

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Spiroplasma citri*'nin Farklı Primerler Kullanılarak qPCR
Yöntemi ile Moleküler Teşhisi**

Tahmina Tahmina MUSTAFAYEVA

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Ağustos, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

***Spiroplasma citri*'nin Farklı Primerler Kullanılarak qPCR
Yöntemi ile Moleküler Teşhisi**

Tahmina Tahmina MUSTAFAYEVA

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 30/07/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN (Danışman)

: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

: Dr. Öğr. Üyesi. Ali ENDES

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:.....

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Çalışma Alanı	15
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Bitkisel Materyal.....	15
3.1.3. Ekstraksiyon İçin Kullanılan Materyaller.....	16
3.1.4. PCR Analizi İçin Kullanılan Materyaller	17
3.1.5. Elektroforez İçin Kullanılan Materyaller	17
3.1.6. qPCR İçin Kullanılan Materyaller.....	17
3.2. Metod.....	18
3.2.1. Arazide Hastalıklı Bitkilerin Teşhisi ve Bitki Materyali Elde Edilmesi	18
3.2.2. Laboratuvar Çalışmaları	19
3.2.3. Total DNA Ekstraksiyon Yöntemi	19
3.2.4. Primerler	19
3.2.5. <i>Spiroplasma</i> DNA'sının Klasik PCR ile çoğaltılması	19
3.2.6. Elektroforez Çalışmaları.....	20
3.2.7. <i>Spiroplasma</i> DNA'sının qPCR yoluyla çoğaltılması.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Turunçgil Yediverenleşme Hastalığı ile İnfekteli olduğu düşünülen bahçelerde gözlemlenen semptomlar	23
4.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular	29
4.2.1. Klasik PCR Çalışmaları.....	29
4.2.2. qPCR Çalışmaları	33
4.2.3. Klasik PCR ve qPCR'ın Karşılaştırılması.....	38
4.3. Arazide Gözlemlenen Simptomolojik Bulguların ve Moleküler Sonuçların Karşılaştırılması.....	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43

ÖZGEÇMİŞ	49
EKLER.....	51
EK-1. CTAB Tamponu (Ekstraksiyon Tamponu).....	53
EK- 2. 1X TAE Tamponu	54
EK- 3. Total DNA Ekstraksiyon Yöntemi.....	55



***Spiroplasma citri*'nin Farklı Primerler Kullanılarak qPCR Yöntemi ile Moleküler Teşhisi**

Tahmina Tahmina Mustafayeva

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada Adana ili Kozan, Yüreğir ve Karataş ilçesi, Mersin ili Tarsus ilçesi, Hatay ili Erzin ilçelerinde yetiştirilen, Washington Navel ve Satsuma mandarin bahçelerinden simptomolojik olarak *Spiroplasma citri* ile bulaşık olduğu düşünülen toplam 25 ağaçtan örnek toplanmıştır. Toplanan turuncgil örneklerinin öncelikle klasik PCR yöntemi ile teşhisi yapılmış, sonrasında pozitif olarak bulunan örneklerin bir kısmı qPCR yöntemi belirlenmiştir. Klasik PCR moleküler yöntemi ile hastalığı belirlemek için öncelikle P89-f/P89-r primerleri kullanılarak PCR testi uygulanmış ve toplam 25 örneğin 10'u pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif bulunan 10 örneğin 6'sına P58-3f/4r ve P58-1f/P58-2r primer çiftleri kullanılarak qPCR testi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan 6 örneğin tamamı P58-3f/P58-4r primer çiftinin kullanılarak yapılan qPCR testi sonucunda 6'sı da pozitif bulunurken P58-1f/P58-2r primer çifti kullanılarak yapılan qPCR testinde sadece 1 örnek pozitif sonuç vermiştir. *S. citri* hastalığının qPCR ile teşhisinde P58-3f/P58-4r primer çiftinin daha güvenilir bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca klasik PCR testinde negatif çıkan ve qPCR'de negatif olarak kullanılan bir örnekte pozitif çıkmış, bu sonuçla hastalığın belirlenmesinde qPCR yönteminin daha etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Spiroplasma citri*, qPCR, moleküler yöntemler, turuncgil.

