taşıdıkları kesinleşmiştir.

Saflaştırılan ve *EcoRI* enzimiyle kesilerek CTV kılıf protein genini taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden bir tanesi seçilerek DNA dizilimi belirlenmesi amacıyla Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. CTV kılıf protein genlerini içeren pGEM-T Easy plazmidlerinin DNA dizilimi M13F ve M13R primerleri kullanılarak döngü dizileme yöntemiyle otomatik DNA dizileme cihazıyla



Şekil4.4. *EcoRI* restiriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pGEM-T Easy plazmitlerinin CTV kılıf protein genini içerdiğini gösteren jel fotoğrafları.

yapılmıştır. Her bir izolat için elde edilen DNA dizilerinden öncelikle plazmide ait bölgeler temizlenerek CTV kılıf protein genine ait diziler elde edilmiştir. Elde edilen DNA dizileri Vector NTI (Invitrogen, ABD) dizi analiz programlarında incelenmiştir.

#### **4.4.Kılıf Protein Genlerinin Dizi Analizi**

##### **4.4.1.Nükleotid Dizi Analizi**

Ülkemizde farklı bölgelerden alınan CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatların kılıf proteinleri arasında % 91-100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu bulunmuştur. En çok benzerlik %100'ük oranla Edremit Körfezinden Satsuma mandarinden E28 izolatı ile Rize'den yine Satsuma ağaçlarından alınan R20 izolatı arasında olduğu belirlenmiştir. R20 izolatı daha sonra en fazla benzerliği %99' luk oranla İzmir bölgesinden alınan I10 Satsuma izolatıyla göstermiştir. R20 izolatı en fazla benzerliği E28 ve I10 izolatıyla gösterirken aynı bölgeden alınan R38 izolatı %98' lik benzerlik oranıyla en fazla benzerliği Edremit Körfezi ve Kıyı Ege Bölgelerinden alınan E11, I5 ve I24 Satsuma izolatlarıyla göstermiştir. İzolatlar bölgelere göre incelendiğinde aynı bölgeden alınan izolatlar arasında en fazla benzerlik %99' luk oranla Antalya ilinden Washington Navel portakalında alınan A22 ile A23 izolatları arasında görülmüştür. Çalışılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri nükleotid dizi benzerlikleri Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Kılıf protein geni nükleotid dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlardan en çok farklılık gösteren Çukurova Bölgesinden Yafa portakal ağacından alınan AD1 izolatı olmuştur. Bu izolat Edremit Körfezinden alınan E5 ve E28 ve Kıyı Ege Bölgelerinden alınan I5 ve I10 izolatlarıyla sadece %91 benzerlik göstermiştir. AD1 izolatı aynı bölgeden bir kamkat bitkisinden alınan AD15 izolatıyla da sadece %92 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın aynı izolat Çukurova bölgesinden alınan AD3 ve AD7, Rize'den toplanan R20, Edremit körfezinde bulunan E11 ve Kıyı Ege bölgesinden alınan I24 izolatlarıyla %97 gibi yüksek bir

Çizelge 4.1 Ülkemizdeki CTV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

İzolat Adı	R20 CPG	E28 CPG	I10 CPG	E5 CPG	I5 CPG	AD15 CPG	R7 CPG	A22 CPG	A23 CPG	AD1 CPG	AD3 CPG	AD7 CPG	R38 CPG	E11 CPG	I24 CPG
R20 CPG		100	99	97	97	93	92	93	93	91	92	92	93	93	92
E28 CPG			98	97	97	92	92	93	93	91	92	92	93	93	92
I10 CPG				97	96	92	92	93	93	91	93	92	93	92	93
E5 CPG					99	91	93	92	92	91	91	92	92	93	92
I5 CPG						91	93	93	93	91	92	92	93	93	93
AD15 CPG							93	94	94	92	94	93	94	93	93
R7 CPG								96	96	95	96	96	96	97	97
A22 CPG									99	96	97	97	97	98	98
A23 CPG										96	97	97	97	98	98
AD1 CPG											97	97	97	97	97
AD3 CPG												98	99	98	98
AD7 CPG													98	98	98
R38 CPG														99	99
E11 CPG															99

oranda benzerlik göstermiştir. Ayrıca Adana civarında bir kamkat bitkisinden alınan AD15 izolatu da E5 ve I5 izolatlarıyla %91 oranında benzerlik göstererek en çok farklılık gösteren izolatlardan biri olmuştur.

Gen bankası veritabanlarında dünyanın farklı turuncgil üretim bölgelerinden elde edilen yaklaşık 200 farklı izolatu kılıf protein geninin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında bulunan bu CTV protein genlerinin nükleotid dizimleri alınarak ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimiyle karşılaştırarak ülkemizde bulunan CTV izolatlarının diğer uluslararası izolatlarla benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz CTV izolatlarının dünya izolatlarıyla %89-99 arasında değişen oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 14 CTV izolatuyla en çok benzerlik gösteren beş uluslararası izolatu isimleri, ülkeleri ve bunların benzerlik oranları Çizelge 4.1' de gösterilmiştir. Çizelge yakından incelendiğinde nükleotid dizi benzerliği bakımından ülkemiz izolatlarından A23, AD1, AD3, AD7, R7, R38, E11, I24' le en çok benzerlik gösteren izolatu %97-99 arasında değişen oranlarla Portekiz' den Klou 19-21 olduğu bulunmuştur. Diğer izolatlardan üç tanesi (I10, ve R20, E28) en çok benzerliği %98 ve %99 oranlarıyla İtalya' dan CTV0032 izolatuyla göstermişlerdir. AD15 ve E5 izolatlarının en çok benzerliği sırasıyla %98 ve %99 oranlarıyla ABD'den AT9-12 ve CH-P117 izolatlarıyla gösterdikleri belirlenmiştir. Geriye kalan A22 ve I5 izolatları ise en çok benzerliği sırasıyla Güney Kore'den Pfam01785 (%99) ve Küba'dan CPC4IJ-12 (%98) göstermiştir. Ayrıca Meksika'dan TAM11, Yeni Zelanda'dan NZRB1 ve CB6, İran'dan Kaaz ve TN1, Çin'den CHN-N3, Arjantin'den C257-9, Yunanistan'dan G17 ve G73, İspanya'dan B35 ve Kıbrıs'tan CY95 14-46 ve CY92 57-52 izolatları ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CTV izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren beş izolat içerisinde yer aldıkları belirlenmiştir. Diğer taraftan Portekiz'den Strain 2-98, Hindistan, CTV-Delhi, Arjantin' den C257-2 klon2, Çin'den JX1-1, Kıbrıs'tan CY89-60-36 izolatları nükleotid dizi benzerliği bakımından ülkemiz CTV izolatlarıyla en az benzerlik gösteren izolatlar oldukları bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Ülkemizdeki CTV izolatları ile dünyadaki CTV izolatlarının nükleotid dizilerinin benzerlik oranları

