

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saime Büşra FİDANCI

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ TURUNÇGİL ÜRETİM
ALANLARINDA TURUNÇGİL PSOROSİS VİRÜSÜ
(CPsV)'NÜN YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI,
MOLEKÜLER OLARAK TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ TURUNÇGİL ÜRETİM ALANLARINDA
TURUNÇGİL PSOROSİS VİRÜSÜ (CPsV)'NÜN YAYGINLIĞININ
ARAŞTIRILMASI, MOLEKÜLER OLARAK TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Saime Büşra FİDANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 13/07/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr.Gülşen SERTKAYA
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üys. Orhan BOZAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

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

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2016-6198**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ TURUNÇGİL ÜRETİM ALANLARINDA TURUNÇGİL PSOROSİS VİRÜSÜ (CPsV)'NÜN YAYGINLIĞININ ARAŞTIRILMASI, MOLEKÜLER OLARAK TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Saime Büşra FİDANCI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Yıl: 2018, Sayfa: 83

Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

: Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

: Dr. Öğr. Üys. Orhan BOZAN

Bu çalışmada, Doğu Akdeniz Bölgesinde Turunçgil kavlama hastalığı etmeni *Citrus psorosis virus* (CPsV) ile bulaşık olduğu bilinen turunçgil türlerinden portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde etmenin yaygınlığı belirlenmiş ve alınan bitki örneklerinin biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. CPsV varyantları arasındaki farklılıklar birbirinden ayrılarak nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. CPsV'nin tanılanması ve karakterizasyonu için 50 farklı turunçgil ağacından şiddetli kabuk kavlama lezyonu ve genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni simptomsu, yaşlı yaprak ve concave gum simptomsu gösteren farklı örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler TT-PZR çalışmalarıyla analiz edilmiştir. Kullanılan farklı primer çiftleri ile CPsV'nin farklı gen bölgeleri belirlenmiştir. Yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında ise tohumdan yetiştirilen 8 aylık Pineapple portakal (*Citrus sinensis*) fidanlarına CPsV'nin inokulasyonu yapılmış ve enfekteli indikatör bitkilerin ilk gelişen sürgünlerinde CPsV'nin damar bantlaşması ve şok simptomsu gözlemlenmiştir. Blast analizi ve NCBI gen bankasındaki CPsV'nin referans genomlarının karşılık gelen bölgeleri ile nükleotid dizilimlerinin %98 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, CPsV, TT-PZR, Biyolojik indeksleme, Türkiye

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF THE PREVALENCE OF CITRUS PSOROSIS VIRUS (CPsV) IN THE CİTRUS PRODUCTION AREAS OF THE EASTERN MEDİTERRANEAN REGION, AND ITS MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION

Saime Büşra FİDANCI

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

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Year: 2018, Pages: 83
Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Prof.Dr. Gülşen SERTKAYA
: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN

In this study, the prevalence of orange, mandarin and grapefruit orchards in the Eastern Mediterranean region known to be contaminated with *Citrus psorosis virus* (CPSV) disease has been determined. Biological and molecular characterization of collected plant samples was carried out. The genomic differences between the CPSV variants were separated to determine nucleotide sequences. For the identification and characterization of CPSV, samples were taken from 50 different citrus trees with severe barking lesions, vein banding and oak leaf pattern symptoms on young leaves, old leaves and concave gum symptoms. The collected leaf samples were analyzed by RT-PCR studies. Different gene pairs of CPSV were identified by using different primer pairs. In the biological indexing studies, CPSV was inoculated to 8 month old Pineapple oranges (*Citrus sinensis*) plants which grown from the seed. Vein banding symptoms and shock reaction of CPSV were observed in the first growth flushes of infected indicator plants during biological indexing assays. Blast analysis showed that CPSV in the NCBI gene bank had 98% similarity to nucleotide sequences with corresponding regions of reference genomes.

Keywords: Citrus, CPsV, RT-PCR, Biological indexing, Turkey

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller dünyada olduğu gibi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan portakal (*Citrus. sinensis*), mandarin (*C. reticulata*), altıntop (*C. paradisi*), limon (*C. limon*) gibi türleri kapsayan en önemli meyve gruplarından. Turunçgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs ve virüs benzeri hastalıklar ekonomik olarak turunçgil tarımını kısıtlayan en önemli faktörlerdendir ve üretim yapılan bu alanlarda 80'e yakın virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmektedir (Roistacher, 1991; Navarro, 1993). Dünya'da turunçgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olan virüs hastalıklarından bir tanesi de Turunçgil kavlama hastalığına neden olan *Citrus psorosis virüs* (CPsV)'üdür. Günümüzde CPsV'nin iki farklı varyantı olduğu belirtilmiştir. Bunlardan birincisi hastalığın en çok görülen ırkı olan Psorosis A (PsA), ikincisi ise hastalığın daha şiddetli ırkı olan Psorosis B (PsB)'dir (Fawcett ve Klotz, 1938). Ülkemizde ve bölgemizde Turunçgil kavlama hastalığı ile ilgili bazı çalışmalar yürütülmüş fakat bu iki ırkın genomik farklılıkları ile ilgili herhangi bir çalışma yürütülmemiştir. Bu çalışma ile Doğu Akdeniz Bölgesi farklı turunçgil türlerini içeren turunçgil bahçelerinde Turunçgil kavlama hastalığının yaygınlığı belirlenmiş, hastalığın biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca CPsV'nin farklı izolatları arasındaki genomik farklılıklar birbirinden ayrılarak kısmi genom dizilimleri belirlenmiştir. CPsV'nin Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygınlığını belirlemek amacıyla Adana, Mersin, Hatay illerinde 10 yaşından ve 10 dekardan büyük portakal, mandarin, altıntop bahçelerinde ilkbahar ve sonbahar aktif genç sürgün dönemlerinde surveyler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen surveylerde CPsV'nin karakteristik semptomlarından olan genç yaprak semptomları değerlendirilerek yaygınlık durumu belirlenmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda incelenen 11150 ağacın 3663 tanesinin hastalıkla enfekteli olduğu, Doğu Akdeniz Bölgesi Adana, Mersin, Hatay illerinde portakal, mandarin ve altıntop yetiştirilen bahçelerde toplam bulaşıklığın %33 olduğu tespit edilmiştir.

CPsV'nin tanınması ve karakterizasyonu için 50 farklı turunçgil ağacından kabuk kavlama lezyonları genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı görüntüsü simptomları, yaşlı yaprak simptomları ve concave gum simptomu gösteren ağaçlardan farklı örnekler toplanmıştır. Araziden toplanan örnekler biyolojik indeksleme çalışması için Pineapple portakal tohumlarından yetiştirilen fidanlara doku inokulasyonu yöntemi ile aktarılmıştır. Yaklaşık iki ay gibi bir süre sonunda portakal fidanlarının uç sürgünlerinde hastalığın karakteristik özelliği olan şok reaksiyonları gözlenmiştir. Ayrıca fidanların genç yapraklarında damarlar üzerinde açık renkli damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü, olgun yapraklar üzerinde kalıcı zamklı lekeler gözlenmiştir. Genç yapraklar üzerinde gelişen simptomların büyük bölümü yapraklar olgunlaştığında gözden kaybolmuşlardır.

Turunçgil bahçelerinden toplanan yaprak örnekleri CPsV'nin varlığını moleküler olarak belirlemek için Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (TT-PZR) yöntemi ile analiz edilmiştir. TT-PZR çalışmalarında BC76/BC77, BC78/BC79, Ps44/Ps45, Ps62/Ps63, CPV-1/CPV-2 primer çiftleri kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftlerinden CPV-1/CPV-2 ve BC78/BC79 etmenin rutin tanılamasında her zaman başarılı sonuç verirken diğer primer çiftleri her zaman aynı başarıyı göstermemiştir. CPsV ile enfekteli bitkiler sağlıklı bitkilerde olmayan kılıf protein geninin 350, 514, 600 nt uzunluğundaki bantlarını göstermişlerdir. Kılıf protein geninin belirli bölgelerinin tanılanmaya ve karakterize edilmeye çalışıldığı TT-PZR çalışmaları sonucunda bölgemizde CPsV'nin yaygın olarak bulunduğu, kabuk kavlama simptomlarının PsA ve PsB sendromları ile ilgili olduğu ancak PsB sendromunun bölgemizde yaygın olarak bulunmadığı PsA sendromunun bölgemizde daha yoğun bulunduğu belirlenmiştir. Direk sekanslama yöntemi ile virüsün RNA3 ve RNA2 bölgelerinin kısmi nükleotid dizilimleri elde edilmiştir. Filogenetik analiz çalışması için ise DNA dizileri Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7) programı kullanılarak “Neighbour joining” metodu ile sınıflandırılmıştır.

Blast analizi ile NCBI gen bankasındaki CPsV'ün referans genomları ile karşılaştırılmış ve bölgemizden elde edilen CPsV izolatlarının RNA3 bölgesinin %96 oranında, RNA2 bölgesinin ise %98 oranında NCBI gen bankasında yer alan izolatlarla benzerlik oluşturduğu belirlenmiştir.





TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışma aşamasında bana her türlü yardımı sunan başta Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN olmak üzere tüm Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımda beni destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. CPsV İle İlgili Yurtdışında Yapılan Çalışmalar.....	8
2.2. CPsV İle İlgili Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal	17
3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller	19
3.1.3. Total Nükleik Asit (TNA) Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal	20
3.1.4. TT–PZR (Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmalarında Kullanılan Materyal	20
3.1.5. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	22
3.2. Metot	22
3.2.1. Survey Çalışmaları	22
3.2.2. Bitki Örneklerinin Elde Edilmesi	23
3.2.3. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılacak İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi Ve İnokulasyon Çalışması.....	29
3.2.4. TNA Ekstraksiyonu Çalışmaları.....	31

3.2.5. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR)	
Çalışmaları.....	33
3.2.5.1. Ters Transkripsiyon (TT) Çalışmaları.....	33
3.2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması.....	34
3.2.6. Nested PZR Çalışmaları	35
3.2.7. Elektroforez Çalışmaları Ve Örneklerin Görüntülenmesi	36
3.2.8. Sekans Analizi Ve Verilerin Karşılaştırılması	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. CPsV Hastalığının Survey Çalışmaları İle Yaygınlığının Belirlenmesi.....	39
4.2. CPsV Hastalığının Biyolojik İndeksleme Yöntemi İle Tanılanması.....	44
4.3. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma	53
4.3.1. TT-PZR Çalışmaları İle İlgili Bulgular	53
4.3.2. Nükleotid Dizilimi Ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular	61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
5.1. Sonuçlar.....	71
5.1.1. Sörvey Çalışmaları Sonuçları.....	71
5.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları Sonuçları.....	72
5.1.3. TT-PZR Çalışmaları Sonuçları.....	73
5.2. Öneriler.....	74
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Ülkelere göre turunçgil üretim verileri.....	1
Çizelge 1.2.	Türkiye turunçgil üretim verileri	2
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan bitki örneklerine ait bilgiler	17
Çizelge 3.2.	Ters Transkripsiyon (TT) reaksiyon karışım kimyasalları	21
Çizelge 3.3.	PZR reaksiyon karışım kimyasalları	21
Çizelge 3.4.	CPsV’i belirlemede kullanılan primer çiftleri	22
Çizelge 3.5.	CTAB tampon içeriği	32
Çizelge 3.6.	Çalışmaya göre modifiye edilen PZR koşulları.....	35
Çizelge 3.7.	Çalışmaya göre modifiye edilen Nested-PZR koşulları	36
Çizelge 4.1.	Survey çalışmalarında incelenen ağaçların illere göre dağılımı	42
Çizelge 4.2.	Survey çalışmalarında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenen ağaç sayılarının illere göre dağılımı	42
Çizelge 4.3.	Survey çalışmaları sonucu CPsV ile bulaşık olduğu belirlenen ağaçların % dağılımları	43
Çizelge 4.4.	Farklı turunçgil çeşitlerinden alınan inokulum kaynakları ile yapılan doku inokulasyonu çalışmalarında Pineapple portakal bitkilerinde gözlemlenen simptomlar	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Adana ili portakal ağacında görülen genç yaprak simptomsu	23
Şekil 3.2.	Mersin ilinde satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin genç yapraklarda damar bantlaşması simptomsu.....	24
Şekil 3.3.	Mersin ilinde Satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin meşe yaprağı görüntüsü.....	25
Şekil 3.4.	Adana ilinde W. Navel portakal ağacından alınan örneklerden CPsV'nin kabuk kavlama simptomsu.....	26
Şekil 3.5.	Hatay ilinde Satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin şiddetli kabuk kavlama simptomsu	27
Şekil 3.6.	Mersin ili portakal ağaçlarından alınan örneklerden CPsV'nin yaşlı yaprak simptomları.....	28
Şekil 3.7.	Mersin ilinde Satsuma mandarinden alınan örneklerden CPsV'nin concave gum simptomları	29
Şekil 3.8.	Pineapple portakal meyvelerinden çıkarılan tohumların ilaçlama işlemi için % 1'lik 8 Hydroxy-Quinoline Sülfat solüsyonu içerisinde görüntüsü.....	30
Şekil 3.9.	Pineapple portakal tohumlarının saksılara ekimi	30
Şekil 3.10.	Tohumdan yetiştirilen fidanlara gerçekleştirilen inokulasyon çalışmaları.....	31
Şekil 4.1.	Yapılan survey çalışmalarında Adana ilinde CPsV'nin genç yaprak simptomsu gözlemlenen portakal ağacı.....	39
Şekil 4.2.	Yapılan survey çalışmalarında Mersin ilinde CPsV'nin şiddetli kabuk kavlama simptomsunu gösteren mandarin ağacı	40
Şekil 4.3.	Yapılan survey çalışmalarında Hatay ilinde CPsV'nin meşe yaprağı görüntüsü gözlemlenen portakal ağacı.....	41
Şekil 4.4.	Tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Pineapple portakal fidanlarına yapılan göz ve kabuk aşılması.....	45

Şekil 4.5.	İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanında oluşan şok simptomu	46
Şekil 4.6.	İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanlarının genç yapraklarında oluşan açık renkli damar bantlaşması	47
Şekil 4.7.	İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanlarında oluşan meşe yaprağı görüntüsü	48
Şekil 4.8.	İnokulasyon sonucu pineapple portakal fidanlarının yaşlı yapraklarının üst kısmında oluşan düzensiz klorotik lekeler	49
Şekil 4.9.	İnokulasyon sonucu pineapple portakal fidanlarının yaşlı yapraklarının alt kısmında oluşan kahverengi zamklı kabarcıklar	49
Şekil 4.10.	Pineapple portakal fidanları üzerinde inokulasyonlar gerçekleştikten 8 hafta sonra oluşan ilk sürgünlerde şok simptomları	51
Şekil 4.11.	CPsV-1/ CPsV-2 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen jel görüntüsü. M markör, CPsA ile enfekteli portakal örnekleri 1-2:Adana, 3-4:Mersin, 5-6:Hatay, -K: negatif kontrol,+K:pozitif kontrol. 600 nt uzunluğunda CPsV'nün oluşturduğu band.	54
Şekil 4.12.	BC78/ BC79 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.400nt uzunluğunda CPsV'nün manto proteine ait bantlar. M markör,1: Adana, 2-3: Mersin, 4: Hatay, -K: negatif kontrol,+K: pozitif kontrol	55
Şekil 4.13.	Ps44/Ps45 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen örneklerin %1.5'luk agar jeldeki görüntüsü. CPsV'nün 276 nt uzunluğundaki RNA1 bölgesi. 1-2: Adana, 3-4: Mersin, 5-6-7: Hatay illerinden alınan portakal örnekleri.....	56

Şekil 4.14. Ps62/Ps63 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen 514 nt uzunluğundaki bantların %1.5'luk agar jel görüntüsü. CPsV ait portakal ağaçlarından elde edilen RNA2 gen bölgesi. M markör, 1-2: Adana, 3-4: Mersin, 5: Hatay, -K: negatif kontrol, +K: pozitif kontrol.....	57
Şekil 4.15. PZR işlemi sonucunda pozitif olarak belirlenen örneklerden DNA çoğaltması (Mersin izolatu).....	61
Şekil 4.16. Purifiye edilip nükleotid dizilim analizine gönderilen örnekler (RNA2 gen bölgesi) PS 62/63 primeri kullanılarak çoğaltılmış portakal örnekleri. 1: Adana, 2-3: Mersin, 4: Hatay ilinden alınan örnekler.	62
Şekil 4.17. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı RNA3(Manto protein) bölgesi karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.18. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı RNA2 bölgesi karşılaştırılması	67
Şekil 4.19. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncğil türlerinden alınan örneklerin RNA3 bölgesinin farklı izolatlarla karşılaştırılması.	69
Şekil 4.20. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncğil türlerinden alınan örneklerin RNA2 bölgesinin farklı izolatlarla karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.21. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncğil izolatlarından alınan örneklerin RNA3 bölgesinin birbiri ile ve farklı Olphio virüsler ile karşılaştırılması.....	70



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CPsV	: <i>Citrus psorosis virus</i>
cm	: Santimetre
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid fosfat
DTBIA	: Direct Tissue Blot Immunoassay
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzym-Linked Immunosorbent Assay
EPPO	: European and Mediterranean Plant Protection Organization
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FW	: Forward
gr	: Gram
K +	: Pozitif Kontrol
K -	: Negatif Kontrol

l	: Litre
M	: Markör
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar:
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Reverse
RNA	: Ribonükleik asit
R-PAGE	: Return-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Reverse Transcriptase
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
sp.	: Tür
sPAGE	: Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spp.	: Türler
SSCP	: Single Strand Conformation Polymorphism
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TE	: Tris-EDTA
TNA	: Total Nükleik Asit
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TT- PZR	: Ters Transkripsiyon- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kökeni güneydoğu Asya olan turunçgiller; turunç, portakal, mandarin, altıntop, limon ve bergamot gibi ekonomik değeri yüksek olan *Citrus* cinsi meyve ağacı türlerini içine alan bir bitki topluluğudur. Modern anlamda turunçgil tarımı 19. yüzyılda ABD’de başlamış ve hızla yayılmıştır. Dünya’da turunçgil üretimi 35° kuzey ve 35° güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Meyve grupları içinde dünyada en çok yetiştirilen ve tüketilen meyve grubudur. Dünya’da 9 milyon hektar alanda yaklaşık 138 milyon ton turunçgil üretilmektedir. Bu üretimin %57’si portakal, %23’ü mandarin, %11’i limon, %4’ü altıntop ve %5’lik kısmıda diğer turunçgil çeşitleri oluşturmaktadır. Çin toplam turunçgil üretiminin %24.1 kısmını oluşturarak en büyük turunçgil üreticisi ülke iken, onu %15.4 payla Brezilya ve % 8.1 pay ile Amerika Birleşik Devletleri takip etmektedir (FAO, 2014). Ülkemiz ise toplam dünya üretimin %2.7’lik kısmını oluşturarak yaklaşık 125 bin hektar alanda yapılan turunçgil üretimi ile en çok turunçgil üreten ülkeler arasında 9. sırada yer almaktadır (FAO, 2014).