**Molecular Diagnosis of *Spiroplasma citri* by qPCR Method
Using Different Primers.**

Tahmina Tahmina MUSTAFAYEVA

Advisor: Prof. Dr. Orhan BOZAN

Department of Plant Protection

ABSTRACT

In this study, a total of 25 samples were collected from trees that were symptomtologically thought to be infected with *Spiroplasma citri* from Washington Navel and Satsuma mandarin orchards grown in Adana province Kozan, Yüreğir and Karataş districts, Mersin province Tarsus district, Hatay province Erzin districts. The collected citrus samples were first diagnosed by the classical PCR method, and then some of the samples found to be positive were determined by the qPCR method. To determine the disease with the classical PCR molecular method, PCR testing was first performed using P89-f/P89-r primers and 10 of a total of 25 samples were found to be positive. qPCR testing was performed on 6 of the 10 positive samples using P58-3f/4r and P58-1f/P58-2r primer pairs. While all 6 samples used in the study were found positive as a result of the qPCR test using the P58-3f/P58-4r primer pair, only 1 sample gave a positive result in the qPCR test using the P58-1f/P58-2r primer pair. It has been determined that the P58-3f/P58-4r primer pair can be used more reliably in the diagnosis of S. citri disease by qPCR. In addition, a sample that was negative in the classical PCR test and used as negative in qPCR was positive, and with this result, it was argued that the qPCR method was more effective in detecting the disease.

Keywords: *Spiroplasma citri*, qPCR, molecular diagnosis, Citrus.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, yönetici ve olağanüstü fikirleriyle bana doğru yolu gösteren, her adımında bana sabır ve anlayış gösteren saygıdeğer danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez jüri üyelerim değerli hocalarım Prof. Dr. Nüket ÖNELGE ve Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES'e teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyerek bana her konuda destek olan Araş. Gör. Merve KAZAK'a çok teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında maddi manevi her konuda yanımda olan ve bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada Turunçgil Üretim Verileri FAO	2
Çizelge 1.2. Türkiyede Turunçgil Üretim Verileri TÜİK.....	3
Çizelge 3.1. Çalışmada örnekleme yapılan bölgeler ve örnek sayıları	16
Çizelge 3.2. PCR’da kullanılan kimyasal maddeler	17
Çizelge 3.3. qPCR’da kullanılan kimyasal maddeler	18
Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan primerler;	19
Çizelge 3.5. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR aşamaları	20
Çizelge 3.6. qPCR basamakları	21
Çizelge 4.1. Örneklerin çeşit farklılıkları ve lokasyonlara göre verileri.....	27
Çizelge 4.2. Çalışma alanlarından alınan meyvelerin kolumella kısımları kullanarak elde edilen sonuçlar.....	31
Çizelge 4.3. Toplam 25 örneğin jel sonuçları, pozitif (+) ve negatif (-) olarak elde edilen sonuçlar.....	32
Çizelge 4.4. P58-3f/4r ve P58-1f/2r primer çifti kullanılarak yapılan qPCR sonuçları.....	33
Çizelge 4.5. qPCR ve klasik PCR karşılaştırılması.	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	1.8% hazırlanmış agaroz jel.....	20
Şekil 3.2.	qPCR işleminin yapılışı	21
Şekil 3.3.	qPCR örneklerinin cihaza yerleştirilmesi.	22
Şekil 3.4.	Çalışmada kullanılan Roche LightCycler® markalı qPCR cihazı.....	22
Şekil 4.1.	Bodurlaşma görülen ağaçların görünüşleri.....	24
Şekil 4.2.	Yaprakların kaşık şeklini alması simptomsu.....	24
Şekil 4.3.	Turunçgil Yediverenleşme hastalığının turunçgil ağaçlarında boğum aralarının kısılması, yukarı doğru büyüyen yeni sürgünler ve ağaçlarda çalılma.	25
Şekil 4.4.	Ağaç üzerinde irili ufaklı meyveler ve yeni sürgünleri yukarı yönelmesi.	25
Şekil 4.5.	Meyvelerin palamut şeklini alması.	26
Şekil 4.6.	Meyvenin sap kısmına yakın kabuğunun daha kalın (A), göbek kısmına yakın kabuğun daha ince (B) olması ve eksen kayması.	26
Şekil 4.7.	Çalışmada kullanılan meyve kolumellası	29
Şekil 4.8.	Moleküler Çalışmalar Sonucu %1,8'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen PCR ürünlerinin ethidium bromid boyaması ile alınan jel görüntüleri.	32
Şekil 4.9.	Moleküler Çalışmalar Sonucu %1,8'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen PCR ürünlerinin ethidium bromid boyaması ile alınan jel görüntüleri.	33
Şekil 4.10.	qPCR analizi sonucunda elde edilen titre değerleri	36
Şekil 4.11.	qPCR analizi sonucu amplifikasyon grafiği	37
Şekil 4.12.	Örneklerin bilgisayarda negatif ve pozitif durumlarının göstergesi.	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
°	: Derece
CSD	: Citrus Stubborn Disease
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
g	: Gram
l	: Litre
M	: Markör
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Trifosfat
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
sp.	: Tür
spp.	: Türler
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TE	: Tris-EDTA
PCR	: Polymerase Chain Reaction
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Turunçgiller; subtropik iklim isteğine sahip, ekonomik değeri yüksek çeşitler içeren Rutaceae familyası Aurantioideae alt familyasının üyesi olan, *Citrus* cinsine ait bir bitki topluluğudur. Rutaceae familyası içerisinde çok farklı çeşitleri içermektedir. Bu çeşitler içerisinde portakal, mandarin, limon, altıntop, turunç, kamkat, ağaç kavunu, şadok ve bergamot bulunmaktadır. Turunçgiller insan hayatında çok önemli bir role sahiptir. Turunçgiller sadece vücudumuzun C vitamin ihtiyacını karşılamakla kalmayıp aynı zamanda reçel, meyve suyu, hatta kozmetikte bile önemli bir fayda sağlamaktadır. Turunçgiller ekvatorun 40° derece kuzey ve güney enlemleri arasında yer alan sıcak ülkelerde yetiştirilmektedir çünkü soğuk iklimde verim miktarında azalma meydana gelmektedir (ADATÜB 2023).