İzolat Adı	I	II	III	IV	V
A22	Güney Kore Pfam01785 %99	Portekiz Klon 19-11 %98	Yeni Zelanda CB6 %98	Meksika TAM11 %97	İran Kaaz %97
A23	Portekiz Klon 19-21 %98	Güney Kore Pfam01785 %98	Yeni Zelanda CB6 %98	Meksika TAM11 %97	İran Kaaz %97
AD1	Portekiz Klon 19-21 %97	Güney Kore Pfam01785 %96	Meksika TAM11 %96	Yeni Zelanda NZRB1 %95	İran TN1 %95
AD3	Portekiz Klon 19-21 %98	Meksika TAM11 %98	Yeni Zelanda NZRB1 %97	Güney Kore Pfam01785 %96	Arjantin C257-9 %96
AD7	Portekiz Klon 19-21 %98	Güney Kore Pfam01785 %97	Yeni Zelanda NZRB1 %97	Meksika TAM11 %97	İran Kaaz %97
AD15	ABD AT9-12 %98	Kıbrıs CY92-57-52 %96	Güney Kore Pfam01785 %94	Portekiz Klon 19-21 %93	Meksika TAM11 %93
R7	Portekiz Klon 19-21 %97	İran TN1 %97	Yeni Zelanda NZRB1 %97	Meksika TAM11 %96	Güney Kore Pfam01785 %96
R20	İtalya CTV0032 %99	Yunanistan G73 %99	Küba CPC4IJ-12 %98	İran TN1 %98	Çin CHN-N3 %98
R38	Portekiz Klon 19-21 %99	Meksika TAM11 %98	İran Kaaz %98	Yeni Zelanda NZRB1 %98	Güney Kore Pfam01785 %97
E5	ABD CH-P117 %99	Küba CPC4IJ-12 %98	Yunanistan G17 %98	İran TN1 %98	Çin CHN-N3 %98
E11	Portekiz Klon 19-21 %99	Yeni Zelanda NZRB6 %99	Meksika TAM11 %98	İran Kaaz %98	Arjantin C257-9 %98
E28	İtalya CTV0032 %99	Yunanistan G73 %99	Küba CPC4IJ-12 %98	İran TN1 %98	Çin CHN-N3 %98
I5	Küba CPC4IJ-12 %98	Portekiz Klon 19-21 %98	İspanya B35 %98	Çin CHN-N3 %98	İran TN1 %98
I10	İtalya CTV0032 %98	Yunanistan G17 %98	İran TN1 %97	İspanya B35 %98	Çin CHN-N3 %97
I24	Portekiz Klon 19-21 %99	Yeni Zelanda NZRB1 %98	Meksika TAM11 %98	İran Kaaz %98	Kıbrıs CY95 14-46 %98

#### 4.4.2. Amino Asit Dizi Analizi

Ülkemizde farklı bölgelerden alınan CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında izolatların kılıf proteinleri arasında %90 ile %100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu bulunmuştur. Çalışılan tüm izolatların birbirleriyle gösterdikleri nükleotid dizi benzerlikleri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. En çok benzerlik %100' lük oranla sırasıyla Edremit Körfezi, Kıyı Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinden alınan Satsuma izolatlarından E11, I24, ve R38 izolatları arasında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sırasıyla Edremit Körfezi ve Kıyı Ege Bölgesinden Satsuma izolatları E5 ve I5 ve Edremit Körfezinden alınan E28 ve Rize'den alınan R20 izolatlarının kılıf protein genleri de %100 benzerlik göstererek en çok korunmuş izolatlar olarak belirlenmiştir. %100 oranla en çok benzerlik gösteren çok sayıda izolat olmasına rağmen bu izolatlardan hiçbiri kendi bölgesindeki izolatlarla %100 benzerlik göstermeyip farklı bölgelerden izolatlarla göstermiştir. Bu benzerlikler daha çok Satsuma mandarin yetiştiriciliğinin yapıldığı Edremit Körfezi, Kıyı Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinden alınan izolatlar arasında bulunmuştur. İki Antalya izolatı A22 ve A23 nükleotid dizi karşılaştırılmasında aynı bölgeden olan izolatlar arasında en çok dizi benzerliği gösterirken amino asit diziliminde kendi aralarında %98 oranında benzerlik gösterirken Edremit Körfezinden E11 ve Doğu Karadeniz Bölgesinden R38 izolatlarıyla daha fazla (%99) benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Kılıf protein geni amino asit dizi karşılaştırmasına göre tüm izolatlar içerisinde %90 oranla en az benzerliğin Doğu Akdeniz Bölgesinde bir Yafa portakal ağacından alınan AD1 ve yine aynı bölgeden bir kamkat ağacından alınan A15 izolatları arasında olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlarla karşılaştırıldığında diğer izolatların kılıf protein genlerinin amino asit dizilimiyle %90 ile %95 arasında benzerlik gösteren AD1 izolatı bu çalışmada araştırılan izolatlar arasında en farklı izolat olarak belirlenmiştir. AD15 en düşük (%90) benzerlik gösterdiği AD1 izolatı yanında diğer izolatlarla %93 ile %95 oranında benzerlik göstererek en farklı ikinci izolat olmuştur

Çizelge 4.3. Ülkemizdeki CTV izolatlarının aminoasit dizilerinin benzerlik oranları

<b>İzolat Adı</b>	<b>CTV A22 CP</b>	<b>CTV A23 CP</b>	<b>CTV AD1 CP</b>	<b>CTV AD7 CP</b>	<b>CTV AD15 CP</b>	<b>CTV E28 CP</b>	<b>CTV R20 CP</b>	<b>CTV I10 CP</b>	<b>CTV E5 CP</b>	<b>CTV I5 CP</b>	<b>CTV R7 CP</b>	<b>CTV AD3 CP</b>	<b>CTV I24 CP</b>	<b>CTV E11 CP</b>	<b>CTV R38 CP</b>
A22 CP		98	94	97	94	96	95	94	95	96	96	96	98	99	99
A23 CP			94	97	93	95	94	94	95	96	96	96	98	99	99
AD1CP				95	90	91	91	91	92	92	93	93	95	95	95
AD7CP					95	94	93	94	95	96	96	96	98	99	99
AD15CP						94	94	94	94	95	95	95	94	94	94
E28 CP							100	97	97	97	96	92	95	95	95
R20 CP								97	96	97	96	92	95	95	95
I10CP									96	96	95	93	94	95	95
E5 CP										100	98	93	96	96	96
I5 CP											98	94	96	97	97
R7CP												95	97	98	98
AD3CP													96	97	97
I24CP														100	100
E11 CP															100