Çizelge 1.1. Ülkelere göre turunçgil üretim verileri (FAO, 2014)

SIRA	ÜLKE	ÜRETİM (ton)	ALAN (ha)	PAY (%)
1	Çin	33.105.000	3.051.000	24.1
2	Brezilya	19.735.000	802.862	15.4
3	ABD	10.133.246	2.363.683	8.1
4	Hindistan	10.090.000	755.500	6.1
5	Meksika	7.613.105	556.789	5.1
6	İspanya	6.379.100	307.900	4.2
7	Mısır	4.092.339	173.007	3.0
8	Nijerya	3.800.000	795.000	3.0
9	Türkiye	3.681.158	125.383	2.7
10	İtalya	2.744.779	154.764	2.2
2014	TOPLAM	135.169.941	9.634.816	

Türkiye’de turunçgil çeşitlerine göre üretim verilerine bakıldığında 1.850.000 ton üretim miktarı ile portakal ilk sırada yer almaktadır ve bunu sırasıyla mandarin, limon, altıntop izlemektedir. Çizelge 1.2’ de turunçgil çeşitlerinin Türkiye’de’ki üretim miktarı ve üretim alan verileri yer almaktadır.

Çizelge 1.2. Türkiye turunçgil üretim verileri (TUIK, 2016)

ÇEŞİT	ÜRETİM ALANI (da)	ÜRETİM MİKTARI (TON)
Portakal	526.958	1.850.000
Mandarin	263.879	1.337.037
Limon	300.326	850.600
Altıntop	61.554	253.120
Diğer	132	2.250
Toplam	1.287.717	4.293.007

Ülkemizde turunçgil üretiminin %91’inin yapıldığı Akdeniz Bölgesi’ni sırasıyla %8.5 ile Ege ve %0.5 ile Doğu Karadeniz Bölgeleri takip etmektedir (Yeşiloğlu ve ark., 2007). Türkiye’deki toplam turunçgilin %85’i Çukurova ve Antalya Bölgesinde, %14’ü Ege Bölgesinde, %1’lik kısmı ise Karadeniz Bölgesi’nde üretilmektedir (TUIK, 2016). Dünya’da turunçgil yetiştirilen alanlarda virüs ve virüs benzeri hastalıklar ekonomik anlamda turunçgil tarımını sınırlayıcı en önemli faktörlerdendir ve üretim yapılan bu alanlarda 80’e yakın virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmektedir (Roistacher, 1991). Bu hastalıklardan bazıları üretimi sınırlandırması sebebiyle, turunçgil tarımını engelleyerek ve aynı zamanda hassas tür veya anaç kalem kombinasyonlarını ölüme kadar götürebilecek derecede zarar vermekte iken, bazıları ise bulaşık oldukları ağaçlara fark edilmeyecek derecede zarar vermektedir. Bu hastalıkların en önemlilerinden biri *Citrus psorosis virus* (CPsV)’nin neden olduğu Turunçgil kavlama hastalığı’dır (Roistacher, 1991). Fawcett (1933) bu hastalıkla ilgili yaptığı çalışmalardan sonra, Turunçgil kavlama hastalığının (CPsV) turunçgil tarımına verdiği zarar ortaya

konmuştur (Fawcett, 1933). Bové ve ark. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada turunçgil yetiştirilen alanlarda turunçgil tarımını etkileyerek ekonomik olarak zarara yol açan 30 önemli hastalığın virüs ve virüs benzeri etmenler tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada bu hastalıklardan 16 tanesinin Türkiye’de bulunduğu saptanmıştır (Çınar ve ark., 1993). Bunlardan en önemlileri; Stubborn (*Spiroplasma citri*; Yediverenleşme), CPsV (Turunçgil kavlama hastalığı), CTV (Tristeza; Turunçgil göçüren hastalığı), CCDD (Turunçgil klorotik cüceleşme hastalığı), CEVd (Exocortis, Turunçgil cüceleşme hastalığı) ve CCaVd (Cachexia; Turunçgil gözenekleşme hastalığı) hastalıklarıdır. Doğu Akdeniz Bölgesinde yapılan bir survey çalışmasında; bölgedeki ağaçların büyük bir kısmının, bu patojenlerden biri veya birkaçı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Güllü, 1989). CPsV’nin neden olduğu Turunçgil kavlama hastalığı Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Akdeniz ülkelerinde dahil olmak üzere turunçgil yetiştirilen ülkelerde ciddi hasara yol açan yaygın bir virüs hastalığıdır ve bunun yanı sıra ülkemizde de uzun yıllardır var olduğu bildirilmiştir (Çınar ve ark., 1993).

Ülkemizde "kavlama" olarak bilinen psorosis hastalığı yunanca ülser yada uyuz anlamında olan ‘psora’ kelimesinden gelmektedir (Roistacher, 1991). Psorosis hastalığının etmeni, *Citrus psorosis virus* (CPsV)’dür ve *Ophioviridae* familyasında *Ophiovirus* cinsi içinde yer alan tek sarmal negatif yapıda RNA virüsüdür. CPsV üç tane tek sarmal negatif yapıda RNA, RNA polimeraz enzimi ve 48 kDa büyüklüğündeki kılıf proteininden oluşan bir turunçgil virüsüdür (Derrick ve ark., 1988; Martin ve ark., 2004; Vaira ve ark., 2005). Günümüzde Turunçgil kavlama hastalığının (CPsV) iki farklı varyantı olduğu belirtilmiştir. Bunlardan birincisi hastalığın en çok görülen ırkı olan Psorosis A (PsA), ikincisi ise hastalığın daha şiddetli ırkı olan Psorosis B (PsB)’dir. Ülkemizde Psorosis hastalığı ile ilgili birçok çalışma yürütülmüş fakat bu iki ırkın genomik farklılıkları ile ilgili fazla bir hiçbir çalışma yürütülmemiştir. Bu çalışmada ile Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil bahçelerinde bulaşık olduğu bilinen Kavlama hastalığı etmeni

Citrus psorosis virus (CPsV)'nün bölgemizde yaygınlığı belirlenmiş, biyolojik ve moleküler karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde farklı turunçgil yetiştiricilik alanlarından toplanan izolatlar moleküler bazda incelenmiş ve CPsV'nin farklı genomik bölgelerinin nükleotid dizilimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen verilerin NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılarak CPsV'nin farklı turunçgil yetiştiricisi ülkeler arasındaki genetik değişimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca turunçgil bahçelerinden toplanan farklı izolatların Pineapple portakal fidanları üzerinde geliştirdiği yaprak semptomları gözlemlenmiş ve moleküler çalışmalar biyolojik indeksleme çalışmaları ile desteklenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgil psorosis virüsü ilk kez 1896 yılında Swingle ve Webber tarafından bugün PsA olarak bilinen hastalığı tanımlamak için Florida ve Kaliforniya'dan alınan turunçgil örneklerinde yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır (Swingle ve Webber 1896).

Turunçgil psorosis hastalığının etmeni, *Citrus psorosis virus* (CPsV)' dür. CPsV, *Ophioviridae* familyasında *Ophiovirus* cinsi içinde yer alan tek sarmal negatif yapıda RNA içeren bir bitki virüsüdür (Varia ve ark., 2005).

Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) etmenin *Aspiviridae* familyası içine sınıflandırmıştır (ICTV, 2018)

CPsV'ye ait partiküller ilk kez Derrick ve ark. (1993) tarafından tanımlanmış ve partiküllerin oldukça kıvrımlı, ipliksi yapıda ve iki farklı biçimde oluşabilen ayırt edilebilir helezonik iplikçiklerden oluştuğu bildirilmiştir.

CPsV virionları zarfsızdır ve 3-4 nm çapındaki dairesel iplikçikler halinde olduğu bildirilmiştir (García ve ark., 1994). Bunlar üç adet tek sarmal, negatif yapıda RNA, RNA polimeraz enzimi ve yaklaşık 48 kDa büyüklüğündeki kılıf proteininden (CP) oluşmaktadır (Derrick ve ark., 1988; García ve ark., 1991; Martín ve ark., 2004).

RNA1; 8184 nükleotit içerir ve komplementer ipliği (vcRNA) görevi henüz bilinmeyen 24kDa büyüklüğünde bir proteini kodlayan iki adet açık okuma çerçevesi (Open reading frame; ORF) içerir. RNA2; yaklaşık 1644 nükleotit uzunluğundadır ve 54 kDa büyüklüğünde görevi henüz bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. RNA3 ise; 1377 nükleotit uzunluğunda olup, kılıf proteinini (CP) kodlar (Barthe ve ark., 1998; Sánchez de la Torre ve ark., 1998, 2000, 2002; Naum- Oganía ve ark., 2003; Martín ve ark., 2004).

Portakal ve diğer duyarlı turunçgil çeşitlerinin ana gövde ve dallarında kabuk kavlamalarına neden olan bu hastalık Florida'da 'Scaly bark' veya

‘Gummosis’ Kaliforniya’da ise ‘Scaly Bark’ veya ‘Scaly bark gum disease’ olarak adlandırılmıştır (Fawcett ve Klotz, 1938; Wallace, 1957; 1968).

Turunçgil kavlama hastalığının (CPsV) iki farklı ırkı olduğu tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi hastalığın en çok görülen ve kabuk kavlamasının yalnızca gövde ve ana dallarda ortaya çıkan ırkı olan Psorosis A (PsA), ikincisi ise hastalığın daha şiddetli ırkı olan ve kabuk kavlamalarının ince dallara kadar hızlı bir şekilde genişlemiş Psorosis B (PsB) olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Fawcett & Klotz, 1938; Klotz& Fawcett, 1941; Fawcett & Bitancourt, 1943).

Fawcett 1933 yılında CPsV’nin kabuk kavlama simptomlarının yanında genç yapraklarda beneklenme simptomlarını da tanımlamıştır.

Genç yaprak simptomları genellikle ilkbahar sürgün gelişme döneminde aktif şekilde büyümekte olan genç yaprakların tüm yüzeyinde ya da yaprağın belirli bir bölgesinde ortaya çıkmaktadır (Wallace, 1968).

Turunçgil Psorosis hastalığının turunçgil ağaçlarında oluşturduğu genç yaprak simptomları geçici olup yapraklar olgunlaşmaya başladıktan sonra kaybolmaktadır. Fakat hastalığın şiddetli formu olan PsB varyantında infekteli ağaçların olgun yapraklarında kalıcı simptomlar oluşturmaktadır. Genç yapraklarda oluşan damar bantlaşması şeklindeki simptomlar birleşerek olgun yapraklarda kalıcı klorotik lekeler meydana getirmekte, bazen de olgun yapraklarda meşe yaprağı desenini koruyacak şekilde yarı şeffaf alanlar ortaya çıkmaktadır (Wallace, 1968; Timmer ve Beiiatena, 1977; Timmer ve ark. 1980).

İlkbahar büyüme döneminde oluşan ve henüz sertleşmemiş genç yapraklarda damar bantlaşması (vein-banding) veya meşe yaprağı (oak-leaf) görüntüsü gibi belirtiler oluşmaktadır (Korkmaz ve Önder, 2008).

CPsV’nin yaygın varyantı olan PsA genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı görüntüsü gibi yaprak simptomlarıyla birlikte gövde ve ana dallarda kabuk kavlamaları ile karakterize edilirken, hastalığın daha şiddetli varyantı olan PsB yaşlı yaprakların üstünde düzensiz klorotik lekeler, yaşlı

yaprakların alt kısmında kahverengimsi zamklı kabarcıklıklar ile gövdeden ince dallara kadar yoğun kabuk kavlamalarıyla karakterize edilmiştir (Fawcett ve Cochran, 1943).

CPsV ile enfekteli olan ağaçların önce gövde veya dallarında çok küçük sivilce benzeri kabartılar şeklinde lezyonların oluşumuna neden olur, daha sonra bu lezyonlu alanlar genişler ve düzensiz tabakalar halinde ya da küçük pulcuklar şeklinde kabuk kavlamaları gelişir. Kavlayan kabukların altındaki odun dokusunda zamklı ksilem tabakaları çok tipiktir (Wallace, 1957). Turunçgil psorosis hastalığının en çok görülen karakteristik belirtileri, 10 yaşından büyük ağaçlarda, aşı birleşme noktasından başlayıp gövde ve ana dallarda kabuk dokusunun pul pul veya tabakalar halinde kavlaması ve iç odun dokusu ile sürgünlerde lekelenmeler şeklindedir ve bu bölgelerde ilkbaharda zamk akıntılarına neden olmaktadır (Roistacher, 1993).

CPsV çok nadir olarak infekteli olduğu ağaçların ölümüne sebep olur. Hastalığa dayanıklı olmayan bazı türlerde; zayıf yaprak gelişimi, ince dalların geriye doğru ölümü, büyümede duraklama, düşük verim ve meyvelerin küçük kalması gibi simptomların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Roistacher, 1993).

CPsV'nin neden olduğu Turunçgil kavlama hastalığı Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Akdeniz ülkelerinde dahil olmak üzere turunçgil yetiştirilen ülkelerde ciddi hasara yol açan yaygın bir virüs hastalığıdır (Roistacher, 1993).

CPsV turunçgil yetiştirilen alanlarda hastalıklı ağaçların iletken dokularını etkileyerek yıllık yaklaşık % 5'lik verim kaybına neden olmaktadır (Achachi, 2014).

CPsV turunçgil türlerinden portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*C. reticulata*) ve altıntopun (*C. paradisi*) ana hastalığı olmakla birlikte, hastalığa en hassas olan çeşit portakaldır. Limon gibi bazı türlerde kabuk kavlaması görülmemesine rağmen, genç yapraklarında şiddetli damar bantlaşması simptomları gözlenmiştir. Üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata*) ise CPsV hastalığını simptom göstermeden barındırır ve bu sebeble üç yapraklı portakal (*P.*

trifoliata) ve hibritlerinden Carrizo CPsV'ye karşı tolerant anaç olarak kullanılmaktadır (Milne, 1997).

CPsV bitkinin bütün aksamında bulunur ve her türlü aşı materyali ile taşınabilir. Turunçgil yetiştirilen bir çok alanda hastalığın sadece enfekteli aşı gözleri ile yayıldığı ve taşıyıcı bir vektörü olmadığı bilinmektedir (Milne, 1997)

2.1. CPsV İle İlgili Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Kaliforniya'da 6000 ağaçta yapılan survey sonucunda ağaçların %14'nün CPsV ile bulaşık olduğu hastalığın üründe meydana getirdiği azalma sonucu % 6,5 oranında bir gelir kaybı oluşturduğu tespit edilmiştir (Knorr ve Childs, 1968).

Arjantin'de ciddi ekonomik kayıp neden olan Turunçgil psorosis hastalığına karşı yapılan kontrol uygulamalarında, sertifikasyon programı başarısız olmuştur (Danos, 1990).

Yapılan bir çalışmada CPsV'nin yalnızca bitki floemi ile sınırlı olmadığı DTBIA (Direct Tissue Blot İmmunoassay) ile bitkinin parankima hücrelerinde de çoğaldığı gösterilmiştir (Martin ve ark., 2002).

CPsV'nün aşı yolu ile taşınan patojen olduğunun tespitinde turunçgil fidelerinin kullanımı ilk olarak 1968 yılında Wallace tarafından gerçekleştirilmiştir (Wallace, 1968).

Turunçgil psorosis hastalığı deneysel olarak turunçgil bitkileri arasında aşı kalemi ile rahatlıkla taşınabilmiştir. CPsV enfekteli bitkinin büyüyen kallus dokusunda aynen kalmıştır ve kabuk dokusunun altındaki bu kallus hücreleri aşı yoluyla başka reseptör (alıcı) bitkilere taşınabilmiştir (Navas-Castillo ve ark. 1995).

Price (1965) *Citrus psorosis virüs*'nü *Cuscuta compacta* ile %5 oranında portakal bitkilerine taşıdığını rapor etmiştir. Weathers ve Herjung (1964) yaptıkları bir çalışmada *Cuscuta subinclusa* bitkisini kullanarak CPsV'ü turunçgilden turunçgile taşımada başarılı olmuşlardır.

CPsV'nin aşı yolu ile taşınan patojen olduğunun tespitinde turunçgil fidanlarının kullanımı ilk olarak 1968 yılında Wallace tarafından gerçekleştirilmiştir ve turunçgil fideleri ile yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında arazide yaklaşık 11 yılda gözlenebilen kabuk kavlama simptomları portakal fidanlarının indikatör bitki olarak kullanılmasıyla 6 hafta sonra genç yaprak simptomları gözlemlenmiştir (Wallace, 1968).

CPsV'nin biyolojik olarak tanımlanmasında en uygun indikatör bitkilerin Pineapple, Parson Brown, Hamlin, Koethen ve Madam Vinous portakal çeşitleri olduğu ancak diğer turunçgil çeşitlerinde CPsV'nin genç yaprak simptomlarını geliştirebildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Wallace, 1968).

Child ve Jhonson (1966) CPsV'nin Carrizo sitranj (*Citrus sinensis* (L.) Obs.X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) tohumlarıyla %1-10 oranında taşındığını bildirmelerine rağmen yeterli biyolojik indeksleme yapılamamış ve arazide yapılan tohumla taşınma testleri negatif sonuç vermiştir.

Yapılan çalışmalar ile Kavlama hastalığı, teşhis amaçlı kullanılan otsu bitkilere mekanik olarak taşındığı belirlenmiştir (Derrick ve ark., 1988).

Milne tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda Kinoa'ya (*Chenopodium quinoa*) uygulanan mekanik inokulasyonla, kloroz ve nekrotik lokal lezyon oluşumları 4-10 gün içinde gözlenirken, Hanım düğmesi (*Gomphrena globosa*) bitkisinde, inokulasyondan 10 gün sonra kırmızı haleler şeklinde nekrotik lokal lezyonlar oluşur ve bunu sistemik nekrozlar takip ettiği belirtilmiştir (Milne, 1997).