Eskiden sadece Akdeniz bölgesinde üretim alanlarına sahip olan Turunçgiller günümüzde yoğun bir ilgi çerçevesinde hem kuzey hem de Güney Yarımküre'de üretimi yapılmaktadır. Bu yarımkürede üretilen turunçgiller erkenci ve geçci turunçgiller olarak iki isim altında yetiştirilmektedir. Turunçgillerin üretim sezonu Nisan/Mayıs aylarında başlayıp, Kasım/Aralık aylarına kadar devam etmektedir. Erkenci turunçgil çeşitlerinin üretim sezonu ise Ekim/Kasım aylarında başlayıp, Mayıs/Haziran aylarına kadar devam etmektedir (ADATÜB 2023).

2021 yılı dünya üzerinde yaklaşık olarak 8,7 milyon hektarlık bir alanda turunçgil üretimi gerçekleştirilmiştir. Turunçgil üretim alanlarının %45'ini portakal, %36'sını mandarin, %15'ini limon ve %4'ünü greyluft oluşturmaktadır. Dünya üzerinde 2022/23 üretim sezonunda gerçekleşen 101 milyon tonluk turunçgil üretiminin %47'si portakal çeşidine aittir. Portakalın meyve suyu üretiminde daha yaygın olarak kullanılması nedeniyle bu miktar önemli bir paya sahip olmaktadır. AB ülkeleri, turunçgil ithalatında dünyada önde gelen ülkeler arasında yer almakta ve bu durumu Rusya izlemektedir. Turunçgil ihraç eden ülkeler arasında ise Güney Afrika, Türkiye ve Mısır öne çıkmış durumdadır (FAO 2021).