Dünyanın farklı turunçgil üretim bölgelerinden elde edilen ve Gen bankası veri tabanlarında kılıf protein gen dizilimi bulunan 200 farklı izolatın kılıf protein genlerinin amino asit dizimleri alınarak ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimiyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda ülkemizde bulunan CTV izolatlarının diğer uluslararası izolatlarla benzerlik oranları amino asit düzeyinde de belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz CTV izolatlarının dünya izolatlarıyla 89-100% arasında değişen oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 15 CTV izolatın amino asit diziliminde en çok benzerlik gösteren beş uluslararası izolatın isimleri, ülkeleri ve bunların ülkemiz izolatlarıyla benzerlik oranları Çizelge 4.3' de verilmiştir. Sonuçlar yakından incelendiğinde ülkemiz izolatları beş tanesinin amino asit dizilimi bakımından sayı olarak en fazla Portekiz izolatlarının kılıf protein genleriyle benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu izolatlardan Antalya'dan portakal ağacından alınan A22 ve A23 ve İzmir bölgesinden Satsuma ağacından alınan I24 izolatı Portekiz' den Klon 6.5 %98-99 arasında değişen oranlarla en fazla benzerlik gösterirken Rize ve Edremit Körfezinden alınan R38 ve E11 izolatları sırasıyla %99 ve %100 oranıyla en çok benzerliği Portekiz'den 19-21 izolatıyla göstermiştir. Çalışılan 15 izolat içerisinde Edremit Körfezinden alınan E11 ve E28 sırasıyla Portekiz'den 19-21 ve Yunanistan'dan G73 izolatlarıyla %100 benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Aynı şekilde Rize' den alınan R38 ve İzmir bölgesinden alınan I5 izolatları sırasıyla Portekiz' den 19-21 ve İspanya' dan B35 izolatlarıyla %100 benzer olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan dört tanesi (I10, R20, E5 ve E28) en çok benzerliği %96 ve %100 oranlarıyla Yunanistan' dan G17 veya G73 izolatıyla göstermişlerdir. Bunun yanında Adana'dan alınan AD3 ve AD7 yanında Rize'den alınan R7 izolatı %96 ile %99 arasında değişen oranlarla en çok benzerliği Yeni Zelanda' dan NZRB 11 izolatıyla göstermiştir. Geriye kalan AD1 ve AD15 izolatları ise en çok benzerliği sırasıyla %95 oranında Hırvatistan' dan FN-D ve %95 oranında Mısır' dan Qaha izolatıyla göstermişlerdir. Ayrıca Meksika' dan Colima 1997, İran' dan TN2, Çin' den JX-1-1, Florida' dan T36 FS2-2 , İtalya' dan 0032, Portekiz' den Klon 25-20, ve Sırbistan' dan TN6-31 izolatlarının ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen

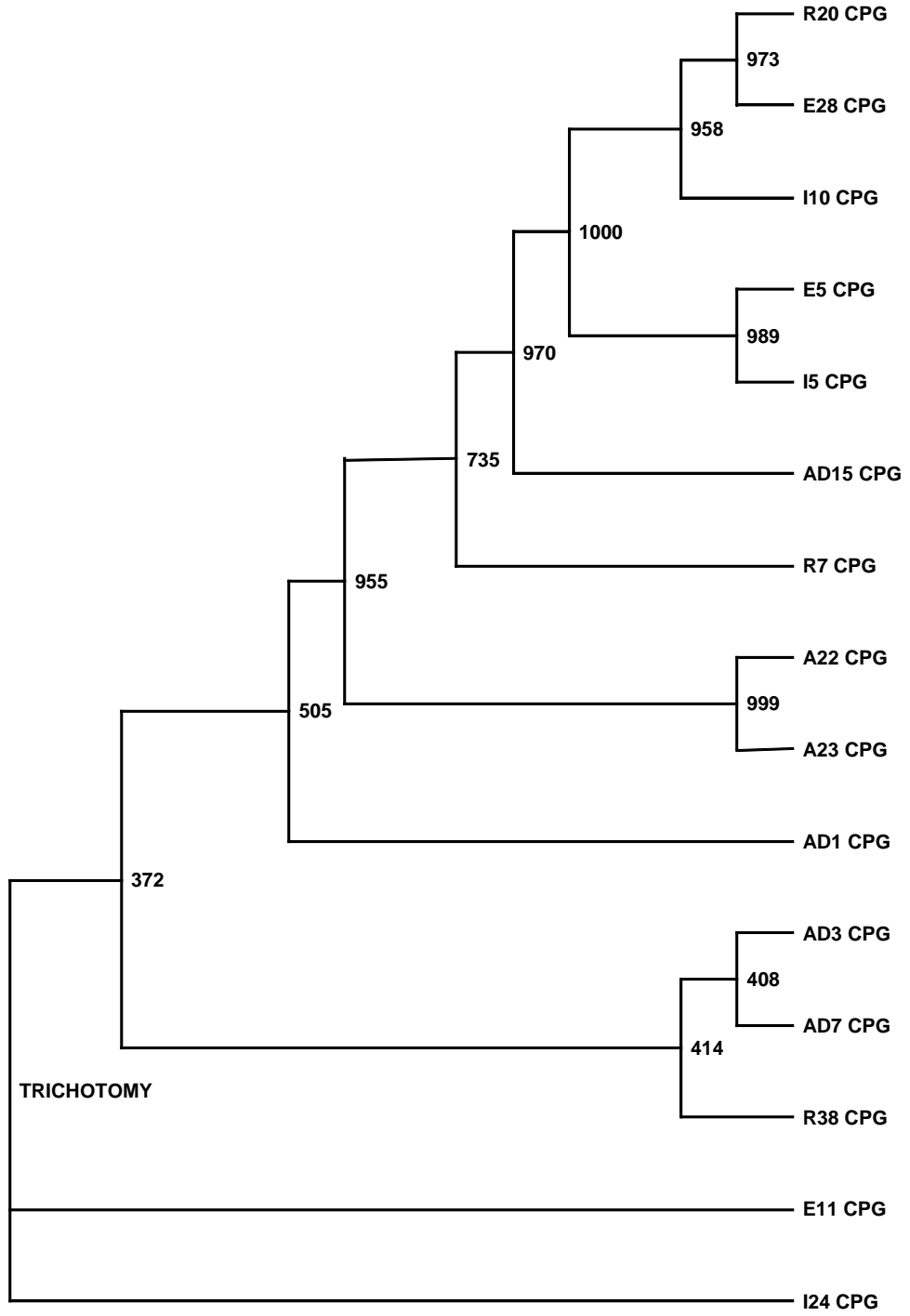
Çizelge 4.3. Ülkemizdeki CTV izolatları ile dünyadaki CTV izolatlarının aminoasit dizilerinin benzerlik oranları