Milne tarafından gerçekleştirilen biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan Pineapple veya Madam Vinous gibi inoküle edilmiş portakal çeşitlerinin yapraklarında klorotik benekler görülmüştür (Milne, 2003).

Vogel ve Bove (1980) citrus psorosis virüsünün deneysel olarak polenle taşınabildiğini göstermiş ise de Timmer ve Garnsey (1980) bu tip doğal yayılmanın çok etkili ve yaygın olmadığını bildirmişlerdir.

Teksas'da yapılan bir çalışmada CPsV'nin *Oomyces* familyası *Olpidium* cinsine dahil fungal vektörler içinde varlığı rapor edilmiştir (Palle ve ark., 2005).

CPsV hastalığı serolojik olarak; portakal (*Citrus sinensis*), turunç (*C. aurantium*), limon (*C. limon*), altıntop (*C. paradisi*), klemantin mandarini (*C. clementina*), satsuma (*C. unshiu*), fortune mandarini (*C. celementina* x *C. tangerina*) ve ortanique tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) hibritleri gibi bir çok turunçgil türünde saptanmıştır (Milne, 1997).

PCR ve ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) yöntemlerinin kullanılarak gerçekleştirildiği bir çalışmada her ikisinde de heterolog izolatların homolog CPsV4 antijenine göre daha az güvenilir bir şekilde saptandığı gözlenmiştir (Garcia ve ark., 1997).

Derrick ve ark. (1993)' ın yaptıkları araştırmalarda CPsV4 ırkına karşı geliştirilen monoklonal antibodylerin (MAbs) yalnızca homolog antijenler ile pozitif reaksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Barthe ve ark. (1998) tarafından geliştirilen bu monoklonal antibodiler, CPsV'yi tanılamak için daha az önemli olsalar dahi, CPsV ırklarının serolojik teşhislerdeki farklarını tespit etmek için yararlı olmuşlardır.

Yapılan bir çalışmada biyolojik olarak karakterize edilmemiş örnekler ve biyolojik karakterizasyonu yapılmış CPsV izolatlarının tespitinde ELISA, moleküler hibridizasyon, TT-PZR ve immuno elektron mikroskobu yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan yöntemlerin sonuçları karşılaştırıldığında ise ELISA, TT-PZR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinde testlenen bütün örnekler aynı sonuçları vermiştir (Martin ve ark., 2002).

Turunçgil psorosis virüsünü serolojik olarak tanılamak için DTBIA kullanılarak yapılan bir çalışmada olgun yapraklar ve çiçek parçaları kullanılmış ve kullanılan bu bitki kısımları içerisinde homolog dağılım ve en iyi virüs yoğunluğu çiçeklerde saptanmıştır (Martin ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar sonucunda CPsV'nin tanılanmasında kullanılan serolojik yöntemler arasında DTBIA dişi organların kullanımı en başarılı sonuçları vermiştir (D'Onghia ve ark. 2001).

Roistacher ve Calavan 1974 yılında yaptıkları bir çalışmada yüksek sıcaklıkların CPsV'nin simptomlarının gizlenmesine sebep olduğunu 28-40°C gündüz ve 26-27°C gece sıcaklıklarında 3-4 ay tutulan CPsV ile infekteli bitkilerin turunçgil psorosis virüsünden tamamen elimine olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca inokulasyonda kullanılan doku parçalarının büyüklüğü, sayısı ve alındığı yerin simptom gelişimi için gerekli olan süreyi ve simptom yoğunluğunu etkileyebildiğini vurgulamışlardır.

CPsV'nin biyolojik karakterizasyonları yapılmış olan P121, P126, PB108 ve RS-SR izolatları kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada; bu izolatlar Limon (*C. limon*), klemantin mandarini (*C. clementina*), altıntop (*C. paradisi*), satsuma (*C. unshiu*) ve ortanique tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*)'a aşı kalemi ile inokule edilmiş ve bu bitkiler 18-26 °C arasında olan seralarda büyütülmüştür. İnokulasyondan sonraki 3- 6 ay boyunca yapılan kontrollerde çeşitli belirtiler gözlenmiştir. P121 ve RS-SR izolatları konukçu bitkilerin yapraklarında şekil bozuklukları, damar bantlaşmaları gibi ciddi simptomlara yol açarken, P126 izolatının konukçu bitkinin genç yapraklarında klorotik beneklenmeler ve sarı renkli halelerin olduğu gözlemlenmiştir (Martin ve ark., 2002).

CPsV'nin bazı izolatları teşhis amaçlı kullanılan otsu bitkilere mekanik olarak taşınabilmektedir (Timmer ve Garnsey, 1980; Derrick ve ark., 1988; Navas-Castillo ve ark., 1993; Garcia ve ark., 1993; Navas-Castillo ve Moreno, 1995).

Yapılan bir çalışmada Kinoa bitkisine (*Chenopodium quinoa*) uygulanan mekanik inokulasyonda, kloroz ve nekrotik lezyonlar 4-10 gün içerisinde gözlenirken, Hanım düğmesi bitkisine (*Gomphrena globosa*) uygulanan mekanik inokulasyondan 10 gün sonra kırmızı haleler şeklinde nekrotik lokal lezyonlar oluştuğu ve bunu sistemik nekrozların takip ettiği gözlemlenmiştir (Milne, 1997).

CPsV'nin biyolojik yöntemlerle tanılanması için İtalya'da yapılan bir biyolojik indeksleme çalışmasında indikatör bitki olarak *Chenopodium quinoa* ve *Chenopodium amaranticolor* otsu bitki türleri kullanılmıştır. İnokülasyonu tamamlanan bitkilerden *C. quinoa* bitkisinin yapraklarında klorotik ve nekrotik

lokal lezyonlar gözlenirken, *C. amaranticolor*' da sistemik beneklenme ve halkalı lekeler olduğu gözlemlenmiştir (D'onghia ve ark., 1998).

Yapılan bir çapraz koruma testinde şiddetli concave gum symptomunun PsA ırkının kabuk kavlama symptomuna karşı herhangi bir koruma sağlamadığı ancak hafif concave gum symptomuna karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (Roistacher ve Calavan, 1965).

CPsV' nin tanınması için DTBIA ve ELISA testleri kullanılarak yapılan bir çalışmada arazi simptomları ve indikatör bitkiler yardımıyla tanınan PsB varyantına karşı çapraz koruma testleri uygulanmıştır.Uygulanan DTBIA ve ELISA testleri ile çapraz koruma testi aynı sonuçları vermiş ve PsB'nin spesifik olarak tanınması için çapraz koruma testinin en uygun yöntem olduğu belirlenmiştir (Martin ve ark., 2002).

Florida'da yapılan bir çalışmada biyolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olan CPV-4 ve CPV-6 izolatları kullanılarak CPsV'nin kılıf protein geni dizisini belirlemişlerdir (Barthe ve ark., 1998).

CPsV'nin PsA ve PsB varyantlarının genomik dizilimlerinin farklılıklarını belirlemek için yapılan bir çalışmada biyolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiş P121 ve PsF izolatları kullanılarak pineapple portakal fidanları üzerine simptomsuz ve kabuk kavlama simptomlu olarak inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonu gerçekleştirilen bitkilere yapılan SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analizleri sonucunda PsA ve PsB varyantlarının RNA1 ve RNA3 bölgelerinde hiçbir farklılık gözlenmez iken SSCP analizi sonucunda RNA2 bölgelerinde farklılık olduğu gözlemlenmiş ve PsB varyantının CPsV'nin bir RNA2 dizilimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Velazquez ve ark., 2012).

2.2. CPsV İle İlgili Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de CPsV’nin varlığı ilk kez 1963 yılında Norman tarafından Doğu Akdeniz bölgesinde belirlenmiştir (Norman, 1963).

Ege Bölgesinde yapılan surveylerde CPsV semptomatik olarak saptanmıştır (Özalp, 1966).

Doğu Karadeniz Bölgesinde Ordu ve Rize illeri arasında yapılan bir surveyde turuncgil ağaçlarının %1-2 oranında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Cengiz ve ark., 1968).

Ege Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada ise turuncgil ağaçlarının %50 oranında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Azeri ve Heper 1973).

Doğu Akdeniz Bölgesinde ticari portakal çeşitlerinde psorosis grubu hastalıkların biyolojik indekslenmesi yapılmıştır. İndeksleme çalışmaları sonunda materyal olarak seçilen ağaçların CPsV ile infekteli olduğu ve görsel olarak hastalık semptomlarını göstermeyen ağaçların CPsV’den arı olmadıkları belirlenmiştir. İndikatör bitkiler üzerinde yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında bitkilerde yeni gelişen sürgünlerde ortaya çıkan şok semptomları, genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni, ve olgun yapraklar üzerinde yama şeklinde lekelenmeler gibi hastalığın karakteristik semptomları gözlemlenmiştir (Önelge, 1988).

Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yapılan bir surveyde Navel portakallarda %64-80, Satsuma mandarinlerde %15.8-31 oranında CPsV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Güllü, 1989).

Turuncgillerde GA₃ uygulaması ve *in vitro* sürgün ucu aşılama tekniği kombinasyonunun Psorosis grubu hastalık etmenlerinden arındırılmış üretim materyali elde etme oranına etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada mandarinlerin %70, altıntopların %60 ve limonların %71 oranında arındırıldığı bildirilmiştir (Şaş, 1991).

1997 yılında Doğu Akdeniz Bölgesinden alınan turuncgil örnekleri DAS-ELISA yöntemi kullanılarak CPsV serolojik olarak tespit edilmiştir (Yılmaz, 1997).

Edremit körfez Bölgesindeki turuncgil üretim alanlarında yapılan bir survey çalışmasında Satsuma Owari mandarin ağaçlarından örnekler alınarak CPsV' ü belirlemek için DAS-ELISA yöntemi kullanılmış ve analizler sonucunda CPsV için testlenen 10 örneğin hiçbirisinde pozitif sonuç elde edilememiştir (Korkmaz ve Önder, 2008).

Kayım (2010) CPsV'nin biyolojik ve moleküler tanımlanmasını gerçekleştirmek için Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaptığı bir çalışmada arazi surveylerinde damar bantlaşması ve meşe yaprağı gibi genç yaprak belirtileri bulunan turuncgil çeşitlerinden toplanan örnekleri bir yaşındaki portakal fidanlarına inoküle etmiştir. İndikatör olarak kullanılan 50 adet portakal fidanının 32 tanesinde damar bantlaşması, meşe yaprağı görüntüsü ve damar sararması gibi genç yaprak belirtileri gözlenmiştir. İndikatör bitkilerin 18 tanesinde ise düşük oranda genç yaprak belirtileri gözlemlenmiştir. CPsV'yi moleküler olarak tanımlamak için yapılan arazi çalışmalarında CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen belirtilmeli ağaçlardan toplanan yaprak örnekleri TT-PZR yöntemini kullanılarak tanımlanmıştır. CPsV'nin kılıf proteinine özgü 434 bp'lık bir DNA CPsV ile infekteli yaprak örneklerinden çoğaltılan cDNA' dan elde edilmiştir. Bu spesifik DNA ürünü CPsV ile infekteli ağaçlardan alınan belirtilmesiz yaprak örneklerinden ve CPsV ile bulaşık olmayan ağaçlardan alınan sağlıklı yaprak örneklerinden elde edilmemiştir (Kayım, 2010).

Antalya ili turuncgil üretim alanlarında yapılan bir çalışmada yapılan surveylerde belirlenen 51 şüpheli ağaçtan alınan yaprak ve sürgün örnekleri CPsV ile infekte olduğunu belirlemek amacıyla öncelikle DTBIA ve ELISA yöntemiyle test edilmiştir. Yapılan testlenmelerde 6 örneğin CPsV ile enfekteli olduğu saptanmıştır ve örneklerin total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, CPsV' nin kılıf protein (CP) geni TT-PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. TT-PZR ile test

edilen 51 örneğin 6 tanesinde 1320 bp büyüklüğünde CPsV CP genine denk gelen bant elde edilerek serolojik testlerin sonuçları teyit edilmiş ve kılıf protein genlerinin dizilimi yapılarak bunların nükleotid dizilimi ve kodladığı amino asit dizilimi belirlenmiştir. Bu diziler analiz edilerek ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen CPsV izolatlarının birbirleriyle ve diğer izolatlarla benzerlik oranları karşılaştırılmış ve filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur (Kütük, 2011).





3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitkisel materyali, Doğu Akdeniz Bölgesindeki eski turuncgil bahçelerinden CPsV'nin genç yaprak semptomları, yaşlı yaprak semptomları, kabuk kavlama semptomları, odun dokusu deformasyonları, concave gum semptomlarına göre toplanan portakal, mandarin, altıntop bitkilerine ait örnekler oluşturmuştur. CPsV hastalığının semptomlarını gösteren ağaçlardan aşı kalemleri şeklinde ağacın dört yönünden örnekler alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Çalışmada kullanılan turuncgil örneklerine ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitki örneklerine ait bilgiler

Örnek No	Bölge	Semptom	Çeşit
CPsV-1	Mersin	Kabuk kavlama+ Genç yaprak semptomu	Satsuma
CPsV-2	Mersin	Kabuk kavlama+ Genç yaprak semptomu	Satsuma
CPsV-3	Mersin	Genç yaprak semptomu	Washington
CPsV-4	Mersin	Genç Yaprak semptomu	Satsuma
CPsV-5	Mersin	Concave gum	Satsuma
CPsV-6	Mersin	Odun dokusu deformasyonu	Satsuma
CPsV-7	Mersin	Yaşlı yaprak semptomu	Altıntop
CPsV-8	Mersin	Genç yaprak semptomu	Altıntop
CPsV-9	Mersin	Concave gum	Satsuma
CPsV-10	Mersin	Odun dokusu deformasyonu	Satsuma

Çizelge 3.1. Devamı

CPsV-11	Adana	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Klementin
CPsV-12	Adana	Concave gum	Yafa Portakal
CPsV-13	Adana	concave gum	W. Navel
CPsV-14	Adana	Yaşlı yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-15	Adana	Concave gum	W. Navel
CPsV-16	Adana	Yaşlı yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-17	Adana	Odun dokusu deformasyonu	W. Navel
CPsV-18	Adana	Genç yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-19	Adana	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-20	Adana	Genç yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-21	Adana	Genç yaprak simptomu	Valencia
CPsV-22	Adana	Odun dokusu deformasyonu	W.Navel
CPsV-23	Mersin	Yaşlı yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-24	Mersin	Genç yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-25	Mersin	Odun dokusu deformasyonu	Satsuma
CPsV-26	Mersin	Yaşlı Yaprak simptomu	Valencia
CPsV-27	Mersin	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Valencia
CPsV-28	Mersin	Concave gum	Valencia
CPsV-29	Mersin	Odun dokusu deformasyonu	Altıntop
CPsV-30	Mersin	Yaşlı Yaprak simptomu	Altıntop
CPsV-31	Hatay	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-32	Hatay	Yaşlı yaprak simptomu	Satsuma

Çizelge 3.1. Devamı

CPsV-33	Hatay	Odun dokusu deformasyonu	Satsuma
CPsV-34	Hatay	Concave gum	Satsuma
CPsV-35	Hatay	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Altıntop
CPsV-36	Hatay	Genç yaprak simptomu	Altıntop
CPsV-37	Hatay	Concave gum	W. Navel
CPsV-38	Hatay	Odun dokusu deformasyonu	W. Navel
CPsV-39	Hatay	Yaşlı yaprak simptomu	W. Navel
CPsV-40	Hatay	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Klementin
CPsV-41	Hatay	Genç yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-42	Hatay	Concave gum	W.Navel
CPsV-43	Hatay	Odun dokusu deformasyonu	W.Navel
CPsV-44	Hatay	Yaşlı yaprak simptomu	Altıntop
CPsV-45	Adana	Concave gum	W.Navel
CPsV-46	Adana	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Yafa Portakal
CPsV-47	Adana	Odun dokusu deformasyonu	W.Navel
CPsV-48	Adana	Yaşlı yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-49	Adana	Kabuk kavlama+ Genç yaprak simptomu	Satsuma
CPsV-50	Adana	Yaşlı yaprak simptomu	W.Navel

3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Yürütülen biyolojik indeksleme çalışmalarında tohumdan yetiştirilmiş olan Pineapple portakal fidanları kullanılmıştır. Pineapple portakal fidanlarına aşılacak olan CPsV etmenine ait inokulum materyali Doğu Akdeniz Bölgesi eski

turunçgil bahçelerinden alınan örnekler ile Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Biyolojik indeksleme çalışmaları esnasında; şırınga ucu, lateks eldiven, % 2'lik hipoklorit, 1X TKM tamponu çözeltisi, saf su, parafilm bantlar, viyoller ve plastik saksılar gibi çeşitli materyaller kullanılmıştır.