Turunçgillerin ana vatanı Asya'nın güneydoğusu, Çin ve Hindistan'dır. Dünyada turunçgil çeşitlerinin üretimi 40° Kuzey ve 40° güney enlemleri arasında büyük bir yoğunlukta yapılmakta olup, özellikle 19. yy'da turunçgil üretim alanları ve üretim miktarlarında hızlı bir artış görülmektedir (Atlı ve Şahin, 2021).

Kıtalar üzerinde ki turunçgil üretimi dağılıma bakarsak eğer Asya Kıtası %44,9 oranı ile birinci, Amerika Kıtasında %34,7 oranı ile ikinci, Afrika Kıtasında ise % 12,2 oranı ile üçüncü sırada yer almaktadır (Atlı ve Söyler, 2018).

2022/23 yılı dünya turunçgil üretiminde yaklaşık olarak 101 milyon ton üretim gerçekleştirilmiştir. Bu üretimin 48 milyon tonunu portakal, 37 milyon tonunu mandarin, 9 milyon tonunu limon ve 7 milyon tonunu greyluft oluşturmaktadır (Çizelge 1.1.). Üretim miktarları yüzde olarak belirtildiğinde üretimin %47'si portakal, %37'si mandarin, %9'u limon ve %7'si greylufta aittir. Oransal olarak belirtildiği gibi meyve suyu sanayisinde portakal çok tüketilen bir meyve

olduğundan aynı sezonda dünya üzerinde 1 milyon 532 bin ton portakal suyu üretilmiştir. Bu üretimin %73'ünü Brezilya, %11'ini Meksika, %6'sını ABD oluşturmuştur. Brezilya portakal suyu üretiminin % 93'ünü gerçekleştirmiştir (FAO 2023).

Çizelge 1.1. Dünyada Turunçgil Üretim Verileri FAO (2023)

	Portakal	Mandarin	Limon	Greyfurt	Toplam
2018/2019	54.302	32.908	9.033	6.816	103.059
2019/2020	46.102	32.711	8.806	6.797	94.416
2020/2021	48.186	36.026	9.362	6.681	100.255
2021/2022	50.410	37.832	10.204	6.965	105.411
2022/2023	47.765	36.923	9.069	6.807	100.564

2023/2024 ADATÜB (Adana Turunçgil Üreticileri Birliği) verilerine göre Türkiye ile aynı pazara sahip olan ülkelerde 2023/2024 üretim sezonunda hasat artışı beklenmektedir. Bu ülkelerden biri olan İspanya'da geç dönem mandarin ve limonlarda çok sayıda hasat artışı, Huelva bölgesinde verim azlığı erkenci portakallarda beklenirken normal bir hasat artımı ise geç dönem yetişen portakallarda beklenmektedir. Mısır'da verimliliğin artışı kendini fidan bahçelerinde göstermekteyken portakal, limon ve mandarin hasatında da bu durumun yanı sıra rekabetten dolayı pazar kayıplarının da yaşanacağı tahmin edilmektedir (ADATÜB 2023).

Türkiye'de ilk olarak 1936'lı yıllarda turunçgil üretimi yapılmıştır. Turunçgil ihracatı ise 1950'li yıllarda gerçekleştirilmiştir. 1989'da Madrid'de bulunan Liason Committee For Mediterranean Citrus (CLAM)'a Türkiye kendi üyeliğini gerçekleştirmiştir (Atlı H.F. ve Şahin A., 2021). Büyük bir hasat farkıyla Türkiye'de Ege ve Akdeniz Bölgelerinden ve farklı turunçgil yetiştiriciliği olan bölgelerden 2022 yılında 4,7 milyon ton turunçgil üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimin yoğun yapıldığı iller ise Adana, Mersin, Antalya, Hatay, Muğla ve Osmaniye illeridir. Akdeniz Bölgesi'nde üretimin %82'sini portakal, %87'sini mandarin, %91'ini limon ve %96'sını greyfurt sağlamaktadır.