İzolat Adı	I	II	III	IV	V
A22	Portekiz Klon 6.5 %98	Hırvatistan FN-D %98	Yeni Zelanda NZRB 11 %97	Çin JX-1-1 %97	İspanya B53 %97
A23	Portekiz Klon 6.5 %98	Hırvatistan FN-D %97	Yeni Zelanda NZRB 11 %97	Çin JX-1-1 %97	İspanya B53 %97
AD1	Hırvatistan FN-D %95	İspanya B53 %95	Yeni Zelanda NZRB 11 %94	Çin L-5 %94	Portekiz Klon 6.5 %94
AD3	Yeni Zelanda NZRB 11 %96	Portekiz Klon 6.5 %96	Hırvatistan FN-D %96	İspanya B53 %95	Çin JX-1-1 %95
AD7	Yeni Zelanda NZRB 11 %99	Portekiz Klon 6.5 %98	Hırvatistan FN-D %97	İspanya B53 %97	Çin JX-1-1 %97
AD15	Mısır Qaha %97	Florida T36 FS2-2 %97	İran TN2 %94	Meksika Colima1997 %94	Yunanistan G73 %93
R7	Yeni Zelanda NZRB 11 %98	İspanya B35 %98	Çin JX-1-1 %98	İran TN1 %98	Sırbistan T6-31 %98
R20	Yunanistan G73 %99	İspanya B35 %96	İtalya 0032 %96	İran TN2 %96	Portekiz Klon 25-20 %96
R38	Portekiz Klon 19-21 %100	Hırvatistan FN-D %99	İspanya B53 %99	Y. Zelanda NZRB11 %98	Çin JX-1-1 %98
I5	İspanya B35 %100	Yunanistan G17 %100	Sırbistan TN6-31 %99	Meksika Colima1997 %99	İran TN2 %99
I10	Yunanistan CTV G17 %96	İspanya B35 %96	İtalya 0032 %96	Portekiz Klon25-20 %95	Meksika Colima 1997 %95
I24	Portekiz Klon 6.5 %99	İspanya B53 %99	Yeni Zelanda NZRB 11 %98	Hırvatistan FN-D %98	Çin JX-1-1 %98
E5	Yunanistan G17 %99	Meksika Colima 1997 %99	İran TN2 %99	İspanya B35 %98	Sırbistan TN6-31 %98
E11	Portekiz Klon 19-21 %100	Hırvatistan FN-D %99	İspanya B53 %99	Yeni Zelanda NZRB 11 %98	Çin JX-1-1 %98
E28	Yunanistan G73 %100	İspanya B35 %97	İtalya 0032 %97	İran TN2 %96	Portekiz Klon 25-20 %96

CTV izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren beş izolat içerisinde yer aldıkları belirlenmiştir. Diğer taraftan Portekiz’ den F12, Arjantin’ den C257-2 klon 2, Hindistan’ dan Nagpur ve DKG1, İran’ dan İran 3 ve Japonya’ dan B185 izolatları amino asit dizi benzerliği bakımından ülkemiz CTV izolatlarıyla en az benzerlik gösteren izolatlar oldukları bulunmuştur.

#### **4.5. Filogenetik Analiz**

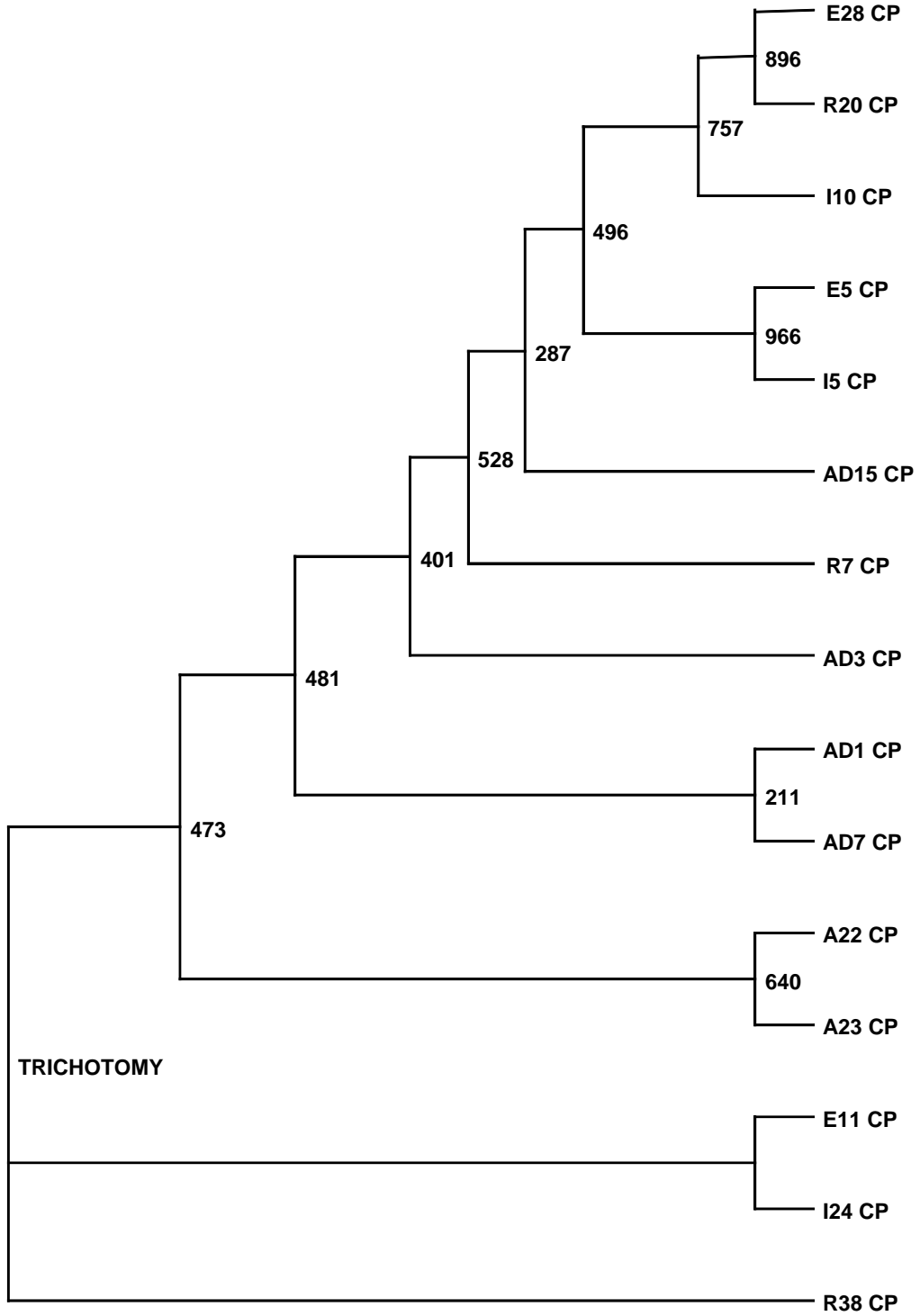
Ülkemizin farklı turunçgil üretim alanlarından elde edilen CTV izolatlarının birbirleriyle genetik ilişkisini belirlemek amacıyla 15 farklı izolatın kılıf protein genlerine ait nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.5’ de gösterilmiştir. Nükleik asit dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. Bu analizlere göre birbirine yakın ilişki gösteren iki ana grup belirlenmiştir. Bu gruplardan birincisi yedi izolat içerirken ikinci grup altı izolatı kapsamıştır. E11, I 24 ve R38 izolatının kılıf protein genleri filogenetik analizde üçü aynı anlamına gelen “trichotomy” oluşturmuş olup birbirlerinden farklılıkları bulunamamıştır. Bu nedenle de izolatlar hiçbir gruba dahil edilemeyip genetik olarak diğer izolatlardan farklı oldukları ve kılıf protein gen dizilimine göre evrimsel olarak birbirlerine en yakın izolatlar oldukları belirlenmiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 372-1000 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüfî olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Nükleik asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.5’ de gösterilmiştir. Birinci grupta bulunan izolatların biri (AD15) hariç tamamı Satsuma bitkisinden elde edilen izolatlar olurken ikinci gruptaki izolatlar biri hariç tamamı turunç üzerine aşılı portakaldan elde edilen izolatları içermektedir. Bu da kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizlerde izolatların coğrafik bölgelere göre değil daha çok alındıkları konukçu turunçgil türlerine göre gruplandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein geni nükleotid dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.