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

Yürütülen TNA ekstraksiyonu çalışmalarında; Doğu Akdeniz Bölgesi eski turunçgil bahçelerinden alınan bitki örnekleri, hassas terazi, mikrosantrifüj cihazı (Beckman, J-21 C), CTAB buffer (PVP-40, Tris HCL, EDTA, NaCl, β -Mercaptoethanol), havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, % 2'lik hipoklorit, kurutma kağıdı, 1,5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, rak, su banyosu, derin dondurucu, vorteks ve santrifüj cihazı, kloroform : izoamil alkol (24 : 1), izopropanol, % 70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi, saf su cihazı gibi çeşitli materyaller ile laboratuvar aletlerinin sterilizasyonu amacıyla da otoklav ve etüv gibi ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.4. TT-PZR (Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmalarında Kullanılan Materyal

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

Ters Transkripsiyon (TT) işlemi için kullanılan kimyasallar, Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ters Transkripsiyon (TT) reaksiyon karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
Toplam nükleik asit	5 µl
RNase-free su	7.9 µl
5X Buffer	4 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Random primer (0,5µg/ µl)	1 µl
M-MLV-RT enzim	0,5 µl
RNasin Ribonükleaz İnhibitör	0,3 µl
Toplam Hacim	20 µl

PZR işlemi için kullanılan kimyasallar, Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyon karışım kimyasalları

Kimyasallar	Miktar/Reaksiyon
cDNA	2,5 µl
RNase-free su	14.5 µl
10X Dream Taq	2,5 µl
dNTP (10 mM)	2,5 µl
Primer F (10 mM)	1µl
Primer R (10 mM)	1µl
Go Taq enzim	1µl
Toplam Hacim	25 µl

TT-PZR çalışmalarında kullanılan primerlere ait bazı bilgiler Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. CPsV'i belirlemede kullanılan primer çiftleri

Primerler	Sekans Dizilimi (5'-3')	Çoğaltılan Bölge (bp)	Tanımlanan Bölge
BC76	ATGTCGATCCWATYAAGTSTCAC	1320 bp	RNA3 (CP)
BC77	TTACATAGTYGMWGCYACCCCAAAG	1320 bp	
BC78	TGCTCCAACAAAGAAATTCCC	350 bp	RNA3 (CP)
BC79	TTCTGCCATCTGGAGTGAGGC	350 bp	
Ps44	GACAGAGATTTAGAAATAGA	276 bp	RNA1
Ps45	TACATCACTATCTAATCCTAT	276 bp	
Ps62	AAAGATGTTTTCATGTTCTCT	514 bp	RNA 2
Ps63	TATTTAAAGCGAAACATGAT	514 bp	
CPV-1	GCTTCCTGGAAAAGCTGATG	600 bp	RNA 3 (CP)
CPV-2	TCTGTTTTTGCAACACACTCC	600 bp	

3.1.5. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

TT-PZR çalışmaları için, transkripsiyon amaçlı PZR ile çoğaltılan CPsV izolatlarının analizinde, TAE tampon, agar jel, elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 100 bp DNA marker, materyal olarak kullanılmıştır.

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

3.2. Metot

3.2.1. Survey Çalışmaları

Çalışma Doğu Akdeniz Bölgesindeki Adana, Mersin ve Hatay illerindeki 10 dekardan ve 10 yaşından büyük portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde gerçekleştirilmiştir. Survey çalışmaları bitkilerin aktif sürgün döneminde olduğu ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde yapılmıştır. CPsV'nin yaygınlığının

belirlenmesinde hastalığın karakteristik simptomlarından olan genç yaprak simptomları (Şekil 3.1) gösteren ağaçlar değerlendirilerek hastalığın yaygınlık durumu belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Adana ili portakal ağacında görülen genç yaprak simptomsu

3.2.2. Bitki Örneklerinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan turuncgil örnekleri, Doğu Akdeniz Bölgesindeki eski turuncgil bahçelerinden CPsV ile bulaşık olduğu bilinen ağaçlardan genç yapraklarda damar bantlaşması (Şekil.3.2) ve oak leaf simptomsu (Şekil.3.3), kabuk kavlama (Şekil.3.4), şiddetli kabuk kavlama (Şekil.3.5), yaşlı yaprak simptomları (Şekil.3.6), odun dokusu deformasyonları ve concave gum (Şekil.3.7) simptomları gösteren bitkilerden seçilmiştir ve seçilen her bir ağaçtan farklı yönlerinden olmak üzere üçer örnek alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilerek buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turuncgil Virüsleri

Laboratuvarı'na getirilmiştir. A  ı kalemlerinin yaprakları temizlenerek indeksleme çalışmalarında kullanılmak üzere +4C  'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.2. Mersin ilinde satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin genç yapraklarda damar bantlaşması simptome



Şekil 3.3. Mersin ilinde Satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin meşe yaprağı görüntüsü



Şekil 3.4. Adana ilinde W. Navel portakal ağacından alınan örneklerden CPsV'nin kabuk kavlama simptomu



  kil 3.5. Hatay ilinde Satsuma mandarin ağacından alınan örneklerden CPsV'nin şiddetli kabuk kavlama simptome



Şekil 3.6. Mersin ili portakal ağaçlarından alınan örneklerden CPsV'nin yaşlı yaprak belirtileri



Şekil 3.7. Mersin ilinde Satsuma mandarinden alınan örneklerden CPSV'nin concave gum belirtileri

3.2.3. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılacak İndikatör Bitkilerin Yetiştirilmesi Ve İnokulasyon Çalışması

CPSV etmeninin varlığını araştırmak için kullanılacak olan indikatör bitki Pineapple portakal tohumlarından yetiştirilmiştir. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi turuncgil koleksiyon parselinde bulunan Pineapple portakal ağaçlarından, meyvelerin olgunlaşmaya başladığı Aralık-Ocak aylarında meyveler toplanarak tohumları için kullanılmıştır. Meyvelerden çıkarılan tohumlar (Şekil 3.8), üst yüzeyindeki yapışkan maddenin uzaklaştırılması amacıyla, bol suda yıkanmış ve oda sıcaklığında, fazla nemin alınması için gazete kağıtları üzerine yayılmıştır. Üst yüzeyi kuruyan tohumlar, bez torbalar içine konarak 52 °C 'de 10 dakika sıcak su uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Daha sonra % 1'lik 8 Hydroxy-Quinoline Sülfat çözümü içerisinde, 3 dakika bekletilerek, ilaçlama işlemi tamamlanmıştır (Giocometti, 1986). İlaçlanan tohumlar, gazete kağıtları üzerinde tekrar 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Hafif kuru ve nemli tohumlar, polietilen torbalar içine

konularak, kullanılıncaya kadar, +4 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Pineapple portakal meyvelerinden çıkarılan tohumların ilaçlama işlemi için % 1’lik 8 Hydroxy-Quinoline Sülfat solüsyonu içerisinde görüntüsü

İndikatör bitki olarak kullanılacak Pineapple portakal tohumları her bir saksıya 20 adet tohum (Şekil 3.9) gelecek şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. Tohumlarda çıkış gözlemlenene kadar üzerleri gazete kağıtlarıyla kapatılmış ve soğuk havalardan etkilenmemeleri için, ÇÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Parsellerinde bulunan seralara konulmuştur. İndeksleme için kullanılacak olan Pineapple çöğürleri, 10-15 cm büyüklüğe ulaşınca tek tek saksılara şaşırtılmış ve haftada bir kez sulama ve gübrelemesi yapılmıştır.



Şekil 3.9. Pineapple portakal tohumlarının saksılara ekimi

Tohumdan yetiştirilen 8 aylık fidelere göz ve kabuk aşılaması olarak inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir. Her simptom grubu için 1 arazi   rne  i seçilmiş ve biyolojik indekslemeye alınmıştır.   nokulum yapıldıktan sonra bitkiler haftalık olarak yaprak simptomları ve   ok reaksiyonları açısından gözlemlenmiştir. 2 ay sonra geriye doğru budama yapılmış ve yeni sürgünlerin gelişmesi sağlanmış ve hastalık belirtileri gözlemlenmeye devam edilmiştir. Biyolojik indeksleme çalışmalarında etmenin bulaşık olduğu ağaçlarda oluşturduğu genç yaprak simptomları ve olgun yaprak simptomları hastalık belirtisi olarak değerlendirilmiştir. Yürütülen inokulasyon çalışmalarına ait bazı görseller,   ekil 3.10.da verilmiştir.



Şekil 3.10. Tohumdan yetiştirilen fidanlara gerçekleştirilen inokulasyon   alı  maları

3.2.4. TNA Ekstraksiyonu   alı  maları

CPsV'nin moleküler olarak tanınması için CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tamponu kullanılarak hazırlanmış    zelti TNA işlemine tabi tutulmuş, RNA elde edilmesi sağlanmıştır (Murray ve Thompson, 1980). CTAB tampon içeriği   izelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. CTAB tampon içeriği

Ph:8.00	100 ml	200 ml
CTAB (hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)	2,00 g	4.00 g
Tris HCL	1.57 g	3.14 g
EDTA	0.58 g	1.16 g
NaCl	8.17 g	16.34 g
PVP-40 (%2)	2.00 g	4.00 g
2 Mercaptoethanol % 0.2	100 µl	200 µl

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

- Bitkisel materyallerden 500 mg miktarında örnek alınarak, 1:10 m/v CTAB tamponu çözeltisi eklendikten sonra örnek homojen olacak şekilde havanlar yardımıyla ezilmiştir.
- 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 2ml bitki özsuğu pipet yardımıyla alınmıştır.
- Örnekler 65 °C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilmiş ve 60 dakika bekletilmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek, 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst sıvı fazdan 1 ml'lik kısım aktarıldıktan sonra, tüplere 1 ml kloroform: isoamil alkol (24:1) eklenip ve çalkalanarak iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne üst fazdan 750 µl alınıp aktarılmış ve üzerine 450 µl soğuk 2-propanol eklenip yavaşça 2 kez karıştırılmıştır.
- -20 °C'de 60 dakika inkube edilmiştir.

- İnkube edilen örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip, sıvı faz dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.
- Kalan pelet (katı faz) ise 1 ml % 70'lik etanolle yıkanmıştır.
- % 70'lik etanolle yıkanan örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, % 70'lik etanol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
- Örnekler kurutma kağıdı üzerinde hava ile kurutulmuştur.
- Katı kısım (pelet) 100 µl TE tampon çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür.
- Ekstrakte edilen total nükleik asit kullanılıncaya kadar, -20 °C derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.
- Spektrofotometre'de A260/280 nm'de konsantrasyonu belirlenmiştir. Yüksek kalitede nükleik asit için optimum A260/280 değeri 2'ye yakın olan örnekler çalışmada kullanılmıştır.
- Ters transkriptaz işlemi için 3-5 µl TNA kullanılmıştır.

3.2.5. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR) Çalışmaları

TT-PZR çalışmaları Önelge (1997)'ye göre iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada bir RNA virüsü olan CPsV'ün RNA'sı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilmiş ve daha sonra PZR çalışmasına alınmıştır.

Elde edilen TNA ekstraktlarından cDNA sentezi ve PZR adımlarından oluşan TT-PZR testinde, her bir örnek için aşağıdaki yöntemler adım adım olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bütün PZR çalışmalarında, pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril distile su) kullanılmıştır.

3.2.5.1. Ters Transkripsiyon (TT) Çalışmaları

Bu çalışmada örnekler için TT işlemi aşamaları aşağıdaki şekilde gerçekleşmiştir.

- 5 µl total RNA, 200 pmol random primer 1 µl PZR tüpleri içerisine konularak su ile 10 µl ye tamamlanmıştır.
- Hazırlanan karışım daha sonra 65 °C’de 5 dakika süre ile thermal cycler cihazında bekletilmiştir.
- Cihazdan çıkarılan örnekler hemen buz içerisine alınıp 2 dakika bekletilerek RNA’ların denatürasyonu yapılmıştır.
- Denatürasyonu yapılan RNA ve primer karışımına 1X Reverse transkriptaz tampon solüsyonu (50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0.5 mM dNTP, 20 ünite PrimerScript Reverse transkriptaz, 20 ünite RNase İnhibitörü ve su eklenerek 20 µl TT karışımı hazırlanmıştır.
- PZR aleti 30 °C 10 dakika, 45 °C 1 saat ve 70 °C 15 dakika daha sonra da 4°C sürekli olarak kalacak şekilde programlanarak cDNA sentezi tamamlanmıştır
- Elde edilen cDNA direk polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılmıştır.

3.2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması

Yürütülen TT–PZR çalışmasının PZR aşamasında ise PZR karışımı hazırlanmış ve sentezlenen cDNA’ların kullanılması ile tamamlanmıştır.

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

- Buz üzerindeki, steril mikrosantrifüj tüplerinde 8.5 µl ddH₂O, 1µl “Forward” primer (10 µM), 1 µl “Reverse” primer (10 µM) ve 12.5 µl GoTaq karışımı maddelerini içeren “PZR Master Mix” hazırlanmıştır.
- PZR tüplerine her örnek için, 23 µl “PCR Master Mix” ile TT aşamasından elde edilen cDNA örneğinden 2 µl eklenmiştir.

- PZR tüplerinde 25 µl miktarında hazırlanan son hacim, thermal cycler aletine yerleştirilmiştir.
- Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PZR koşulları ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır. Bu çalışmada modifiye edilen PZR koşulları Çizelge 3.7’de verilmiştir.
- Elde edilen tüm PZR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar –20 °C’da muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmaya göre modifiye edilen PZR koşulları

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

3.2.6. Nested PZR Çalışmaları

TT-PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri ve CPsV CP geninin 350 bp’ lik kısmına spesifik primerler kullanılarak nested PZR çalışmaları tamamlanmıştır. Nested PZR aşaması, her bir örnek için aşağıdaki yönteme göre adım adım olacak şekilde yürütülmüştür.

- Buz üzerindeki, steril mikrosantrifüj tüplerinde 1X PZR tampon solüsyonu, (50mM KCl, 10mM Tris HCl 25 °C pH9.0, 1%Triton X- 100), 25mM MgCl₂, 1µl cDNA, 0.5 mM dNTP, 20 pmol BC78 ve BC79 primerleri ve 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas, CA) enzimi içeren ve su ile 25µl’ ye tamamlanan PZR karışımı hazırlanmıştır.
- Bir önceki aşamada elde edilen PZR karışımına 1 µl CPsV CP PZR ürünü eklenmiştir

- PZR tüplerinde 25 µl miktarında hazırlanan son hacim, thermal cyclers aletine yerleştirilmiştir
- Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PZR koşulları ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır. Bu çalışmada modifiye edilen nested-PZR koşulları Çizelge 3.7’de verilmiştir.
- Elde edilen tüm PZR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar –20 °C’de muhafaza edilmiştir

Çizelge 3.7. Çalışmaya göre modifiye edilen Nested-PZR koşulları

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

3.2.7. Elektroforez Çalışmaları Ve Örneklerin Görüntülenmesi

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

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

- 100 ml 1X TAE tamponu çözeltisi ve 2 gram agar maddesi kullanılarak hazırlanan karışım, mikrodalga fırında 2 – 3 dakika süre ile agar maddesi iyi bir şekilde eriyinceye kadar ısıtılmıştır.
- Jel tepsisi düz bir zemin üzerinde ayarlanıp, yüklenecek örnek sayısına uygun tarak yerleştirilmiştir. Hazırlanan agar karışımı biraz soğuduktan

sonra jel tepsisine kabarcık oluşmayacak şekilde dökülerek, agar jelin donması için oda sıcaklığında bir müddet bekletilmiştir.

- Katılaşıp jel, jel tepsisi ile birlikte tankın içine yerleştirilerek, 1X TAE tamponu çözeltisi ile tankın içerisine jeli kapatacak şekilde dökülmüş ve tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır.
- Jel çukurlarının başlangıç çukuruna 8 ml 100 bp'lik DNA markör, diğer çukurlara ise 10 ml hacminde olmak üzere örnekler, pozitif kontrol ve negatif kontrol (steril distile su) yüklenmiştir.
- Elektroforez aparatı elektrik akımını sağlayan güç kaynağına bağlanarak, örnekler 80 – 100 volt ayarında 45 – 60 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- Elektroforez işlemi tamamlanan agar jel tepsiden ayrılarak biraz soğuması sağlandıktan sonra, saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür çözeltisi içerisinde yaklaşık 10 dakika süre ile bekletilmiştir.
- Bekleme aşaması tamamlanan agar jel, UV transilluminator aleti aracılığı ile görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.8. Sekans Analizi Ve Verilerin Karşılaştırılması

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

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

Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri ‘‘Mega 7’’ (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak ‘‘Neighbour Joining’’ metodu ile sınıflandırılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. CPsV Hastalığının Survey Çalışmaları İle Yaygınlığının Belirlenmesi**

Doğu Akdeniz Bölgesi Adana, Mersin, Hatay illerindeki 10 yaşından ve 10 dekardan büyük olan portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde bitkilerin aktif sürgün döneminde olduğu ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde yapılan surveylerde CPsV hastalığının karakteristik özellikleri olan genç yaprak semptomlarını (Şekil 4.1) gösteren ağaçlar yapılan gözlemler sonucunda hastalıkla bulaşık olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1. Yapılan survey çalışmalarında Adana ilinde CPsV'nin genç yaprak semptomu gözlemlenen portakal ağacı



şekil 4.2. Yapılan survey çalışmalarında Mersin ilinde CPsV'nin şiddetli kabuk kavlama simptomunu gösteren mandarin aēacı



şekil 4.3. Yapılan survey çalışmalarında Hatay ilinde CPsV'nin meşe yaprağı görüntüsü gözlemlenen portakal ağacı

Fawcett 1933 yılında CPsV'nin kabuk kavlama simptomlarının yanında genç yaprak simptomlarını da tanımlamıştır. Yapılan bu çalışmada da incelenen ağaçların CPsV ile bulaşık olduğunun belirlenmesinde hastalığın karakteristik simptomları olan genç yaprak simptomları ve kabuk kavlama simptomları baz alınarak değerlendirmeler yapılmıştır.

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Adana, Mersin, Hatay illerinde toplamda 11150 tane ağaç incelenmiş ve bunların 4110 tanesi portakal, 5800 tanesi mandarin ve 1260 tanesi altıntop ağaçlarından oluşmaktadır. İncelenen ağaçların illere göre dağılımı çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Survey çalışmalarında incelenen ağaçların illere göre dağılımı

İL	PORTAKAL	MANDARİN	ALTINTOP	TOPLAM
ADANA	2000	1000	750	3750
MERSİN	1500	2300	300	4100
HATAY	600	2500	200	3300
TOPLAM	4100	5800	1250	11150

Çizelge 4.2. Survey çalışmalarında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenen ağaç sayılarının illere göre dağılımı

İL	PORTAKAL	MANDARİN	ALTINTOP	TOPLAM
ADANA	600	250	75	925
MERSİN	750	690	60	1500
HATAY	210	1000	28	1238
TOPLAM	1560	1940	163	3663

Çizelge 4.3. Survey çalışmaları sonucu CPsV ile bulaşık olduğu belirlenen ağaçların % dağılımları

İL	PORTAKAL %	MANDARİN %	ALTINTOP %	TOPLAM İNFEKSİYON %
ADANA	%30	%25	%10	%25
MERSİN	%50	%30	%20	%36.5
HATAY	%35	%40	%14	%37.5
TOPLAM İNFEKSİYON %	%38.3	%31.3	%13.04	%33

Survey yapılan bahçelerden Adana ilinde incelenen 3750 ağacın % 25'nin, Mersin ilinde incelenen 4100 ağacın %36.5'nin, Hatay ilinde incelenen 3300 ağacın %37.5'nin CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Kaliforniya'da 6000 ağaçta yapılan bir survey sonucunda ağaçların %14'nün CPsV ile bulaşık olduğu hastalığın üründe meydana getirdiği azalma sonucu % 6.5 oranında bir gelir kaybı oluşturduğu tespit edilmiştir (Knorr ve Childs, 1968). Ege Bölgesinde yapılan bir çalışmada ise turunçgil ağaçlarının %50 oranında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Azeri ve Heper 1973).