2022 yılının Bitkisel Üretim İstatistikleri'ne göre turunçgil üretiminin 1 milyon 865 bin ton' unu mandarin, 1 milyon 323 bin ton' unu limon, 1 milyon 322 bin tonunu portakal, 198 bin tonunu greyfurt, 2 bin 808 tonunu turunç sağlamaktadır. 2021 yılından farklı olarak 2022 yılında mandarin ve turunçta artış görülürken portakal, greyfurt ve limonda azalma gözlenmiştir (TÜİK 2023).

2018 ve 2022 yıllarında Türkiye'de toplam turunçgil üretiminde 2018 yılına nisbeten %4 oranında bir azalma görülmüştür. En fazla artış %37 oranla turunçta ve en fazla azalma ise %39 oran ile Washington çeşidi portakalda (Çizelge 1.2.) görülmüştür (TÜİK 2022).

Çizelge 1.2. Türkiye'de Turunçgil Üretim Verileri TÜİK (2022)

Ürün	2018	2019	2020	2021	2022
Portakal	1.900.000	1.700.000	1.333.975	1.742.000	1.322.000
Mandarin	1.650.000	1.400.000	1.585.629	1.819.000	1.865.000
Limon	1.100.000	950.000	1.188.517	1.550.000	1.323.000
Greyfurt	250.000	249.185	238.012	249.000	198.000
Turunç	2.052	2.230	2.609	2.615	2.808
Toplam	4.902.052	4.301.415	4.348.742	5.362.615	4.710.808

İlk olarak Kaliforniya'da tanımlanan turunçgil yediverenleşme hastalığı'nın (CSD), Amerika Birleşik Devletleri ve Akdeniz Bölgesi'ndeki çoğu kurak turunçgil üretim bölgesinde bulunan yaygın bir bakteriyel hastalık olduğu bildirilmiştir. CSD ciddi ağaç hasarına yol açarak meyve üretimi ve kalitesinin düşmesine neden olmuştur. CSD'nin tespiti, düşük ve dalgalı titre ve patojenin infekte ağaçlardaki düzensiz dağılımı nedeniyle zor olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, tespit belirteci olarak *S. citri* tarafından salgılanan bir protein kullanarak CSD için yeni bir teşhis yönteminin geliştirildiği bildirilmiştir (Shi ve ark., 2013).

CSD ilk olarak 1915'te Kaliforniya'da gözlemlenmiş ve daha sonra 1942'de aşı yoluyla bulaşan bir hastalık olduğu kanıtlanmıştır. Bahçede, hastalıklı ağaçlar basık ve bodur görünümlere sahiptir ve pazar değeri düşük, kalitesiz meyveler vermektedir. Hastalığa, *Spiroplasmataceae* familyasına (*Mollicutes*) ait, floem kısıtlı patojenik bir molliküt olan *S. citri* neden olmaktadır. Floemle beslenen birkaç yaprak zararlısı türü (*Cicadellidae*, *Hemiptera*), *S. citri*'nin kalıcı ve çoğalıcı bir şekilde doğal yayılmasını desteklemektedir. Bu çalışmada CSD'yi sınırlamak amacıyla yeni tanımlanan türler için bir karantina sistemi uygulanmıştır. Dünya çapında CSD ile ilgili mevcut bilgi durumu bu genel bakışta özetlenmiştir; burada en iyi uygulamaların benimsenmesi yoluyla hastalığın yayılmasını önlemek veya sınırlamak için *S. citri* tespiti, karakterizasyonu, kontrolü ve yok edilmesindeki son gelişmeler vurgulanmıştır (Sagouti ve ark., 2022).

Kersting ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada *Catharanthus roseus* (L.), *Crepis echinops* (L.), *Digitaria sanguinalis* (L.), *Echium* sp., *Salsola kali* (L.), *Sesamum indicum* (L.), *Sorghum halepense* (L.), *Xanthium* sp., *Zea mays* bitkilerinde ELISA yöntemi ile *S. citri*'nin varlığını ortaya koymuşlardır.