Ülkemizin farklı turunçgil üretim alanlarından alınan CTV izolatlarının kılıf proteinlerine ait amino asit dizilimi kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda da nükleik asit dizileriyle oluşturulan soy ağacına benzer bir soy ağacı elde edilmiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 212-966 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup tesadüfî olmadığı ve soy ağacındaki dallardan çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Kılıf protein genlerinin amino asit dizilimine göre oluşturulan filogenetik soy ağacı Şekil 4.6' da gösterilmektedir. Oluşturulan soy ağacında iki ana grupta ayrılan izolatlar daha çok elde edildikleri konukçulara göre gruplanmışlardır. Ancak soy ağacı yakından incelendiğinde her iki grubun alt gruplara ayrıldığı ve ara grupların oluştuğu gözlenmiştir. Oluşturulan soy ağaçlarının dalları 212-966 arasında değişen bootstrap değerleriyle desteklenmekte olup soy ağacındaki dallardan bir kısmının çoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. E11, I 24 ve R38 izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizilimi filogenetik analizde üçü aynı anlamına gelen “trichotomy” oluşturmuş olup birbirlerinden farklılıkları bulunamamıştır. Bu nedenle de izolatlar hiçbir gruba dahil olamayıp genetik olarak diğer izolatlardan farklı oldukları ve evrimsel olarak birbirlerine en yakın izolatlar oldukları belirlenmiştir.

Amino asit dizilimine göre yapılan filogenetik analizlerde oluşan birinci grubun E28, R20, I10, E5, I5, AD15, R7 ve AD3 izolatlarını içerdiği belirlenmiştir. Bu grup yakından incelendiğinde E28, R20 ve I10 izolatlarını içeren bir alt grup ve bunun yanında E5 ve I5 izolatlarını içeren ikinci bir alt grup belirlenmiştir. Bu grup ve alt gruplarında bulunan izolatlardan AD15 ve AD3 hariç tamamının Satsuma izolatları olduğu tespit edilmiştir. Oluşan ikinci ana grup sadece Akdeniz bölgesinden AD1, AD7, A22 ve A23 izolatlarını kapsamakta olup bu da kendi içinden biri sadece AD1 ve AD7 Doğu Akdeniz bölgesi izolatlarını diğeri ise A22 ve A23' den oluşan Batı Akdeniz izolatlarını içeren iki alt gruba ayrılmıştır. Bu gruptaki izolatlardan AD7 hariç tamamı portakal ağaçlarından toplanan izolatları oluşturmaktadır. Birinci grup içerisinde yer alan ancak iki alt gruptaki izolatlardan daha farklı olarak tam bir alt gruplama göstermeyen AD15, R7 ve AD3 izolatları sırasıyla Kamkat, Satsuma ve Portakal gibi farklı konukçulardan alınan izolatlar olup coğrafik ve biyolojik olarak birinci ve ikinci grup arasında özellikler göstermektedirler.



Şekil 4.6. Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein geni amino asit dizilerinin TreeView programı ile oluşturulan filogenetik soy ağacı.

Bu sonuçlar bu izolatların ara izolatlar olduğunu göstermektedir.

Yapılan filogenetik analizler ülkemizin farklı turunçgil üretim bölgelerinden alınan izolatların genetik olarak benzerlik gösterdiği ve bölgelerden daha çok alınan konukçuya göre farklılık veya benzerlik gösterdikleri belirlemiştir. İzolatların kılıf protein genlerinin hem nükleotide hem de amino asit dizilimlerine göre yapılan analizler Üç yapraklı portakal üzerine aşılı olarak Satsuma yetiştiriciliğinin yapıldığı Kıyı Ege, Edremit Körfezi ve Doğu Karadeniz bölgelerinden alınan izolatların birbirleriyle daha yakın genetik ilişki gösterdikleri belirlemiştir. Aynı şekilde turunç üzerine aşılı portakal yetiştiriciliğinin yapıldığı Akdeniz bölgesinden alınan izolatlar çoğunluğunun birbirleriyle daha yakın genetik ilişki gösterdiği tespit edilmiştir. Her bir gruptan farklı olarak kamkat bitkisinden alınan AD15 izolatı ise Satsuma grubu izolatlara daha yakın olmasına rağmen her iki grup arasında yer almıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada ülkemizde farklı turunçgil alanlarından elde edilen 15 farklı Turunçgil tristeza virüsünün kılıf protein genleri uygun vektörlerle klonlanarak dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri kendi aralarında ve gen bankasında nükleotid ve amino asit dizileri bulunan dünyadaki diğer CTV izolatlarıyla karşılaştırılmıştır. Ülkemizde CTV' nün bulunduğu 1980' li yıllardan bu yana bilinmesine rağmen yapılan çalışmalar sadece Çukurova bölgesiyle sınırlı kalmıştır (Baloğlu 1988; Korkmaz 2002). Bu nedenle ülkemizde CTV yaygınlığı ve izolatlarının biyolojik ve moleküler karakterizasyonu konusunda çalışmalar eksik kalmıştır. Bu eksikliği gidermek amacıyla son yıllarda ülkemizdeki tüm turunçgil üretim alanlarını kapsayan survey çalışmaları yapılarak CTV' nün yaygınlığı ve farklı bölgelerden elde edilen izolatların indikatör bitkiler üzerinde biyolojik özellikleri belirlenmiştir (Korkmaz vd., 2008). Bu çalışmada farklı turunçgil üretim bölgelerinde yetiştirilen farklı turunçgil türlerinden elde edilen CTV izolatlarının moleküler özellikleri karakterize edilmiştir. Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein gen dizilimlerinin belirlenmesi konusunda yapılan ilk çalışmadır. Ülkemiz CTV izolatlarının kılıf protein gen dizilimleri belirlenerek, bu izolatların birbirleriyle ve dünyadaki diğer CTV izolatlarıyla genetik benzerlikleri ve farklılıkları ortaya konulmuştur.

Ülkemiz CTV izolatlarının kılıf protein genlerin nükleotid ve amino asit dizileri karşılaştırıldığında izolatlar arasında sırasıyla % 91-99 ve % 90-100 arasında değişen oranlarda benzerlik olduğu bulunmuştur. Bu oranlar daha önce dünyanın farklı turunçgil üretim bölgelerinde yapılan çalışmalarda elde edilen oranlarla paralellik göstermektedir (Barzager vd., 2005a; Papayiannis, 2007).