Doğu Karadeniz Bölgesinde Ordu ve Rize illeri arasında yapılan bir surveyde turunçgil ağaçlarının %1-2 oranında CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Cengiz ve ark., 1968).

Yapılmış olan bu çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesinde Adana, Mersin, Hatay illerinde incelenen 4100 tane portakal ağacının %38.3'nün, 5800 mandarin ağacının %31.3'nün, 1250 tane altıntop ağacının %13.04'nün CPsV hastalığı ile bulaşık olduğu hastalığın en çok portakal çeşidinde görüldüğü bunu sırasıyla mandarin ve altıntop çeşitlerinin izlediği belirlenmiştir. Güllü (1989) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir surveyde ise Navel portakallarda %64-80,

Satsuma mandarinlerde %15.8-31 oranında CPsV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacı yapmış olduğu çalışmada bölgede aktif sürgün döneminde genç yaprak simptomlarının oldukça yoğun olduğunu ancak olgun yaprak simptomlarının daha az gözlemlendiğini, özellikle şiddetli kabuk kavlaması gözlenen ağaçlarda görüldüğünü bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aktif sürgün döneminde genç yaprak simptomları oldukça yoğun olmakla birlikte bu simtomlar yapraklar olgunlaştığında kaybolmaktadır. Kavlama hastalığı ile bulaşık bahçelerde damar bantlaşması ve meşe yaprağı deseni simptomları oldukça yoğun olarak bulunmakta aynı hastalığın simptomlarından olan beneklenmeler ve klorotik lekeler daha az görülmektedir. Ayrıca psorosis hastalığının kabuk kavlama simptomsu yaşlı bahçelerde görülmekle birlikte bu simptomlar genç yaprak simptomslarına oranla daha azdır.

4.2. CPsV Hastalığının Biyolojik İndeksleme Yöntemi İle Tanılanması

Doğu Akdeniz Bölgesi eski turunçgil bahçelerinden CPsV hastalığının karakteristik simptomslarından genç yaprak simptomsları, yaşlı yaprak simptomsları, kabuk kavlama simptomsları, odun dokusu deformasyonları, concave gum simptomsları göre toplanan turunçgil çeşitlerine ait örnekler her bir örnek için üç adet olucak şekilde tohumdan yetiştirilmiş 8 aylık sağlıklı Pineapple portakal fidanlarına (Şekil 4.4) göz ve kabuk aşılması olarak inokule edilmiş ve bitkiler haftalık olarak yaprak simptomsları ve şok reaksiyonları açısından gözlenmeye çalışılmıştır. Tohumdan yetiştirilen Pineapple portakal fidanlarından üçer adet saksı negatif kontrol, üçer adet saksı ise pozitif kontrol olarak bırakılmıştır.



şekil 4.4. Tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Pineapple portakal fidanlarına yapılan gůz ve kabuk aşılaması

Pineapple portakalına doku inokulasyonu yöntemi ile aktarılan CPsV hastalığının yaklaşık iki ay gibi bir süre sonunda portakal fidanlarının uç sürgünlerinde hastalığın karakteristik özelliği olan şok reaksiyonları gözlenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca genç yapraklarda damarlar üzerinde açık renkli damar bantlaşması (Şekil 4.6) ve meşe yaprağı görüntüsü (Şekil 4.7) gözlemlenmiştir. Yaşlı yapraklarda ise yaprağın üst kısmında düzensiz klorotik lekeler (Şekil 4.8) ve arka kısmında kahverengi kalıcı zamklı lekelerin varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Genç yapraklar üzerinde gelişen simptomların büyük bölümü yapraklar olgunlaştığında kaybolmuşlardır. Negatif kontrol olarak bırakılan sağlıklı pineapple fidanlarında CPsV'nin genç yaprak simptomlarına rastlanmamıştır.



Şekil 4.5. İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanında oluşan şok simptomsu



şekil 4.6. İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanlarının genç yapraklarında oluşan açık renkli damar bantlaşması



şekil 4.7. İnokulasyon sonucu Pineapple portakal fidanlarında oluşan meşe yaprağı görüntüsü



řekil 4.8. İnokulasyon sonucu pineapple portakal fidanlarının yařlı yapraklarının űst kısmında oluřan dűzensiz klorotik lekeler



şekil 4.9. İnokulasyon sonucu pineapple portakal fidanlarının yaşlı yapraklarının alt kısmında oluşan kahverengi zamlkly kabarcıklar

Çizelge 4.4. Farklı turunçgil çeşitlerinden alınan inokulum kaynakları ile yapılan doku inokulasyonu çalışmalarında Pineapple portakal bitkilerinde gözlemlenen simptomlar

İzolatlar	İndikatör bitki	Simptomlar				
		GDB	MYG	YKL	YZL	ŞR
CPsV- 1	Pineapple portakal	+	+	-	-	+
CPsV- 46	Pineapple portakal	+	+	+	+	+
CPsV- 3	Pineapple portakal	+	-	-	-	+
CPsV-50	Pineapple portakal	+	+	+	+	+
CPsV- 9	Pineapple portakal	+	+	-	-	+
CPsV- 42	Pineapple portakal	+	-	-	-	+
CPsV- 6	Pineapple portakal	+	+	-	-	+
CPsV- 47	Pineapple portakal	+	+	-	-	+
CPsV- 7	Pineapple portakal	+	+	+	+	+
CPsV- 48	Pineapple portakal	+	-	+	+	+
- kontrol	Pineapple portakal	-	-	-	-	-
+ kontrol	Pineapple portakal	+	+	+	+	+

GDB: Genç yapraklarda damar bantlaşması, MYG: Meşe yaprağı görüntüsü, YKL: Yaşlı yapraklarda klorotik lekeler; YZL: Yaşlı yapraklarda zamklı lekeler, ŞR: Şok reaksiyonları, +: Simptom var; -: Simptom yok

Çizelge 4.4’de belirtildiği gibi Mersin ili Satsuma mandarin, W. Navel portakal ve altıntop, Adana ili Satsuma mandarin, W. Navel portakal ve Yafa portakal, Hatay ili W. Navel portakala ait örneklerin Pineapple portakal indikatör bitkilerinde CPsV hastalığının karakteristik yaprak simptomlarından olan şok reaksiyonları, genç yapraklarda damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü, yaşlı yapraklarda klorotik lekeler ve yaşlı yapraklarda zamklı lekeler gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bütün yaprak simptomları turunçgil yetiştirilen alanlarda Kavlama hastalığı ile bulaşık olan ağaçlardaki simptomlarla benzerdir. Negatif kontrol olarak bırakılan sağlıklı Pineapple portakal fidanlarında genç yaprak simptomlarının gelişimi gözlemlenmemiştir. Pozitif kontrolde ise hastalığın

karakteristik yaprak semptomları olan genç yapraklarda damar bantlaşması, meşe yaprağı deseni, yaşlı yapraklarda ise klorotik lekeler ve zamklı lekeler gözlemlenmiştir.

CPsV hastalığı farklı izolatlardan alınan örneklerle tohumdan yetiştirilen Pineapple portakal fidanları üzerinde inokulasyonlar gerçekleştirildikten 8 haftalık süre sonunda oluşan ilk yapraklarda şok semptomları gözlemlenmiştir (Şekil.4.10). Roistacher (1991) tarafından CPsV'nin varlığını biyolojik indeksleme yöntemiyle belirlemek amacıyla Pineapple ve Madam Vinous portakal fidanlarını indikatör bitki olarak kullanarak yaptıkları bir çalışmada gözlemlenen şok semptomları bu çalışmada olduğu gibi benzer şekilde yeni gelişen sürgünün geriye doğru kuruması şeklinde geliştiğini ayrıca Pineapple ve Madam Vinous portakallarının CPsV'yi belirlemede iyi birer indikatör bitki olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.10. Pineapple portakal fidanları üzerinde inokulasyonlar gerçekleştirildikten 8 hafta sonra oluşan ilk sürgünlerde şok semptomları

CPsV'nin biyolojik yöntemlerle tanınması için indikatör bitki olarak tohumdan yetiştirilmiş Pineapple portakal fideleri kullanılmıştır. CPsV'nin indikatör bitkilerde geliştirdiği tüm yaprak simptomları 8 hafta içerisinde gözlemlenmiştir. Wallace ve Drake (1968) yaptıkları bir çalışmada CPsV'nin biyolojik olarak tespitinde ilk kez turuncgil fidanlarının kullanımı gerçekleştirmiştir. İndikatör bitki olarak kullanılan portakal fidanlarında 6 haftalık süre sonunda CPsV'nin genç yaprak simptomlarının gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Önelge (1988) tarafından CPsV biyolojik indeksleme yöntemiyle tanılama çalışmasında şiddetli kavlama sonucu gelişen ağaçlarda yapılan indeksleme sonucunda genç yaprak simptomlarının yanı sıra olgun yaprakların ön yüzeyinde gelişen beneklenme ve yaprakların arka yüzeyinde gelişen zamklı lekelenmelerin varlığını bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da benzer şekilde şiddetli kabuk kavlama simptomları gösteren CPsV-50, CPsV-46, CPsV-7 ve CPsV-48 izolatlarından alınan örneklerde genç yaprak simptomlarından sonra olgun yapraklar üzerinde kalıcı beneklenme simptomlarının geliştiği gözlemlenmiştir.

Güllü (1989) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada CPsV'nin Navel portakal çeşidinde %64-80 oranında, Satsuma mandarin çeşidinde %15-31 oranında bulaşık olduğunu belirtmiş ayrıca CPsV'nin Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak bulunduğunu bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılmak üzere Doğu Akdeniz Bölgesinde genç yaprak simptomları, yaşlı yaprak simptomları ve kabuk kavlama simptomları gösteren Satsuma çeşidi mandarin ve Navel çeşidi portakallardan alınan CPsV-7, CPsV-46, CPsV-48, CPsV-50 örnekleri inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Pineapple portakal fidanlarına inokulasyonları gerçekleştirilen örneklerin genç yapraklarında damar bantlaşması ve yaşlı yapraklarının üst kısmında kalıcı klorotik lekeler alt kısmında zamklı lekeler gözlenmiştir.

Kayım (2010) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nde CPsV'nin biyolojik indeksleme yöntemiyle tanınmasını gerçekleştirmek için yapılan bir çalışmada bir

yaşındaki portakal fidanlarına Adana, Mersin, Kozan'da hastalıkla bulaşık olduğu bilinen ağaçlardan alınan örneklerin inokulasyonu sonucunda indikatör bitkilerin genç yaprakları üzerinde damar bantlaşması, beneklenme ve meşe yaprağı görüntüsü belirtilen semptomlarını gözlemlediğini bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da Adana, Mersin, Hatay illerinden CPsV'nin genç yaprak semptomları, kabuk kavrama semptomları, yaşlı yaprak semptomları, concave gum semptomları ve odun dokusu deformasyonları semptomlarını gösteren ağaçlardan alınan örnekler ile yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında genç yapraklarda damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü belirtilen semptomları gözlemlenmiştir.

4.3. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma

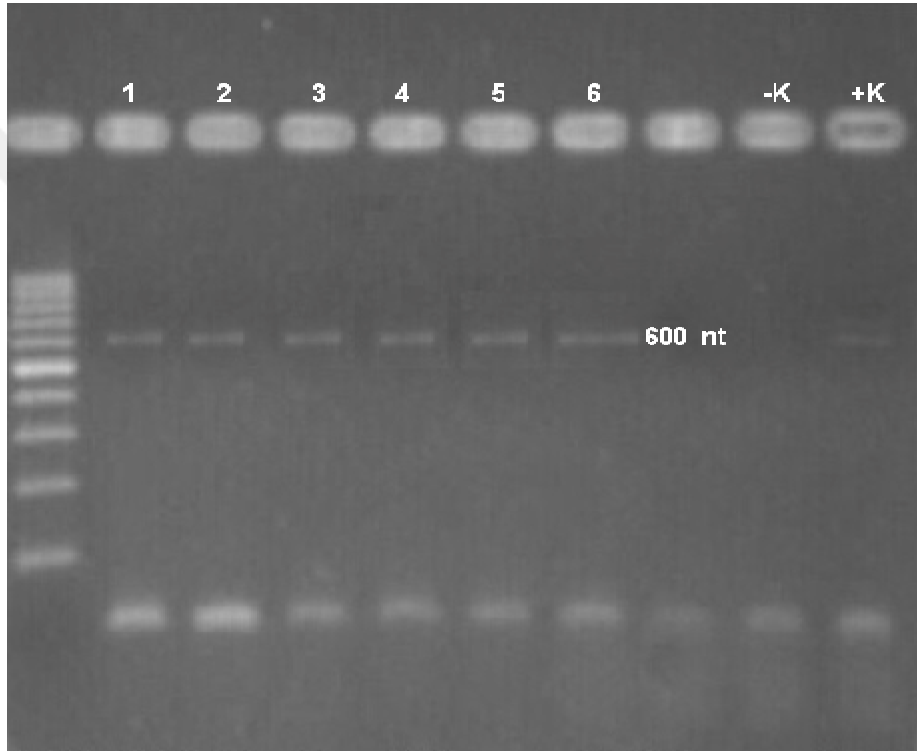
4.3.1. TT-PZR Çalışmaları İle İlgili Bulgular

CPsV hastalığının saptanması ve tanınması için moleküler yöntemlerden biri olan TT-PZR kullanılmıştır. İlk olarak random primer kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildikten sonra ve RNA3 (manto protein) bölgesini çoğaltmak için CPV-1/CPV-2, BC76/BC77, BC78/BC79, RNA1 bölgesini çoğaltmak için Ps44/Ps45 primer çifti, RNA2 bölgesini çoğaltmak için Ps62/Ps63 primer çifti kullanılmıştır. TT-PZR çalışmalarından elde edilen ürünler %1.5'lik agar jelde koşularak, ethidiumbromür ile DNA boyaması yapılmış ve sonuçlar UV ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde 100bp DNA büyüklük markörü kullanılarak amplifikasyon büyüklükleri belirlenmiştir.

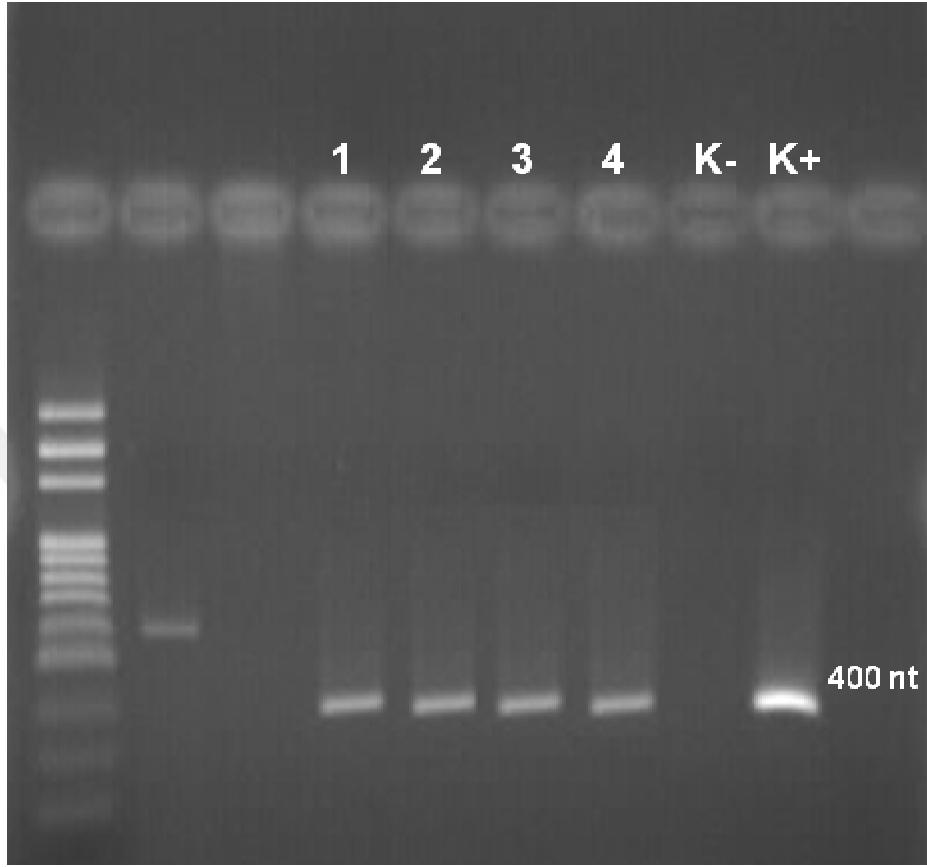
Yapılan TT-PZR çalışmalarının sonucunda CPV-1/CPV-2 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 600 bp'lık (Şekil 4.11), BC78/BC79 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 400 bp'lık (Şekil 4.12) bant oluşumu gözlemlenmiştir. Ps44/Ps45 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 276 bp'lık (Şekil 4.13) bant oluşumu gözlemlenirken, Ps62/Ps63 primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan örneklerde 514 bp büyüklüğünde bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Araziden alınan örneklerde

yukarıda verilen baz uzunluğunda bant oluşumları hastalık etmenini taşıdığı varsayılarak pozitif olarak değerlendirilmiştir.