S. citri'nin yayılabilmesi için yabancı otların konukçuluk ettiği düşünülüp bu yönde bir takım çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda; *Sorghum halepense*, *Convolvulus arvensis*, *Salsola kali*, *Sonchus oleraceus* olmakla 4 adet yabancı ot türünde *S. citri*'ye rastlanılmıştır (Uygur 1991).

Göbekli portakallarda sorun oluşturan *S. citri*'nin *Neoliturus haematoceps*'e bağlı olarak yayılması üzerine bir araştırma yapılmıştır. Adana ili Kozan ilçesindeki Washington Navel portakal bahçelerinde yapılan araştırmada, *S. citri* enfeksiyon oranları farklı kültürel işlemlere göre

karşılaştırılmıştır. Yabancı otların PCR ile test edilmesi sonucunda bazı türlerin (*Convolvulus arvensis*, *Taraxacum officinale*, *Sorghum halepense*, *Cynodon dactylon*, *Conyza canadensis*, *Amaranthus viridis*, *Chenopodium album*, *Paspalum dilatatum*, *Euphorbia heterophylla*, *Solanum nigrum*, *Mercurialis annua*, *Fumaria officinalis*) *S. citri* ile bulaşıklığı belirlenmiş, ayrıca, *N. haematocephus* bireyleri ve simptom gösteren meyvelerin PCR ile test edilmesiyle de *S. citri* bulaşıcılığına dair pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Ateş, 2021).

Ceyran (2021), tarafından Adana'nın Kozan, Yüreğir ve Karataş ilçeleri ile Mersin'in Tarsus ilçesi ve Hatay'ın Erzin ilçesinde yetiştirilen Washington Navel, Valencia portakalı ve Satsuma mandarin bahçelerinde görülen *S. citri*'ye ev sahipliği yapan yabancı ot ve turunçgil örneklerinin PCR testi ile belirlenmesi ve izolatların moleküler benzerlik oranlarının incelenmesi yönünde bir çalışma yapılmıştır. Toplamda 45 örnek toplanmış olup, bunların 20'si yabancı ot, 25'i ise turunçgil yaprağı ve meyve örneklerinden oluşmuştur. PCR testi uygulanarak örneklerin moleküler karakterizasyonu belirlenmiştir ve P89-r/f primeri kullanılmıştır. 45 örnekten 18'i pozitif sonuç vermiştir. Yabancı ot örnekleri arasında *Portulaca oleracea*, *Sütleğen prostrata*, *Dinebra retroflexa*, *Mercurialis annua*, *Conyza canadensis*, *Solanum nigrum* pozitif sonuçlar vermiştir. Örneklerin moleküler karakterizasyonunu belirlemek için her bölgeden birer olmak üzere toplam 4 örnek sekansa gönderilmiş ve seçilen izolatlar Türk ve yabancı izolatlarla %96 ile %100 benzerlik göstermiştir.

Bu çalışmanın amacı; Doğu Akdeniz Bölgesi'nin farklı turunçgil alanlarında *S. citri*'nin farklı primer çiftleri kullanılarak moleküler testlerden öncelikle klasik PCR ardından qPCR gibi farklı moleküler yöntemlere tabi tutarak saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Asya'nın güneydoğusu, Çin ve Hindistan Turunçgillerin ana vatanlarını oluşturmaktadır. Farklı turunçgil çeşitleri dünya üretiminde 40° Kuzey ve 40° güney enlemleri arasında büyük bir yoğunlukta yapılmakta olup, özellikle 19. yy'da hızlı bir şekilde gelişme göstererek üretim alanlarını sürekli arttırmıştır (Atlı H.F. ve Şahin A., 2021).

Kıtalar üzere olan dağılıma bakıldığında dünya üzerinde turunçgil üretimi Asya Kıtasında %44,9 oranı ile birinci, Amerika Kıtasında %34,7 oranı ile ikinci, Afrika Kıtasında ise % 12,2 oranı ile üçüncü sırada yer almaktadır (Atlı ve Söyler, 2018).

2022/23 yılı dünya turunçgil üretiminde yaklaşık olarak 101 milyon ton üretim gerçekleştirilmiştir. Bu üretimin 48 milyon tonunu portakal, 37 milyon tonunu mandarin, 9 milyon tonunu limon ve 7 milyon tonunu greyfurt oluşturmaktadır (FAO 2023).