Bu çalışmada kılıf protein gen dizilimi karşılaştırılan 15 izolattan sadece E28 ile R20 izolatlarının nükleotid diziliminde %100 benzerlik gösterdiği ve ülkemizin genetik olarak en yakın izolatları oldukları ortaya konmuştur. İki izolat farklı turunçgil üretim bölgesinden alınmasına rağmen her ikisinde üç yapraklı portakal üzerine aşılı Satsuma ağaçlarından izole edilmiştir (Çizelge 3-1). Her iki izolatın da biyolojik

karakterizasyonu daha önceden yapılmış olup her ikisinde Meksika laymında yaprak damar açılması, yaprak kıvrılması ve zayıf da olsa gövde çukurlaşmasına neden olmaktadır (Korkmaz vd., 2008). Genel olarak bakıldığında bu çalışmada kılıf protein gen dizilimi analizi yapılan izolatlar bölgesel olarak ayrılmak yerine daha çok alındıkları konukçularına göre gruplanmaktadır. Filogenetik analizlerde oluşan iki ana grubun biyolojik özellikleri karşılaştırıldığında özellikle amino asit dizilimine göre oluşturulan soy ağacındaki birinci grubun Meksika laymında orta ve zayıf şiddete gövde çukurlaşmasına yol açan E28, R20, I10, E5, I5, AD15, R7 ve AD3 izolatlarını içerdiği belirlenmiştir. Buna karşın ikinci grupta yer alan AD1, AD3, A22 ve A23 izolatların ise meksika laymında sadece yaprak damar açılmasına neden olduğu bilinmektedir (Çizelge 3.1) (Korkmaz vd., 2008). Bu sonuçlar genetik benzerlik gösteren izolatların coğrafik özelliklerinden daha çok alındıkları konukçu ve indikatör bitkilerde oluşturdukları belirtiler gibi biyolojik özellikleri bakımından benzer oldukları ve ona göre gruplandıkları belirlenmiştir. Benzer bulgular daha önce farklı turuncgil üretim bölgelerinden CTV izolatların kılıf protein gen analizlerinde elde edilmiş olup filogenetik sınıflandırmaların izolatların biyolojik özellikleriyle paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Mawassi vd., 1992; Pappu vd., 1993; Çevik vd., 1995; Roy vd., 2002; Barzegar vd., 2005a; Papayiannis vd., 2007; Jiang vd., 2008).

Ülkemizde farklı turuncgil üretim alanlarından alınan izolatlar dünyanın diğer CTV izolatlarıyla karşılaştırıldığında kılıf protein genlerinin nükleotid diziliminde 89-99% oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir. Çalışılan 15 izolattan sekiz tanesi en fazla benzerliğin Portekiz'den Strain 19-21 izolatıyla göstermiştir. Bu izolatın Meksika laymında gövde çukurlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (Sequeira vd., 1999). Geriye kalan izolatlardan üç tanesi R20, E28 ve I10 en çok benzerliği İtalya'dan CTV0032 izolatıyla göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda İtalya'dan 0032 izolatının gövde çukurlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (Barbarossa vd., 2006). Ülkemiz izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren beş izolat içerisinde çeşitli ülkelerden farklı izolat bulunmaktadır. Bunlar arasında bulunan izolatların çoğunun biyolojik özellikleri bilinmemekle birlikte Çin CHN-N3 izolatı gövde çukurlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar kılıf protein genlerinin nükleotid dizilimine göre yapılan analizler ülkemiz izolatlarının çoğunlukla Akdeniz

lkelerinden alınan CTV izolatlarıyla benzerlik gösterdiğini ortaya koyarak bu izolatların bölgesel olarak yayıldığını göstermiştir. Ülkemiz izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren izolatların gövde ukurlaşması belirtisine yol açan izolatlar olması ülkemiz izolatlarının bir kısmının gövde çukurlaşmasına neden olabilecek şiddetli izolatlar olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan biyolojik indeksleme çalışmaları bu izolatların Meksika laymında zayıf ve orta şiddette dal çukurlaşmasına yol açtıkları belirtilmiştir. (Korkmaz vd., 2008).

Ülkemizdeki CTV izolatlarının kılıf protein genlerinin amino asit dizisi dünyadaki diğer CTV izolatlarıyla karşılaştırıldığında çalışılan 15 izolattan sekiz tanesi en fazla benzerliği Portekiz, Yunanistan ve Mısır' dan alınan izolatlarla göstermiştir. Bu da ülkemiz izolatlarının daha çok Akdeniz havzasında yaygın olarak bulunan izolatlarla benzer olduklarını göstermiştir. Bu izolatların çoğunun biyolojik özellikleri bilinmese de Portekiz' den Klon 19-21' in Meksika laymında gövde ukurlaşmasına (Sequeira vd., 1999) ve Mısır' dan Qaha izolatının (Amin vd., 2006) ise hızlı göçüren belirtilerine neden olduğu rapor edilmiştir. Ülkemiz izolatlarıyla en çok benzerlik gösteren beş izolat içerisinde yer alan Çin JX1-1 izolatının gövde ukurlaşması (Zhang, 2006), İspanya B53 izolatının çabuk göçüren ve portakalda gövde ukurlaşması ve B35 izolatının ise şiddetli göçüren, gövde ukurlaşması, fidan sararması simptomlarını gösterdikleri belirlenmiştir (Pappu vd., 1993). Ayrıca İtalya 0032 izolatının ise gövde çukurlaşmasına neden olduğu daha önce rapor edilmiştir (Barbarossa vd., 2006).

Yapılan bu çalışmada ülkemizin beş farklı turunçgil üretim bölgesinden alınan 15 farklı izolatın kılıf protein gen dizilimi yapılarak moleküler özellikleri ilk defa ortaya konulmuştur. Yapılan filogenetik analizlerde ülkemiz izolatlarının alınan konukçusu ve biyolojik özelliklerine göre gruplandıkları belirlenmiştir. Uluslararası izolatlarla yapılan çoklu karşılaştırmalar ülkemiz izolatlarının bir kısmının gövde ukurlaşması ve hızlı göçüren gibi şiddetli belirtilere yol açan CTV izolatlarıyla benzerlikler göstererek ülkemizde de bu şiddetli izolatların bulunduğunu göstermiştir. Ülkemizde CTV' nn varlığının belirlendiği 1980'li yıllardan bu yana az da olsa özellikle Doğu Akdeniz bölgesinden alınan izolatların biyolojik karakterizasyonları yapılarak