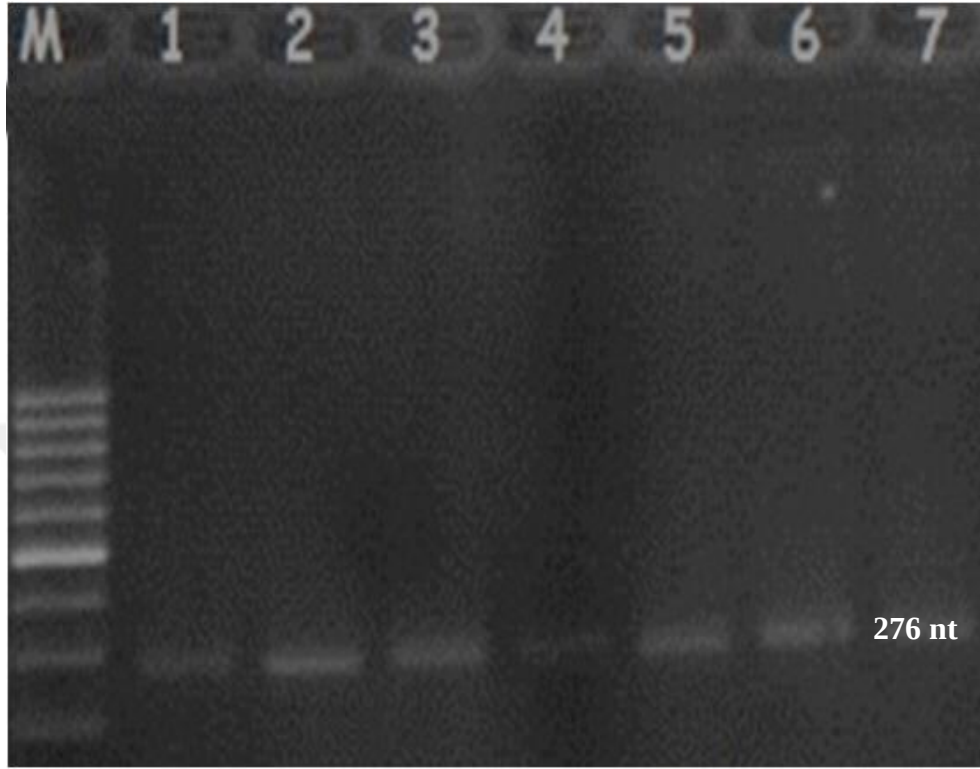
CPsV hastalığının farklı turuncgil izolatları kullanılarak yapılan TT-PZR çalışmalarından elde edilen bazı jel görüntüleri Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14’de yer almaktadır.



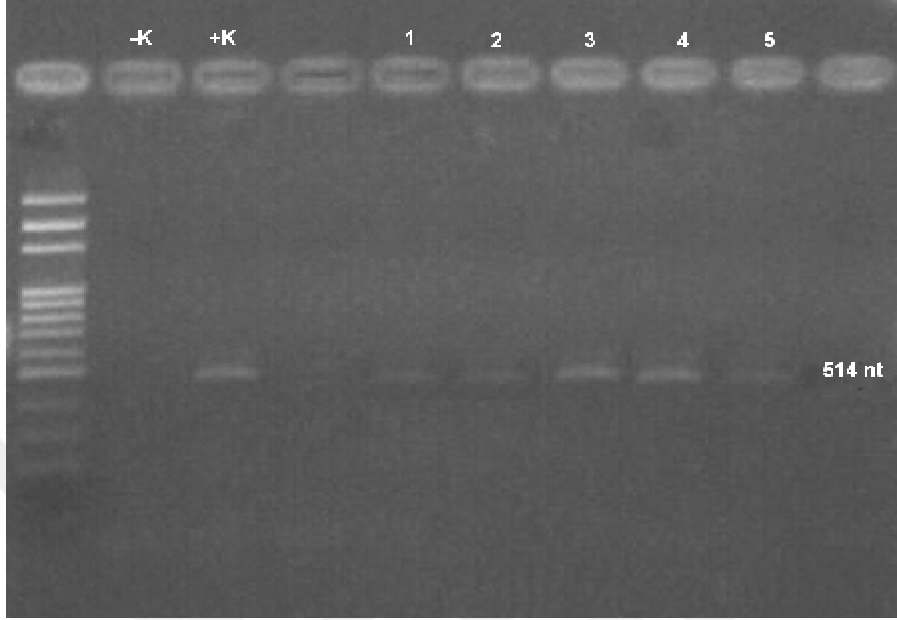
Şekil 4.11. CPsV-1/ CPsV-2 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen jel görüntüsü. M markör, CPsA ile enfekteli portakal örnekleri 1-2:Adana, 3-4:Mersin, 5-6:Hatay, -K: negatif kontrol,+K:pozitif kontrol. 600 nt uzunluğunda CPsV'nün oluşturduğu band.



Şekil 4.12. BC78/ BC79 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.400nt uzunluğunda CPsVnün manto proteine ait bantlar. M markör,1: Adana, 2-3: Mersin, 4: Hatay, -K: negatif kontrol,+K: pozitif kontrol



şekil 4.13. Ps44/Ps45 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen örneklerin %1.5'luk agar jeldeki görüntüsü. CPsV'nün 276 nt uzunluğundaki RNA1 bölgesi. 1-2: Adana, 3-4: Mersin, 5-6-7: Hatay illerinden alınan portakal örnekleri.



Şekil 4.14. Ps62/Ps63 primer çifti ile yapılan TT-PZR sonucunda elde edilen 514 nt uzunluğundaki bantların %1.5'luk agar jel görüntüsü. CPsV ait portakal ağaçlarından elde edilen RNA2 gen bölgesi. M markör, 1-2: Adana, 3-4: Mersin, 5: Hatay, -K: negatif kontrol, +K: pozitif kontrol.

Doğu Akdeniz Bölgesi eski turuncgil bahçelerinden CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen ağaçlardan alınan örneklerle farklı primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen TT-PZR çalışmalarında, toplanan 50 örneğin 35'nin CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Kullanılan primer çiftlerinden CPV-1/CPV-2 ve BC78/BC79 etmenin rutin tanılmasında her zaman başarılı sonuç verirken diğer primer çiftleri her zaman aynı başarıyı göstermemiştir.

Mersin ilinden alınan 19 örneğin 14 tanesinin hastalıkla bulaşık olduğu belirlenmiştir. Adana ilinden alınan 17 örneğin 12 tanesi ve Hatay illerinden alınan 14 örneğin 9 tanesi TT-PZR çalışmalarında pozitif sonuç oluşturmıştır. TT-PZR sonucunda en iyi sonuç veren örnekler şiddetli kabuk kavlaması ve genç yaprak semptomu oluşturan örnekler olmuştur. Bu sonuç her bölge için geçerlidir. Sadece genç yaprak semptomlu örneklerden alınarak yapılan TT-PZR sonuçları kabuk kavlaması semptomu gösteren ağaçlardan alınan örneklerle yapılan TT-PZR

çalışmaları kadar iyi sonuç vermemiştir. CPsV konsantrasyonun kabuk kavlaması oluşturmeyen ağaçlarda kabuk kavlaması semptomu gösteren ağaçlardan daha az yoğunlukta olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Martin ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen turuncgil ağaçlarından alınan örneklerle ELİSA, TT-PZR, moleküler hibridizasyon ve çapraz koruma testleri uygulamışlardır. Bu çalışmaların sonucunda kabuk kavlaması ve genç yaprak semptomu bulunan 41 örneğin CPsV ile bulaşık olduğunu ve sadece genç yaprak semptomlarının bulunduğu 6 örneğin ise CPsV ile bulaşık olmadığını belirlemişlerdir.

D'Onghia ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada CPsV'nin belirlenmesindeki en etkili dönemin çiçekleme döneminde alınan çiçek örneklerinden yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca yaprak örnekleri kullanılarak yapılan ELİSA, DTBIA ve TT-PZR çalışmalarında CPsV'nin belirlene oranının düştüğünü belirtmiştir.

Barthe ve ark. (1998) tarafından CPsV'nin manto protein geni dizisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, biyolojik karakterizasyonu yapılmış CPV-4 ve CPV-6 izolatları TT-PZR analizinde, CPV1 ve CPV2 primer çifti kılıf protein geninin 654 ve 1253 nükleotidleri arasındaki 600 bp'lık alanı çoğaltmak için tasarlanmıştır. Yaptıkları TT-PZR çalışmalarında 600 bp seviyesinde manto protein bantlarını elde etmişlerdir. Elde edilen PZR ürünleri poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırılamamış ve bunlar arasında çok ufak farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak, CPV6 izolatı turuncgillerde kabuk kavlamasına yol açarken, CPV4 izolatı yaprak belirtileri göstermesine rağmen, gövde ve dallarda kabuk kavlamasına neden olmadığı gözlenmiştir. TT-PZR için tasarlanan primer çifti (CPV1 ve CPV2) çeşitli CPsV izolatlarının kılıf proteinlerine ait tüm açık okuma çerçevesinin (ORF) çoğaltımında kullanılmıştır. Sonuç olarak çeşitli izolatların kılıf protein dizileri belirlenebilmiş ve ifade edilen bu kılıf proteinleri antijen olarak kullanılabilmiştir. CPV4 izolatının kılıf proteinin ifadesi için üretilen poliklonal antiserumunun ilk değerlendirmesi sonucunda, bu antiserumun değişik

CPsV izolatlarının teşhisinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bu çalışmada Barthe ve ark. tarafından manto protein gen dizisini belirlemek için tasarlanan primer çifti (CPsV-1/ CPsV-2) kullanılarak yürütülen TT-PZR sonucunda 600 bp lık manto protein geni çoğaltılmış araştırmacılarla benzer sonuçlar elde edilerek pozitif örneklerde 600 bp seviyesinde bantlar elde edilmiştir.

Martin ve ark. (2005) tarafından İspanya P-121 izolatının tüm genomunun dizilimi belirlemek için yapmış oldukları çalışmada RNA1 bölgesini belirlemek için Ps44/Ps45 primer çifti ve RNA2 bölgesini belirlemek için Ps62/Ps63 primer çiftini kullanmışlardır.

Doğu Akdeniz bölgesinde yürütmüş olduğumuz bu çalışmada da Ps44/Ps45 ve Ps62/Ps63 primer çiftleri kullanılmış Ps44/Ps45 ile yapılan TT-PZR çalışmalarında testlenen 50 örnekten 10'inde 300 bp lık bantlar elde edilirken, Ps62/Ps63 primer çiftiyle testlenen 50 örnekten 35'inde 500 bp 'lık bant oluşumu gözlenmiştir.

Kayım (2010) tarafından Adana, Mersin ve Kozanda yapılan bir çalışmada CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen farklı turuncgil çeşitlerinden alınan örnekler kılıf protein geninin 766 ve 1200 nükleotidleri arasındaki kısmını belirlemek için Cons1/Cons2 primer çiftini kullanılarak TT-PZR yöntemi ile testlenmiş ve 434 bp lık bantlar elde edilmiştir. Cons1/Cons2 primer çiftinin CPsV'nin kılıf protein genini tanılamada iyi olduğu belirtilmiş, diğer primer çiftleri ile ilgili herhangi bir çalışma yürütülmemiştir. Nükleotid dizilimi hakkında herhangi bir bilgi verilmemiştir.

Bu çalışmada da kılıf protein genini belirlemek için CPsV-1/CPsV-2, BC78/BC79 primer çiftleri kullanılmıştır. CPsV manto protein geninin 759 ve 1139 nükleotidleri arasındaki bölgeyi tanılamak için BC76/BC77, BC78/BC79 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen TT-PZR sonucunda 400 bp'lık bant oluşumu gözlemlenirken, 654 ve 1253 nükleotidleri arasındaki bölgeyi tanılamak için CPV-1/CPV-2 primer çifti kullanılarak yapılan TT-PZR çalışmasında 600 bp lık bantlar elde edilmiştir.

CPsV hastalığının saptanması ve tanınması için moleküler yöntemlerden PZR yönteminin farklı bir versiyonu olan Nested-PZR kullanılmıştır. İlk olarak random primer kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildikten sonra RNA3 (manto protein) bölgesini çoğaltmak için BC76/BC77 ve BC78/BC79 primer çiftleri kullanılmıştır. Bir önceki çalışmada elde edilen ürünler nested-PZR çalışmalarında kullanılmıştır. Daha sonra manto protein geninin 759 ve 1139 nükleotidleri arasındaki bölgesini tanılamak için Nested-PZR yöntemiyle çoğaltmak için BC78/BC79 primer çifti kullanılmıştır. Nested-PZR çalışmalarından elde edilen ürünler %1.5'lik agar jelde koşularak, ethidiumbromür ile DNA boyaması yapılmış ve sonuçlar UV ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde 100bp DNA büyüklük markörü kullanılarak amplifikasyon büyüklükleri belirlenmiştir. Yapılan Nested-PZR çalışmalarının sonucunda BC78/BC79 primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 400 bp'lık bant oluşumu gözlemlenmiştir.

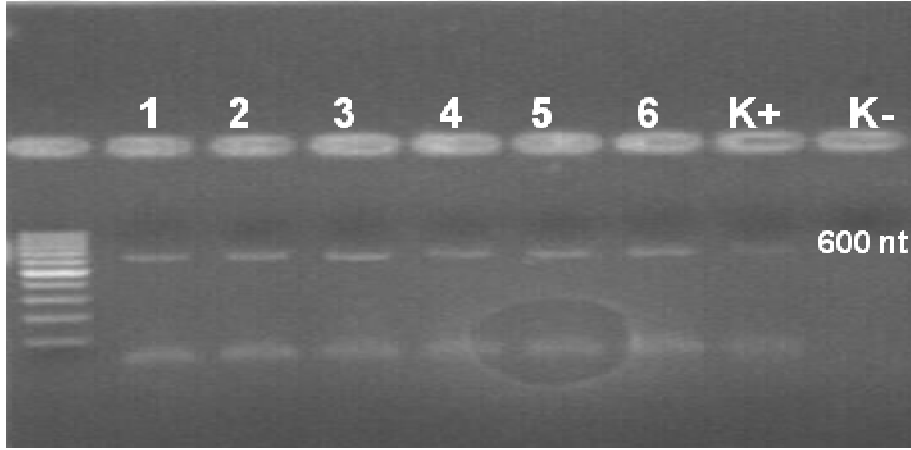
Kütük (2011) tarafından Antalya ilinin farklı turunçgil üretim bölgelerinden alınan turunçgil örnekleri ile yapmış olduğu bir çalışmada manto protein geni belirlemek için BC76/BC77 primer çiftlerini kullanmıştır. Daha sonra elde ettiği ürünler ile BC78/BC79 primer çiftlerini kullanarak Nested-PZR ile genin 759 ve 1139 nükleotidleri arasındaki bölgeyi tanılamak için çoğaltmıştır. Yapılan analizler sonucunda 51 örneğin 45 tanesinde 350 bp'lık bant elde etmiştir. CPsV'nin belirlenmesinde örnekleme zamanına bakılmaksızın hastalığın etkin bir şekilde tanılandığını bildirmiştir. Ayrıca Nested-PZR yöntemini kullanarak CPsV'nin virüs yoğunluğunun az olduğu dönemlerde alınan yaprak dokularında da etkin bir şekilde çalışacağını belirtmiştir.

Manto protein geninin belirli bölgelerinin tanınmaya ve karakterize edilmeye çalışıldığı TT-PZR çalışmaları sonucunda bölgemizde CPsV'nin yaygın olarak bulunduğu, kabuk kavlama semptomlarının PsA ve PsB sendromlarıyla ilgili olduğu ancak PsB sendromunun bölgemizde yaygın olarak bulunmadığı PsA sendromunun bölgemizde daha yoğun bulunduğu belirlenmiştir. Direk sekanslama

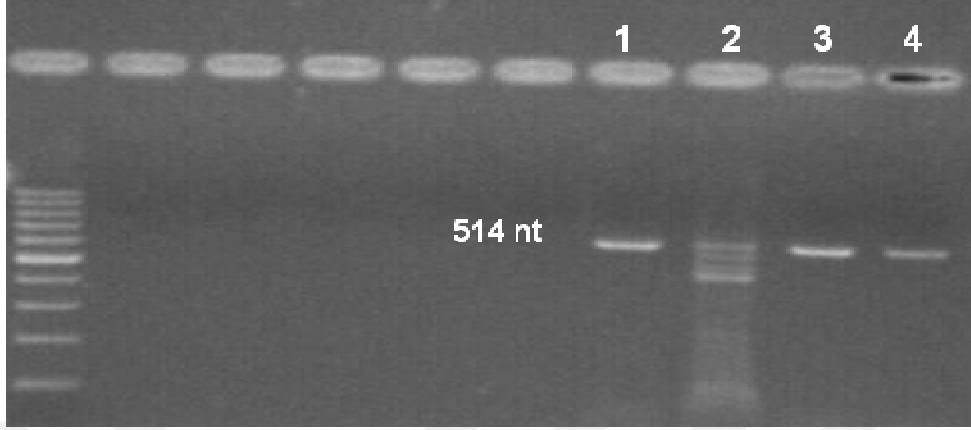
yöntemi ile virüsün RNA3 ve RNA2 bölgelerinin nükleotid dizilimleri kısmi olarak elde edilmiştir.

4.3.2. Nükleotid Dizilimi Ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular

PZR işlemi sonucunda pozitif olarak belirlenen örneklerden RNA2 bölgesinden 2 ve RNA3 bölgesinden 3 adet örnek aynı koşullarda PZR işlemi uygulanarak, 200 µl hacminde çoğaltılarak, saflaştırılmış (Şekil 4.15, 4.16) ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana İlinde bulunan Molgentek firmasına gönderilmiştir.



Şekil 4.15. PZR işlemi sonucunda pozitif olarak belirlenen örneklerden DNA çoğaltması (Mersin izolatı)



Şekil 4.16. Purifiye edilip nükleotid dizilim analizine gönderilen örnekler (RNA2 gen bölgesi) PS 62/63 primeri kullanılarak çoğaltılmış portakal örnekleri.1: Adana, 2-3: Mersin, 4: Hatay ilinden alınan örnekler.

Jel görüntüleme işlemi sonucunda, CPsV pozitif olduğu tespit edilen ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla, Adana İlinde bulunan Molgentek firmasına gönderilen örneklerin, sekans analizleri gerçekleştirilmiş ve Forward primerlerine göre baz dizilimleri belirlenmiştir. Baz dizilimleri, FinchTv programı kullanılarak görüntülenmiştir.