2018 ve 2022 yıllarında Türkiye'de toplam turunçgil üretiminde 2018 yılına nisbeten %4 oranında bir azalma görülmüştür. En fazla artış %37 oranıyla turunçta ve en fazla azalma ise %39 oranıyla Washington çeşidi portakalda görülmüştür (TÜİK 2022).

S. citri'nin oluşturduğu hastalık 1915–1917 yılları arasında Kaliforniya'nın Redland yakınlarındaki Washington Navel portakal bahçelerinde tespit edilmiştir. Bu bahçedeki verimsiz turunçgil ağaçları, anaç üzerinden kesilerek sağlıklı gözlerle tekrar aşılandıklarında tekrar aynı belirtilerin gözlenmiştir. Bunun sonucunda Waite tarafından bu gelişme tipi 'İnatçı' anlamına gelen İngilizcede "Stubborn" olarak adlandırmıştır. Ancak bu hastalık ilk kez 1929 yılında Perry J.C. tarafından bu isimle tarif edilmiştir (Fawcett ve ark., 1944).

S. citri ile infekteli turunçgil ağaçlarının genellikle hafif ve şiddetli derecede sürgün oluşturduğu, boğum aralarının kısaldığı ve çok sayıda yan gözler oluşturduğu, oluşan sürgünlerin belirgin bir şekilde yukarı doğru (rozetleşme) olduğu görülmüştür (Calavan, 1966).

İnfekteli ağaçların yaprak uçlarında beneklenmeler, kaşık şeklinde yaprak oluşumu, yapraklarda mikroelement (özellikle Zn) eksikliğine benzeyen değişiklikler, vaktinden önce yaprak dökülmeleri, sürgünlerde geriye doğru ölüm ve bitki boyunda kısaltmalar görülmüştür (Calavan, 1968).

İnfekteli turunçgil ağaçlarında mevsim dışı çiçeklenmeler, şiddetli derecede deforme olmuş ve palamut şeklini almış ekseni çarpık meyveler olduğu tesbit edilmiştir. *S. citri* ile bulaşık meyvelerin tadı yavan, ekşi veya anormal derecede acı olup düşük kaliteye sahip olmuştur. Hastalık portakal (*Citrus sinensis*) çeşitlerinde ve en fazla Washington Navel'de zarar yapmakta, ayrıca mandarin (*C. reticula*) ve altıntop (*C. paradisi*), turunç, şadok ve kamkatlarda da görülmüştür (Cengiz, 1965).

Navel cinsi portakal ağaçlarında hastalık meyve göbeğinin kaybolmasına ve meyve renginin normalden açık sarı veya sapa yakın kısmının diğer kısma göre daha yeşil renkte olmasına neden olmuştur. Bu tür meyvelerde abortif tohum oluşumu görülmüştür (Childs ve Carpenter, 1961).

S. citri, indikatör bitkilere inokulasyon yoluyla tespit edilebilir; en uygun olanı gündüzleri 32°C, geceleri ise 27°C sıcaklıkta tutulan Madame Vinous portakal çeşididir (Bové, 1988). Diğer indikatör çeşitler arasında Marsh greyfurt çeşidi ve Sexton tangelo çeşidi bulunmaktadır. En iyi inokulum, orta damar içeren genç yaprak parçalarıdır. *S. citri*, belirtiler gösteren ağaçlardan oldukça güvenilir bir şekilde kültürlenir; kullanılacak en iyi materyal, tohumlar, meyve eksenin pedunküler ucu veya Ekim ayında toplanan benekli yaz yapraklarıdır (Bové et al., 1984).

Hastalık etmeni aşı materyali ve cüce ağustos böcekleri ile sağlıklı bitkilere taşınmaktadır. *Circulifer tenellus* (Baker), *Scaphytopius nitridus* (Delong), *S. acutus delongi* (Young), *Neoliturus haematoceps* (Bové, 1986) ve *C. tenellus* (Klein et al., 1988) önemli vektörleridir. Hastalık etmeni tohumla taşınmamaktadır.