Ülkemizde sadece Meksika laymında yaprak damar açılmasına neden olan ılımlı izolatların bulunduğu belirlenmiştir (Baloğlu, 1988; Yılmaz, 1999; Kamberoğlu, 2001; Korkmaz 2002). ancak son yıllarda farklı bölgeden alınan izolatlarla biyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda Meksima laymında gövde çukurlaşmasına yol atığının belirlenmesiyle ülkemizde şiddetli izolatların olabileceği ilk olarak ne sürülmüştür (Korkmaz vd., 2008). Bu çalışmanın bulguları lkemizde CTV' nn şiddetli streylerinin bulunduğuna dair daha önceki biyolojik verileri destekleyen moleküler verileri ortaya koyarak ülkemizde şiddetli CTV izolatların bulunduğunu ve bunlara karşı önlem alınarak yayılmalarının engellenmesi gerektiğini belirtmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akbulut, M., 1995. Citrus tristeza virus: Molecular characterization of capsid protein genes of Turkish isolates and restriction analysis of genome portions of known strains. M. S. Thesis. University of Florida, Gainesville, FL. 98 pp.
- Akib, 2006. Avrupa Turunçgil Piyasasının Durumu. www.akib.gov.tr Erişim Tarih:20/03/2007
- Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, C. E., Vives, M.C., Lopez, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W. O., 2000. Journal of Virology. p. 6856-6865.
- Amin, H.A., Fonseca, F., Santos, C., Nolasco, G., 2006. Typing of Egyptian Citrus tristeza virus (CTV) isolates based on the capsid protein gene. Phytopathol. Mediterr. 2006. 45, 10–14
- Baloğlu, S. (1988). Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerinde Zararlı Tristeza Virüs Hastalığının Tanınması, Arıtılması, Özellikleri ve Serolojik Yöntemlerle (ELISA ve SDS Immunodiffusion Testleri) Saptanması. Ç.U.Ziraat Fakültesi Adana, TUBITAK - TOAG / 537, Ankara, pp. 187.
- Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves., 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. Advances in Virus Research 25:93-168
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., ve Lee, R.F., 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review. Phytopathology 27:291-316
- Barzegar, A., Sohi, H.H., Rahimian, H., 2005 a. Characterization of Citrus tristeza virus isolates in northern Iran. J Gen Plant Pathol (2006) 72:46–51
- Barzegar, A., Sohi, H.H., Rahimian, H., 2005 b. Comparative Sequence Analysis of Coat Protein Gene of Iranian Citrus tristeza virus Isolates. J. Phytopathology (2005)153, 457–463
- Bo, J., 2007. Characteristic of seriology and molecular biology of Citrus tristeza virus in China. Basılmamış.
- Cepeda-Nieto A.C., Barrera-Saldaña H. A., 1997. Cloning and Sequencing of the Coat Protein Gene of a New Isolate of Citrus Tristeza Virus from Mexico. Phytopathology. June 1997, Volume 81, Number 6 Page 693
- Choi, S.H., Lee, S.Y., 2001. Nucleotide sequence of coat protein gene of citrus tristeza virus isolated in Korea

- Çevik, B., 1995. Molecular Differentiation of Strains of Citrus Tristeza Virus Using the Coat Protein Gene Sequences.
- Çevik, B., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Benscher, D., Irey, M., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. Application of Bi-Directional PCR to Citrus Tristeza Virus: Detection and Strains Differentiation. Thirteenth IOCV Conference.
- Da Graca, J. V., L. J. Marais, and L. A. Von Broembsen. 1984. Severe tristeza stem pitting decline of young grape fruits in South Africa. Pages 62-65 in: Garnsey, S. M. L. V. Timmer, and J. A. Dodds (eds). Proc. of the 9<sup>th</sup> Conf. of the International Org. Citrus Virologist. IOCV, Riverside, CA.
- Davies, F. F., Albrigo, L. G., 1994. Citrus. CAB International Wallingford, Oxon UK. 254 pp.
- Dodds, J. A., Jarupat, T. Lee, J. G., ve Roistacher, C.N., 1987. Effect of strain , host, time of harvest and virus concentration on dsRNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology*.77:442-447.
- Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., Roistacher, C.N., Civerolo, E., Lee, R.F., Yokomi, R. K. ve Bar-Joseph, M., 1987. Toward a standart evaluation of the biologically properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indisto, j., ve Lee, R.F., 1993. Characterisation of isolates and strains of citrus tristeza cloesterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 44:305-317.
- Guerri, J., Moreno, P ve Lee R.F., 1990. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology*. 80:692-698.
- FAO, 2005. Ülkemiz turunçgil üretimi ve Dünyadaki yeri. [www.fao.gov.tr](http://www.fao.gov.tr) Erişim Tarih:20/03/2007
- Harper, S.J., Pearson, M.N., Mooney, P.A., Dawson, T.E., 2005. Characterization of trifoliate resistance-breaking isolates of Citrus tristeza virus.
- Herrera-Isidron, L., Juarez-Ayala, J.C., Llauguer, R., Batista, L., Pena, I., Quinones, J., Peral, R., Oramas, P., Borroto, C., Rivera-Bustamante, R., Martinez-Soriano, J.P., 1999. Molecular analysis of Citrus tristeza virus isolates from Cuba.
- Herrera-Isidron, L., Villarreal-Garcia, L.A., Rivera-Bustamante, R., Martinez-Soriano, J.P., 2001. Molecular Analysis of Citrus tristeza virus from Mexico.

- Hızal, A.Y., Göral, T., 1987. Türkiye’de Turunçgil Üretimi-İhracatı Ve Virus Hastalıkları Yönünden Durumu. *Derim Dergisi*. Turunçgiller Araştırma Enstitüsü Yayını. 32-42.
- Hilf, M. E., Karasev, A. V., Pappu, H. R., Gumpf, D. J., Niblett, C. L., Garnsey, S. M., 1995. Characterization of Citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208:576-582.
- Hilf, M. E., Vessela A. M., Garnsey, S.M., 2005. Genetic Marker Analysis of a Global Collection of Isolates of Citrus tristeza virus: Characterization and Distribution of CTV Genotypes and Association with Symptoms. *Phytopathology*. 95:909-917.
- Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J., 2000. A Rapid Method Based on the One step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction *J. Phytopathology*. 148, 469-475(2000)
- Ilharco F.A., Sousa-Silva C.R., Alvarez A.A., 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and Continental Portugal. *Agronomia Lusitana* 51: 19-21.
- J. Guerri, R. Flores, and P. Moreno., 1999. The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. *J. Gen. Virol.* 80: 811-816.
- Jiang, B., Hong, N., Wang, G-W., Hu, J., Zhang, J-K., Wang, C-X., Liu, Y., Fan, X-D., 2008. Characterization of Citrus tristeza virus strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. *Virus genes*(2008) 37:185-192.
- Kamberoğlu, M. A. Ve Yılmaz, M.A., 2001. Production of spesific monoclonal antibodies of Citru Tristeza Virus (CTV) and usage in CTV strains diagnosis. *J. Turk. Phtopath.* Vol.:30(1):1.
- Karasev, A. V., V. P. Boyko, S. Gowda, O. V. Nikolaeva, M. E. Hilf, E. V. Koonin, C. L. Niblett, K. Cline, D. J. Bumpf, R. F. Lee., 1995. Complete sequence of the citrustristeza virus *Virology*.
- Kaygısız, H., Aybak, H.Ç., 2000. Narenciye Yetiştiriciliği. *Hasad Yayıncılık*. 9-14
- Kong, P., Rubio, L., Polek, M., Falk, B.W., 1999. Population Structure and Genetic Diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) Isolates. *Virus Genes* 21:3, 139 - 145, 2000
- Korkmaz, S. 2002. Aplication of Direct Tissue Blot Immunoassay in Comparison with DAS-ELISA for Detection of Turkish Isolates of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV). *Turk. J.Agric. For.* 26, 203-209