RNA3 Bölgesine ait bazı baz dizilimleri şu şekildedir:

Adana RNA3

```
>GGACGTCTCTAGATGATTAGACACTTACGAGTGCTGTCTGCTCT
ATATGCAAACCTGAACTTGCTGGGAATCCGTCTGTGAGATATGCTG
GGTTTGCAAGTAGTTTTCAAACCAAGCAAAAGTTGTCCCCTGCTG
CTGATGCAACTCATGAGTCCCTGATGCCATTGCTGGAAACCAATC
AGAAGATTGAAAAATCAATTGCGATAAGAGATTTTCTGAAAACA
ATGGAGGGACAATGGAAAAATCAGAAAAGGCTTCATCCTTTATC
TGATGAAAAACCAACAATAAAAACTTCACTCTGAAGCTGACAT
GTGCTATAATTTACAGCCTCACTCCGATGGCAGAAAAATACTACG
```

GAAAGTCGTGTGCCTCATTCCACATGGTAGAAAAACAACTTT
CTTTGAGGTGACAACTATAATTAACGTTGGAAGGACTTGAC
TCTTCACCAACCGTGGCATTTCGAGATCGGATCAACCACCCCTCTC
TTACACTTCTCTCTAAAATTAACATTGGATTTAATTTACGGAGGC
ATTTCTCATTGTTTATATACCTTACGCTTTCGGGGCTTGTTGAGGT
CCTACCCCGTTTATTTGACTTGCTTATT

Mersin RNA3

>GCTACATACGTCTCGTGTTAGAGTGCGTTATGTCCGGTATAGTA
CCTCTTAGAAAACATCATTTTGAGTGTTCTCTCGGATGAATTGGA
ATACTACGGGGGGTAAACCAAAGTGGAGATTTGCCAAAGGTAAA
TGATTCTAACGAGGAACCTAGATTGATATGCTGAAAATGAAGCG
CACAGGTGAAAAATGAATTGTGCTAATCACTTTGTTCTGTGGTG
CCTGCATCATGGGACGATCAAAGAAGGAATAAATGATATCAAGT
GTGCAAGGATAGAGAAAGACTCTTATACGCTCAACCCACATGT
GCTATAATTTACAGCCTCACTCATAATGGCAAAAAACACACTTTT
GGATGAACGGCCCATTGTATGGTTACTTAAATTTGATCTACACAC
TCTTTGTGAGGAAAACCCGAAACTGCAAATCCCTAAATCGCGGG
AATGGCAAGAGCCCCGCCAGGTCCCTCGGAGGCAACGGTATATC
GTAAAGAGGTTTCCGGGGCGGGGGGGTGGTAAATTGTAAGTAGG
TTGTGGGATTTGTTTGTCAGTGCTCCGATTCGGGCCAGGGGGTGC
GTTAACCTTTGGCTCGGGTTAGAGGGGTCCGAGA

Hatay RNA3

>GGACGTCTCTAGATGATTAGACACTTACGAGTGCTGTCTGCTCT
ATATGCAAACCTGAACTTGCTGGGAATCCGTCTGTGAGATATGCTG

GGTTTGCAAGTAGTTTTCAAACCAAGCAAAAGTTGTCCCCTGCTG
CTGATGCAACTCATGAGTCCCTGATGCCATTGCTGGAAACCAATC
AGAAGATTGAAAAATCAATTGCGATAAGAGATTTTCTGAAAACA
ATGGAGGGACAATGGAAAAATCAGAAAAGGCTTCATCCTTTATC
TGATGAAAAACCAACAATAAAAACTTCACTCTGAAGCTGACAT
GTGCTATAATTTACAGCCTCACTCCGATGGCAGAAAAATACTACG
GAAAGTCGTGTGCCTCATTCCACATGGTAGAAAAACAACTTT
CTTTGAGGTGACAACTATAATTAACGTTGGAAGGACTTGGAC
TCTTCACCAACCGTGGCATTGAGATCGG

RNA2 Bölgesine ait baz dizilimleri şu şekildedir:

ADANA RNA2

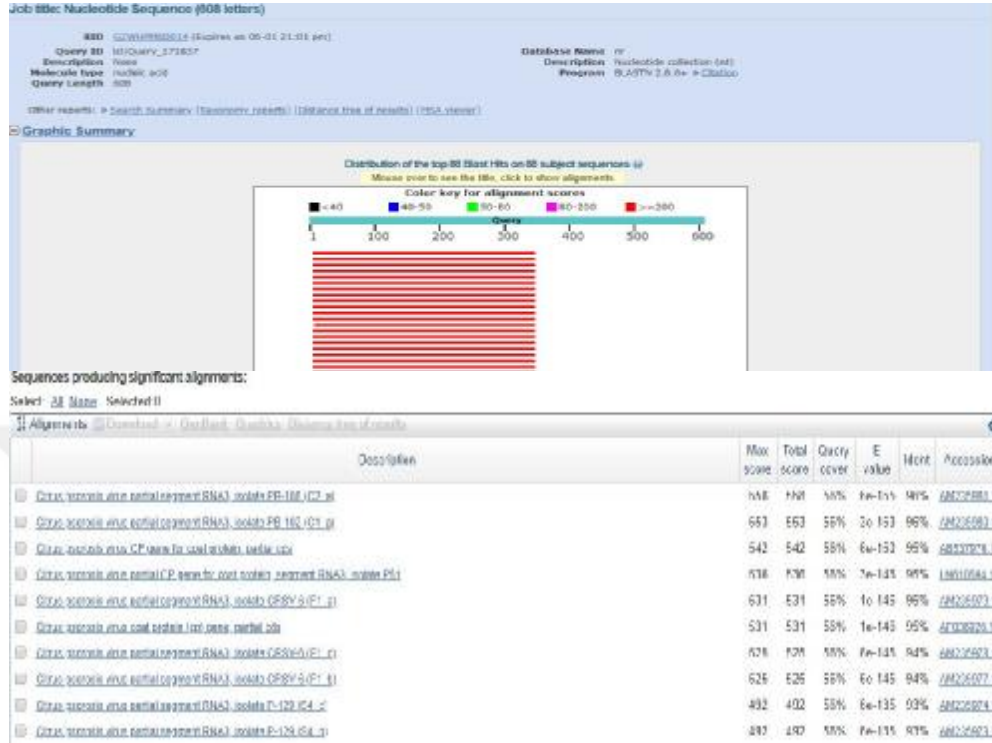
>ATCCTCCAGTCATTAATTCTTTTCTAAGAACATTACTCCTACATC
TATAGAAAGGAATTTTGGAGGAGTAGCCCAACTGGAAGTTGAGC
GGGCCAACTTTTCATTTGAAACATTTGGAAACAAATTCCTTTTGA
AAGATGTTTTCAAGTTCTCTGATCAAAGTCTGGGAGACAACATAT
TTCATATACTTTGTTGAAAGAAGAGGGTCATATTGACGGAATTAG
GACAGCTGGAGATGATTTGTTGGAGAAGGATGGTGAAGTGGTGA
TGATATTAGATAGTAGGGATGAGGGTAGGATGTGGATAAAGGAT
GAGTCTGGGCTGAGGTGACTGAGCATGGCTCAAAAAGTGCAAGA
GAGTATTGCATGAAGGTTGAAAAGAATGAAATTAAAGTGGAGTA
GTTGTGTGTGATTAAGATGGCTCTTATATATGATAATTAGAGTGC
GATAATCATATTTTCGCTTTAAATAAACAATTCTTTTGACGATCCG
AAAGTCTGTCATACT TTGA

MERSİN RNA2

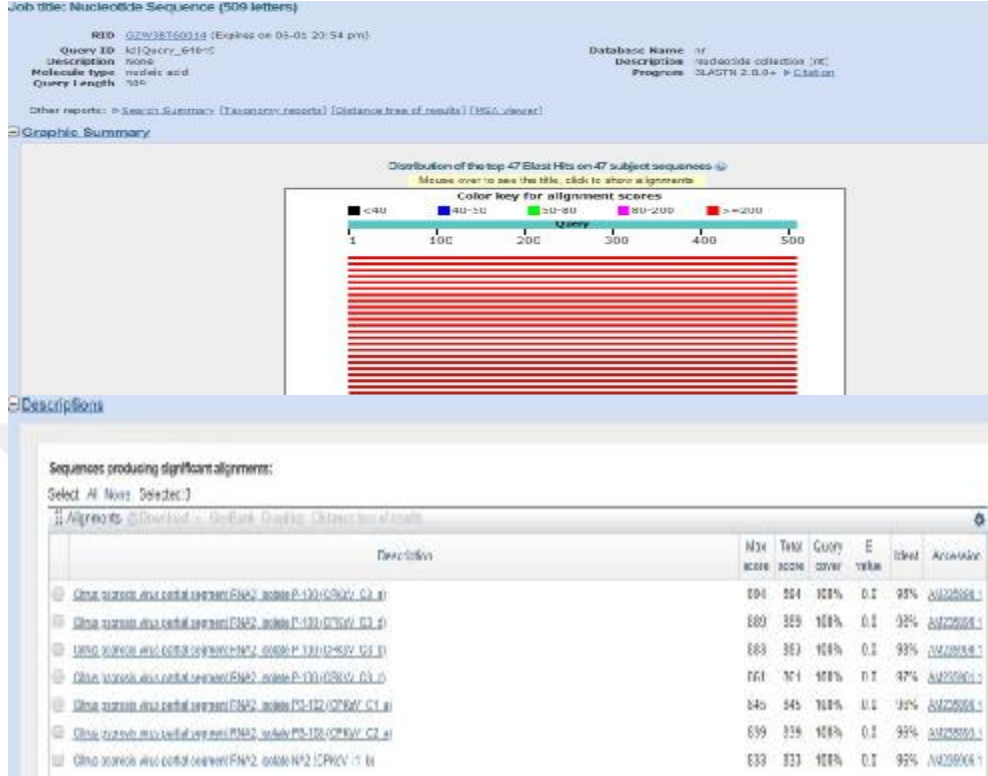
TCCGCCAGTCATTATTTCTTTTCTAAGAACATTACTCCTACATCTA
TAGAAAGGAATTTTGGAGGAGTAGCCCAACTGGAAGTTGAGCGG
GCCAAACTTTTCATTTGAAACATTTGGAAACAAATTCCTTTTGAAA
GATGTTTTTCATGTTCTCTGATCAAAGTCTGGGAGACAACATATTG
TCATATACTTTGCTGAAAGAAGAGGGTCATATTGATGGAATGAT
GGACACTGGAGATGATGTGTTGTTGGAGAAGGATGGTGAAGTGG
TGATGATATTAGATAGTAGGGATGAGGGTAGGATGTGGATAAAG
GATGATGTCTGGGCTGAGGTGACTGAGCATGGCTCAAAAAGTGC
AAAAGAGTATTGCATGAAGGTTGAAAAGAATGAAATTAAAGTGG
AGTAGTTGTGTGTGATTAAGATGGCTCTTATATATGATATTTAGA
GTGCGATAATCATATTTTCGCTTTAAATAAACAATTCTTTTGACGA
TCCGAAAGTCTGTCATACTTTGA

Görüntülenen baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak bu bankada kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18)

Filogenetik analiz çalışması için ise DNA dizileri Mega 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak “Neighbour joining” metodu ile sınıflandırılmıştır.



Şekil 4.17. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı RNA3(Manto protein) bölgesi karşılaştırılması



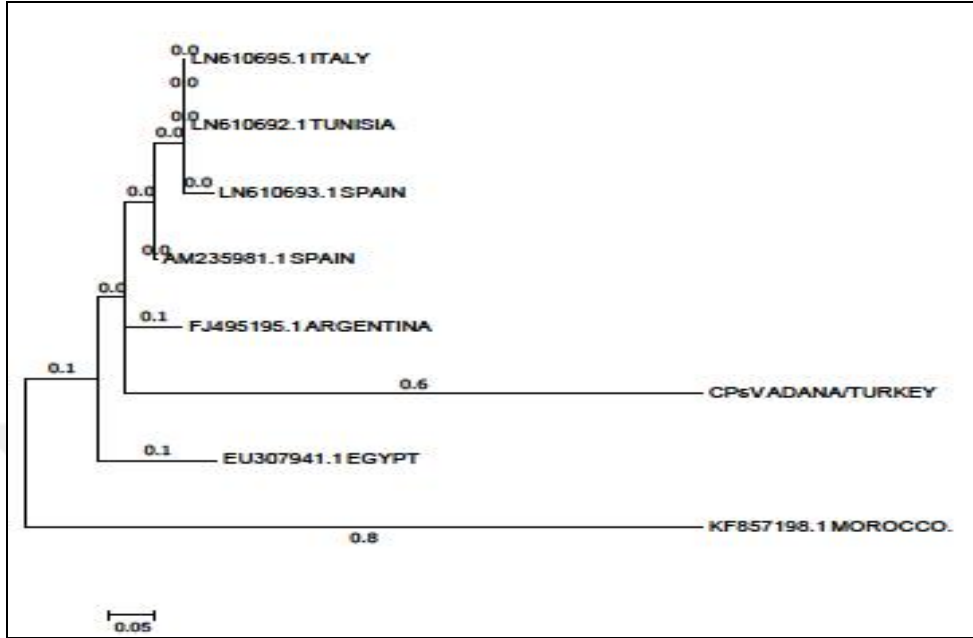
Şekil 4.18. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı RNA2 bölgesi karşılaştırılması

Bu çalışmada, nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncgil türlerinden alınan örneklerin RNA3 bölgesinin İspanya, Arjantin ve Mısır izolatları ile %96 oranında benzerlik gösterdiği, RNA2 bölgesinin ise İspanya izolatları ile %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca farklı turuncgil türlerinin RNA3 bölgesinin birbiri ile olan benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu ortaya konmuştur.

İspanya P-121 psorosis izolatının tüm genomunun dizilimi Martin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Martin ve ark. 2005). P-121 izolatının tüm genom dizilemesi birbiri ile %99'un üzerinde örtüşen en az iki bağımsız cDNA klonu üzerinden belirlenmiştir. P-121 izolatının genomik organizasyonun daha önce dizilimi yapılan CPV-4 izolatı ile aynı olduğu belirtilmiştir. P-121'e ait

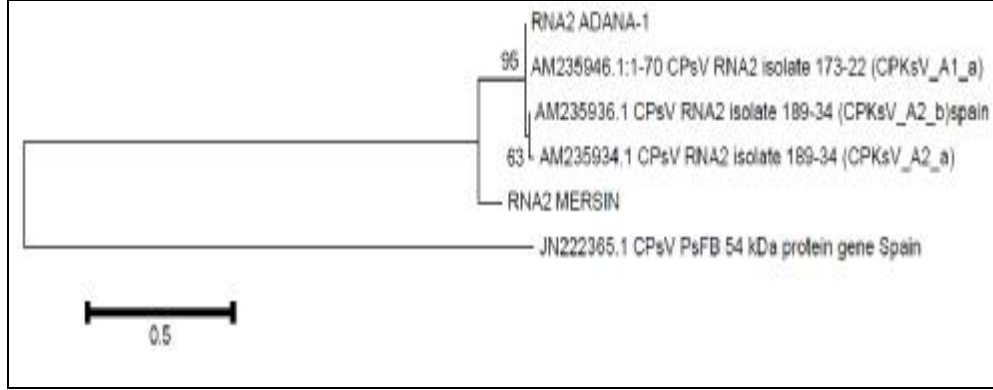
RNA1'in 8186 nükleotid büyüklüğünde olup, CPV-4 izolatının RNA1'den iki nükleotid daha uzun olduğu bulunmuştur. Buna göre, P-121 ve CPV4 izolatlarının RNA1 benzerlikleri %81 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 24K protein geni, P-121 ve CPV4 izolatlarında yüksek oranda benzerlik göstermiştir (%92.2). P-121 izolatına ait 1645 nükleotid uzunluğundaki RNA2 bölgesinde bulunan 3' ucundaki terminusda ekstra C (sitozin) bazı bulunması nedeniyle, CPV4 izolatından sadece bir nükleotid daha uzun olduğu belirtilmiştir. Böylece, bu iki CPsV izolatının RNA 2 benzerlikleri % 83.3 olarak bulunmuştur. RNA2 tarafından kodlanan 54K protein benzerliklerinin ise %96.4 olduğu belirlenmiştir. P-121'in 1447 nükleotid uzunluğundaki RNA3 bölgesinin CPV-4'den yedi nükleotid daha kısa olduğu ve %85.5 oran ile diğer iki RNA bölgesinden daha yüksek benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, P-121 izolatının genomik RNA'larının diziliminin belirlenmesi, bu çalışmada kullanılan iki CPsV izolatının tüm genom dizilerindeki çeşitliliklerin saptanmasında yardımcı olmuş ve nükleotid benzerliklerinin ortalama %82 olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen 600 nt'lik RNA3 bölgesi İspanya izolatları ile %96 lık bir benzerlik oluşturmuştur. Yine bu izolatın farklı ülkelerden NCBI genbankasına yapılan kayıtlarda farklı yüzdelerde (PB-108 AM235981 İspanya izolatı %96 benzerlik, İtalya izolatı LN610694 %95) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.19).



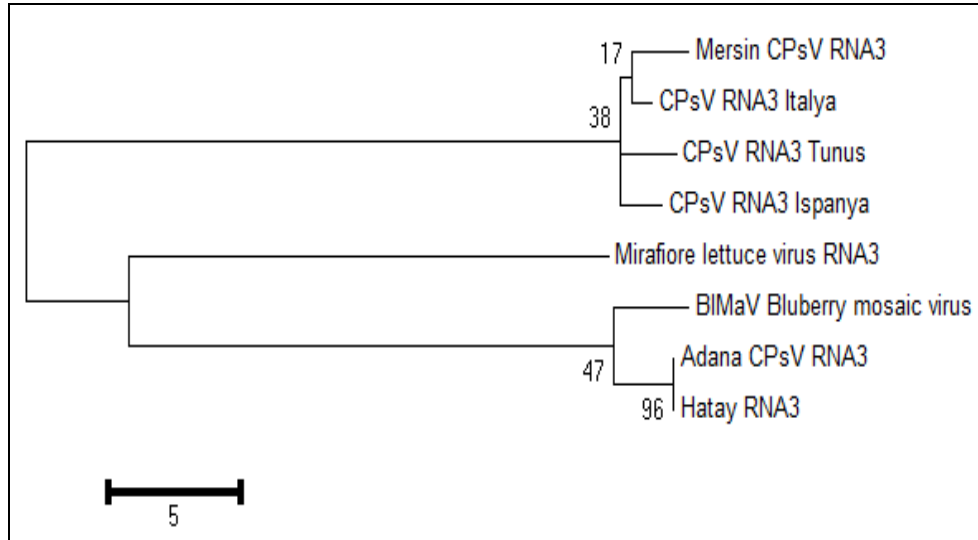
Şekil 4.19. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin RNA3 bölgesinin farklı izolatlarla karşılaştırılması.

Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda RNA2 bölgesinin ise %98 oranında İspanya izolatları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin RNA2 bölgesinin farklı izolatlarla karşılaştırılması.