- Korkmaz, S., Çevik, B., Önder, S., Koç, N. K., 2007. Ülkemiz turunçgil alanlarında Turunçgil Tristeza virüsünün biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle tanılanması ve karakterizasyonu. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, 27-29 Ağustos 2007. Isparta.
- Korkmaz, S., Çevik, B., Önder, S., Koç, N.K., 2008. Biological, serological, and molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from different Citrus cultivation regions of Turkey. Turk J Agric For 32 (2008) 369-379 Tubitak.
- Lee, R.F., Garnsey, S. M., Bransky, R. H., Goheen, A. C., 1987. A purification procedure for enhancement of Citrus tristeza virus yields and its application to the other phloem-limited viruses. Phytopathology. 77:543-549.
- Lee, R. F., Bransky, R. H., 1990. Evaluation of the use of mild strains of Citrus trees on sour orange rootstocks. Proc . Fla. State Hort. Soc. 103:101-104
- Lee, R. F., Rocha-Pena, M. A., 1992. Citrus Tristeza Virus. Pages 226-249 : Kumar, J., Chaube, H.S., Singh, U. S., Mukhopadhyay. A. N. Plant Diseases of International Importance. Diseases of Fruit Crops. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. Vol.III. 456pp.
- Mawassi, M., Gafny, R., Bar-Joseph, M., 1992. Nucleotide Sequence of the Coat Protein Gene of Citrus Tristeza Virus: Comparison of Biologically Diverse Isolates Collected in Israel. Virus genes 7:3,265-275
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., Bar-Joseph, M., 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. J. Gen. Virol.77:2359-2364.
- McClellan, A.P.D., 1977. Tristeza virus complex: influence of host species on the complex. Citrus subtrop. Fruit J. 16:4-16
- Muller, G. W., S. M. Garnsey. 1984, Susceptibility of citrus varieties, species, Citrus relatives, and non-rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with Citrus tristeza virus. Pages 62-65 in: Garnsey, S. M. Timmer, L. V. And Dadds, J. A. (eds). Proc. of the 8th Conf. of International Org. Citrus Virologist. IOCV. Riverside, CA.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., 1996. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in Escherichia coli: application for immunodiagnosis. American Phytopathological Society 85 (6) p. 691-694.

- Pappu, H., Pappu, S., Niblett, C., Lee, R., Civerolo, E., 1992. Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7:255-264.
- Papayiannis, L.C., Santos, C., Kyriakou, A., Kapari, T., Nolasco, G., 2007. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Cyprus on the basis of the coat protein gene. *Journal of Plant Pathology*. 89:291-295
- Permar, T.A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., ve Lee, R.L. 1990. A monoclonal antibody that discriminate strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.
- Roistacher, C. N. 1982. A blueprint of disaster I: The history of seedling yellows disease. *California Citrograph* 67:48-53.
- Roistacher, C. N., M. Bar-Joseph., 1984. Aphid transmission of citrus tristeza and seedling yellows tristeza by small population of *Aphis gossypii*. *Plant Disease* 68:494-499.
- Roistacher, C.N., 1989. Concepts in the detection and control of citrus virus and virus-like diseases. *Citricultura: proceedings of the Sixth International Citrus Congress : Middle-East*. p.853-862
- Roistacher, C.N., 1991. Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (I).
- Rosner, A., Lee, R.F. ve Bar-Joseph, M., 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific strain of citrus tristeza virus . *Phytopathology*. 76:820-824
- Roy, A., Brlansky, R.H., 2006. Population dynamics of a Florida citrus tristeza virus isolate and its subisolates; identification of three genotypic groups and recombinants upon aphid transmission
- Roy, A., Ramachandran, P., Brlansky, R.H. Brlansky, R.H., 2002. Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch Virol* (2003) 148: 707–722
- Rubio L., Ayllón M.A., Kong P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B.W., 2001. Genetic Variation of Citrus Tristeza Virus Isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and Recombination. *Journal of Virology*. Sept. 2001, p. 8054–8062.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., Ambros, S., 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch Virol*. 151:387-398.

- Sequeira,Z., Nolasco,G., 1999. Bacterial expressed coat protein for the development of a single antibody for routine detection of Citrus Tristeza Virus in Portugal
- Sekiya, M. E., Lawrence, S. D., McCaffery, M., Cline. K., 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 72:1013-1020.
- Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H., Okuda, S. 2000. *J. Gen. Plant Pathol.* 67 : 73-77 (2001)
- Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, G.J., Perez de San Roman, C., ve Sanz, A., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67:91-96
- Vives, M. C., Rubio, L., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Dawson, O.W., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., 1999. The complete genome sequence of the major compotent of a mild Citrus tristeza virus isolate. *J. Gen. Virol.* 80:811-816.
- Wallace J. M., Oberholzer, P. C. J. J., Hofmeyer D. J., 1956. Distribution of virus oftristeza and the other disease of citrus in propagative material. *Plant Disease Report*40:3-9.
- Weber, H. J., 1943. The Tristeza disease of sour-orange rootstock. *Proc. Am. Soc. Hort. Science* 43: 360-364.
- Yang, G., Che, X., Gofman, R., Ben-Shalom, Y., Piestun, D., Gafny, R., Mawassi, M., Bar-Joseph, M., 1999. D-RNA molecules associated with subisolates of the VT strain of citrus tristeza virus which induce different seedling-yellows reactions. *Virus Genes* 19:5-13.
- Yilmaz, M.A., 1999. Virus and Virus-like diseases of citrus in Turkey. In Martelli G.-P. (ed.), D'Onghia A.-M. (ed.) . *Proceedings of the Mediterranean network on certification of citrus. 1995-1997 . Bari : Ciheam-Iamb, 1999. p. 85-93 : 34*
- Yokomi, R. K., 1989. Transmission of Exotic Citrus Tristeza Virus Isolates by a Florida Colony of *Aphis gossypii*. *The American Pathology Society. Plant Dis.* 73:552-556.
- Zhang, J.K., Hong, N., Wang, G.P., 2006. *J. Agric. Biotechnol.* 14:259-264.
- Zohou, Y., Zhou, C., Song, Zhen, L.C., Yang F., 2007. Characterization of Citrus tristeza virus Isolates by Indicators and Molecular Biology Methods. *Agricultural Sciences in China.* 2007 6(5):573-579.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı:** Gözde ERKIŞ

**Doğum Yeri ve Yılı :**Antalya-1982

**Medeni Hali :**Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce



### **Eğitim ve Akademik Durumu**

**Lise** :1996-2000 Aldemir Atilla Konuk YDA Lisesi/Antalya

**Lisans** :2001-2005 Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programı-Bitki Koruma Alt Programı

### **Görevi ve Çalıştığı Kurum**

**Ziraat Mühendisi** : 2008-(devam ediyor) Tarım Kredi Kooperatifleri/Abdurrahmanlar-Antalya

### **Yayınlar:**

1-)Çevik, B., Kaymak, S., Erkiş G., Çağlayan, K., ve Candresse, T. 2007. Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Erik Koleksiyonlarında Şarka Virüsünün Yaygınlığının Belirlenmesi. Türkiye 2. Bitki Koruma Kongresi. 26-29 Ağustos 2007. Isparta

2-) Çevik, B. and Erkiş G. 2007. First Report of Tomato Chlorosis virus in Turkey.Plant Pathology.