Çalışmada ayrıca farklı turunçgil izolatlarından elde edilen Psorosis virüsünün RNA3 bölgesinin birbiri ile olan benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.21). Adana ve Hatay izolatlarının aynı bölüm içinde yer alırken Mersin izolatının ayrı bir bölümde yer aldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil izolatlarından alınan örneklerin RNA3 bölgesinin birbiri ile ve farklı Olphio virüsler ile karşılaştırılması.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu araştırma ile Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, Mersin, Hatay) CPsV ile bulaşık olduğu bilinen 10 yaşından ve 10 dekardan büyük portakal (*C. sinensis*), mandarin (*C. reticulata*) ve altıntop (*C. paradisi*) bahçelerinde hastalığın yaygınlığı ve hastalığın PsA ve PsB varyantlarının varlığı belirlenmiş; ayrıca, Doğu Akdeniz Bölgesi turuncgil üretim alanlarından CPsV ile bulaşık olduğu düşünülen ağaçlardan alınan bitki dokuları moleküler yöntemle (TT-PZR) araştırılmış ve RNA2 ve RNA3 gen bölgeleri tanımlanmıştır ve araziden alınan CPsV simptomlarını gösteren örnekler pineapple portakal tohumundan yetiştirilen fidanlarda biyolojik indeksleme yapılarak, hastalığın bu türdeki belirtileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

5.1.1. Sörvey Çalışmaları Sonuçları

- 1- Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, Mersin, Hatay) CPsV ile bulaşık olduğu bilinen 10 yaşından ve 10 dekardan büyük portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*) ve altıntop (*Citrus paradisi*) bahçelerinde yapılan surveylerde PsA'nın karakteristik simptomlarından olan genç yapraklarda damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü simptomları yoğun olarak bulunmuştur. Bu genç yaprak simptomları ile birlikte gövde ve ana dallarda kabuk kavlamalarının da olduğu gözlemlenmiştir.
- 2- Kabuk kavlama simptomları tabakalar halinde ve pul pul olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Kabuk kavlama dokularının altında odun dokusu içinde zambak paketleri etmenin şiddetli etkilediği portakal ve mandarin ağaçlarında gözlenmiştir.
- 3- Şiddetli kabuk kavlama simptomu gösteren ağaçların yaşlı yapraklarında klorotik lekeler ve yaprakların arka kısmında zambak kabarcıkları

bulunmaktadır. PsB' nin karakteristik simptomlarından olan şiddetli kabuk kavlamaları ve yaşlı yaprak simptomları yoğun miktarda olmamasına rağmen survey çalışmasının yürütüldüğü Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunmaktadır.

- 4- Concave gum simptomunun Adana ve Mersin illerindeki mandarin ağaçlarında ve odun dokusu deformasyonunun ise daha çok eski bahçelerde ve yaşlı portakal ağaçlarında daha fazla bulunduğu gözlenmiştir.
- 5- Doğu Akdeniz Bölgesi'nde CPsV'nin yaygın olarak bulunduğu, kabuk kavlama simptomlarını PsA ve PsB varyantlarının oluşturduğunu ancak PsB'nin olgun yaprak simptomları oluştururken PsA'nın oluşturmadığı ve bölgemizde PsB'nin PsA kadar yaygın olmadığı belirlenmiştir.
- 6- Doğu Akdeniz Bölgesi'nde portakal, mandarin ve altıntop bahçelerinde gerçekleştirilen surveylerde toplamda 11150 ağacın %33'nün CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.
- 7- Gerçekleştirilen surveyler sonucunda CPsV'nin %38.3'lük oranla en fazla portakal çeşitlerinde görülmekte olduğu ve bunu %31.3 ile mandarin ve %13.04 ile altıntop çeşitlerinin takip ettiği belirlenmiştir.

5.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları Sonuçları

Farklı turuncgil türlerinden (Portakal, Mandarin, Altıntop) CPsV'ün genç yaprak, kabuk kavlama, yaşlı yaprak, odun dokusu deformasyonları, concave gum simptomlarına göre alınan izolatlardan tohumdan yetiştirilen 8 aylık pineapple portakal fidanlarına yapılan inokulasyon çalışması sonucunda ;

- Şok reaksiyonları
- Genç yapraklarda damar bantlaşması ve meşe yaprağı görüntüsü bütün indikatör bitkilerde 8 haftalık süre sonunda gözlemlenmiştir.

Sadece şiddetli kabuk kavlama simptomsu ve yaşlı yaprak simptomsu gösteren izolatlar ile yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında PsB'nin karakteristik simptomslarından olan yaşlı yaprakların üst yüzeyin de düzensiz klorotik lekeler ve yaprakların ara kısmında kahverengi zamklı kabarcıklar olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışma ile CPsV'nin yalnızca PsB varyantının olgun yaprak simptomsu oluşturduğu, PsA varyantının ise genç yaprak simptomsu oluştururken olgun yaprak simptomsu oluşturmadığı belirlenmiştir.

5.1.3. TT-PZR Çalışmaları Sonuçları

1. CPsV'nin moleküler olarak tanılanması çalışmalarında etmen portakal, mandarin ve altıntop ağaçlarından izole edilmiş ve TT-PZR yöntemiyle bu ağaçların hastalıkla bulaşık olduğu ortaya konmuştur.
2. TT-PZR çalışmalarında, toplanan 50 örneğin 35'nin CPsV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.
3. TT-PZR sonucunda en iyi sonuç veren örnekler şiddetli kabuk kavlaması ve yoğun genç yaprak simptomsu oluşturan örnekler olmuştur. Bu sonuç her bölge için geçerlidir.
4. Kullanılan primer çiftlerinden CPV-1/CPV-2 ve BC78/BC79 CPsV'nin rutin tanılamasında her zaman başarılı sonuç verirken diğer primer çiftleri her zaman aynı başarıyı göstermemiştir. Bu nedenle özellikle sertifikasyonda bu primerlerin kullanılmasının daha başarılı sonuçlar oluşturacağı düşünülmektedir.
5. Moleküler olarak direk sekanslama yöntemi ile virüsün RNA3 ve RNA2 bölgelerinin nükleotid dizilimleri elde edilmiştir.
6. Bu çalışmada, nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turuncgil türlerinden alınan örneklerin RNA3 bölgesinin İspanya, Arjantin ve Mısır izolatları ile %96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

7. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda RNA 2 Bölgesinin ise %98 oranında İspanya izolatları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.
8. Çalışmada ayrıca farklı turuncgil türlerinden elde edilen Psorosis izolatlarının RNA3 bölgesinin birbiri ile olan benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu ortaya konmuştur.

5.2. Öneriler

1. Sağlıklı üretim materyali (SUA yöntemi uygulanmış ve mavi etiketli) ve bu virüse karşı testlenmiş fidan üretiminin artırılması ve kullanılması,
2. Aşı gözü alımında genç yaprak ve kabuk semptomlarına dikkat edilmesi ve bu semptomları sergileyen ağaçların aşı gözü kaynağı olarak kullanılmaması,
3. Moleküler tanılamamanın sertifikasyon programlarında mutlaka kullanılması gereken bir yöntem olarak değerlendirilmesi,
4. Moleküler tanılamada primer seçimine dikkat edilmesi, rutin tanılamada manto protein bölgesinin kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Achachi, A., 2014. Recent advances in Citrus psorosis virus. VirusDisease, Volume 25, Issue 3: 261–276
- Azeri, T., Heper, E., 1973. Ege Bölgesi Satsuma Mandarinlerindeki Virüs Hastalıklarının Tanımı, Yayılışı ve Ekonomik Önemi Üzerinde Araştırmalar. TUBITAK IV. Bilim Kongresi, 5-8 Kasım, Ankara.
- Barthe, G. A., Ceccardi, T. L., Manjunath, K. L. and Derrick, K. S., 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT–PCR. *Journal of General Virology*, 79:1531–1537.
- Bove J. M., 1995. Virus and virus-like disease of citrus in the near East region. Rome, FAO: 518.
- Cengiz, A., Tekinel, N., Dolar, S., SagsSze, S. And Hancioglu, O., 1968. Karadeniz Bölgesi Turunçgil Virüs Hastalıkları Sörveyi. *Bitki Koruma Bülteni*, 8 (3), :172-180.
- Childs JFL, Johnson RE., 1966. Preliminary report of seed transmission of psorosis virus. *Plant Dis Repr.* 50:81-83.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S., and Sas, G., 1993. Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean region of Turkey. In. P. Moreno, J.V. da Graça L.W. Timmer and J.A. Doods (eds.), *Proc. 12th Conf. International Organization Citrus Virol.* Univ. Calif. Press, Riverside.
- D' Onghia AM, Djelouah K, Alioto D, Castellano MA, Savino V., 1998. ELISA correlates with biological indexing for the detection of citrus psorosis associated virus. *J Plant Pathol.* 80: 157-163.
- D'Onghia A.M., Djelouah K., Frasher D., Potere O., 2001. Detection of Citrus psorosis virus by direct tissue blot immunoassay. *Journal of Plant Pathology*, 83: 139-142.

- Danós, E., 1990. La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. In: International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (eds) Revista de Investigaciones Agropecuarias, vol 22, : 265-277.
- Derrick, K. S., Brlansky, R. H., da Graça, J. V., Lee, R. F., Timmer, L. W. and Nguyen, T. K., 1988. Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology*, 78, :1298–1301.
- Derrick, K. S., Lee, R. F., Hewitt, B. J. and Barthe, G. A., 1993. Spiroviruses: A new group of serologically diverse plant viruses associated with citrus psorosis and ringspot. In: Proc 12th Conf. IOCV, 428-429. IOCV, Riverside, CA.
- FAO, 2014. www.fao.gov.tr. Erişim Tarihi-18-06-2018.
- Fawcett, H. S., and Bitancourt, A. A., 1943. Comparative symptomatology of psorosis varieties on citrus in California. *Phytopath.*, 33: 837-864.14 figs.
- Fawcett, H. S., and Cochran, L. C., 1943. A method of inducing bark-shelling for treatment of certain tree diseases. *Phytopath.*, 34:240-244.
- Fawcett, H. S., and Klotz, L. J., 1938. Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopath.* 28:670.
- Fawcett, H. S., and Klotz, L. J., 1941. Prevention of brown rot gummosis in planting and growing young citrus trees. Univ. Calif. Citrus Experiment Station. (Mimeo.) 3 pp.
- Fawcett, H.S., 1933. New symptoms of psorosis indicating a virus disease of citrus. *Phytopath.*, 23: 930. (Abstract)
- García ML, Grau O, Sarachu AN, 1991. Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Research in Virology*, 142, 303–11.
- García, M. L., Dal Bo, E., Grau, O. and Milne, R., 1994. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol*. 75: 3585–3590.

- Garcia, M. L., Derrick, K. S. and Grau, O., 1993. Citrus psorosis associated virus and citrus ringspot virus belongs to a new virus group. In Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, pp. 430-431. Edited by P. Moreno, J. V. da Graça & L. W. Timmer. Riverside : University of California IOCV.
- García, M. L., Sánchez de la Torre M. E., Dal Bo. E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R.G., Grau, O., 1997. Detection of citrus psorosis ringspot virüs using RT-PCR and DAS-ELISA. Plant Pathology, 46 :830-836.
- Giacometti, D. C., 1986. Orange and Other Citrus . FAO Plant Production and Protection Paper 76
- Güllü, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel Grubu Portakalı ve Satsuma Mandarin Ağaçlarında Yaygın Virus ve Virus Benzeri Hastalıkların Surveyi ve İndekslenmesi Üzerinde Çalışmalar. Doktora Tezi, 70. Araştırma Yayınları Serisi, Ankara.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2018. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/aspiviridae, 17/07/2018
- Kayım, M. 2010. Biological and Molecular Detection of Citrus Psorosis Virus in Citrus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. J. Plant Biochemistry & Biotechnology Vol. 19(2)
- Knorr, L.C. and Child, J.F.L., 1968. Incidence and Spread of Citrus Viruses: Control Methods and Programs. Production of Virus-free Budwood in CitrusPast, Present, and Future. In W.C. Price (ed.), Proc. 4 th. Conf. Intern. Organization. Citrus Virol. Univ. Florida Press, Gainesville.
- Korkmaz, S., Önder, S., 2008. Edremit Körfez Bölgesi'ndeki Satsuma owari mandarinlerinde yaygın olan virüs ve viroid hastalıklarının biyolojik ve serolojik yöntemlerle saptanması. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(2).

- Kütük, B., 2011. Antalya ili turunçgil alanlarında psorosis virüsü'nün belirlenmesi, biyolojik ve moleküler karakterizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 65 pp
- Martin S, Alioto D, Milne RG et al., 2004. Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 747–757.
- Martin S., Alioto D., Milne R.G., Guerri J., Moreno P., 2002. Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathology*, 51: 134-141.
- Martín, S., López, C., García, M. L., Naum-Onganía, G., Grau, O., Flores, R., Moreno, P. and Guerri, J., 2005. The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Citrus psorosis virus: comparative analysis with other ophioviruses. *Arch Virol*, 150: 167–176.
- Milne RG, García ML, Moreno P, 2003. Citrus psorosis virus. *AAB Descriptions of Plant Viruses* 401.
- Milne, R.G., 1997. State of the art on citrus psorosis disease. *Proc, Medit. Network on Citrus certification*, Adana, in press. 25.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8:4321-4325.
- Naum-Onganía, G., Gago-Zachert, S., Peña, E., Grau, O. and García, M. L., 2003. Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res*, 96:. 49–61.

- Navarro L, 1993. Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, eds. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA: IOCV, 383–391.
- Navas-Castillo, J. and Moreno, P., 1993. Biological diversity of citrus ringspot isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 347-357.
- Navas-Castillo, J. and Moreno, P., 1995. Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with citrus psorosis and ringspot diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 343-348.
- Navas-Castillo, J., Moreno, P., Cambra, M., Derrick, K., 1993. Partial purification of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. *Plant Pathology*, 42: 339-346.
- Norman, P.A., 1963. Report to government of Turkey on citrus virus diseases. FAO Report Rome No:1641. 16 p.
- Önelge N, 1997. Direct nucleotide sequencing of Citrus exocortis viroid (CEV). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 21: 419-422.
- Önelge, 1988. Doğu Akdeniz bölgesi ticari portakal çeşitlerinde psorosis grubu hastalıkların belirlenmesi ve biyolojik indekslenmesi Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Adana. 58 s.
- Özalp, M.O., 1966. Turunçgil virüs hastalıkları. Bornova Ziraat Mücadele Enstitüsü Yayını, İzmir, 20.
- Palle SR, Miao H, Seyran M, Louzada ES, da Graça JV, Skaria M. 2005. Evidence for association of *Citrus psorosis virus* with symptomatic trees and an *Olpidium*-like fungus. Proceedings of the 14th International Organisation of Citrus Virologists (IOCV) Conference, Riverside. 423–426.

- Price WC. 1965. Transmission of psorosis virus by dodder. In: Price WC, editor. Proceedings of the 3rd Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Gainesville (FL): University of Florida Press. p. 162-166.
- Roistacher CN, 1993. Psorosis – a review. In: Moreno P, da Grac,a JV, Timmer LW, eds. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA: IOCV, 139–154
- Roistacher CN, Calavan EC, 1965. Cross-Protection Studies with Strains of Concave Gum and Psorosis Viruses. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010), 3(3).
- Roistacher CN, Calavan EC, 1974. Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm temperatures. Plant Disease Reporter 58: 850–3.
- Roistacher, C. N., 1991. Graft-Transmissible Diseases of Citrus. In: Food, Agriculture Organization of the United Nations, FAO (Ed.), Handbook for Detection and Diagnosis, Rome, Italy, p. 115–126.
- Sánchez de la Torre E, Lo´pez C, Grau O, Garcí’a ML, 2002. RNA2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. Journal of General Virology. 83:1777–1781.
- Sánchez de la Torre E, Riva O, Zandomeni R, Grau O, Garcí’a ML, 1998. The top component of citrus ringspot virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the CP. Molecular Plant Pathology Online [http://194.247.68.33/mppol/1998/1019_sanchez/].
- Sánchez de la Torre, M. E., M. L. García, O. Riva, E. Dal Bó, Jones, L., Zandomeni,R. and Grau, O., 2000. Genome organization of the top component of Citrus psorosis virus and identification of the coat protein gene. In: Proc. 14th Conf. IOCV, Riverside, CA, p. 345-346.
- Swingle, W. T. and Webber, H. J., 1896. The principal disease of Citrus Fruit in Florida. USDA. Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin, 8: 9-14.

- Şaş, G., 1991. Turunçgillerde GA3 Uygulaması ve *in vitro* Sürgün Ucu Aşılama Tekniği Kombinasyonunun Psorosis Grubu Hastalık Etmenlerinden Arındırılmış Üretim Materyali Elde Etme Oranına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi Adana. 97 s.
- Timmer LW, Garnsey SM, 1980. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW, eds. Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA: IOCV, p. 167–193.
- Timmer, L. W. and Beiiatena, H. N., 1977. Comparison of psorosis and other viruses causing leaf flecking in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 3: 930-935.
- TUİK, 2016. www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi-08-06-2018.
- Vaira AM, Accotto GP, Gago-Zachert S et al., 2005. Ophiovirus. Type species Citrus psorosis virus (CPsV). In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK: Elsevier/Academic Press, 673–679.
- Velázquez K, Pina JA, Navarro L, Moreno P, Guerr J. 2012. Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the *Citrus psorosis virus* RNA2. Plant Pathol. 61:448–456.
- Vogel R, Bové JM. 1980. Citrus ringspot in Corsica. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW, editors. Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 180-182.
- Wallace JM, 1957. Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. Hilgardia, 27:223–224.
- Wallace, J. M., 1945. Technique for hastening foliage symptoms of psorosis of citrus. Phytopathology 35:535-541.

- Wallace, J. M., 1968. Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. In Proc. 4th Conf. IOCV. Univ. Florida Press, Gainesville, p.177-183.
- Weathers & Harjung, 1964. Plant Disease Reporter 48: 102.
- Yeşiloğlu, T., Emeksiz, F., Tuzcu, Ö., Alemdar, T. 2007. National Citrus Sector Analysis, Turkey. www2.spi.pt/euromedcitrusnet/sector_analysis_report.asp.
- Yılmaz, M. A., 1997. Diagnosis Of Citrus Psorosis. Proceedings of 10th Congress Of The Mediterranean Phytopathological Union. June 1st-5th, 1997, Montpellier, France, p. 343-348.

ÖZGEÇMİŞ

01.10.1989 yılında Adana’da doğdu. İlk ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2015 yılında Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji bilim dalında yüksek lisans programına başlamaya hak kazandı.