Doğu Akdeniz Bölgesinde yapılan bir çalışmada, *S. citri*'nin belirtileri ve tespiti ile ilgili uygun bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ELISA ve jel elektroforez yöntemleri kullanılmıştır. Bunun sonucunda, Washington Navel izolatının (SPT-WN) ve İsrail izolatının (SPA) seyreltme son noktalarının sırasıyla 1:10240 ve 1:2560 olduğu belirlenmiştir. Büyüme inhibisyonu testi, homolog antiserum için 10 mm ve SPA antiserumu için 5 mm'lik bir bölge genişliği ortaya koymuştur. Araştırmacılar, ön immünizasyon serumu ile doyurulmuş disklerin çevresinde inhibisyon olmayan bölgelerin varlığını belirlemişlerdir. ELISA ve 1 boyutlu jel elektroforezi yöntemleri, deformasyon ve büyüme inhibisyon testleri ile elde edilen bulguları doğrulamışlardır (Çağlayan ve ark., 1970).

1976'nın sonlarında yapılan bir çalışmada, Çin lahanası ve pak-choi bitkilerinin bodur ve sararmış bitkilerinin *S. citri* ile infekte olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yabani turpgiller üzerinde yapılan bir araştırmada, organizmanın aynı zamanda pancar yaprak zararlısı *Circulifer tenellus*'un istila ettiği hardal bitkisinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum, *S. citri* ana konukçusu olarak tanımlanan birinci yabancı iki yıllık veya çok yıllık bitkinin önemli bir enfeksiyon kaynağı olduğunu kanıtlamıştır. Bunun yanında araştırmacılar, *S. citri*'nin yaprak zararlısı *Scaphytopius nitridus* tarafından Çin lahanası, Shasta papatyası, kırmızı yonca ve turplara aktarıldığını tespit etmişlerdir (Oldfield ve ark., 1977).

Osorio-Acosta (1999), yapmış olduğu bir çalışmada *S. citri*'nin 3 verim parametresi üzerine etkisini değerlendirmiştir. Çalışmayı tam 3 sene boyunca hastalığın belirtilerinin çok olduğu 12 ağaçta gözlemlenilmiştir. Greyfurttaki hastalık şiddeti, iki bahçede Düzey 0'dan 3'e kadar önemli ölçüde değiştiğini farkedilmiştir. Buna karşılık Valencia portakalının hastalık şiddetinde en düşük artışı gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma sonunda *S. citri*'nin göbek portakalının orta düzeyde Navel ve Valencia portakallarında ise yüksek düzeyde simptom gösterdiği değerlendirilmiştir.

Wang ve arkadaşları (2015), *S. citri*'nin izolasyonunun ve kültüre alınmasının zor ve zaman alıcı olduğunu belirtmişlerdir. *S. citri* genellikle düşük titrede bulunur ve turuncgillerde düzensiz dağılır, bu da güvenilir algılamayı zorlaştırır. PCR, *S. citri* tespitinde yaygın olarak kullanılırken, yeni genom dizilimi bakterinin çok sayıda profaj geni kopyasına sahip olduğunu göstermiştir. Bu

kopyaların PCR duyarlılığını artırdığı düşünülmüştür. İki primer seti, Php-orf1 ve Php-orf3, kullanılarak yapılan qPCR analizlerinde, Php-orf1'in diğer primerlere göre daha hassas olduğu bulunmuştur. Profaj primer setleri, Kaliforniya'daki turuncgil bahçelerinden alınan örneklerle doğrulanmış ve tespit duyarlılığını en az 10 kat artırdığı görülmüştür, ancak pozitif örnek tespit edilememiştir.

Maheshwari ve ark. (2017), tarafından yapılan çalışma turuncgil inatçı hastalığının (CSD) etkeni olan *S. citri*'yi kantitatif olarak tespit etmek amacıyla ddPCR'nin uygulanabilirliğini değerlendirmiştir. Turuncgil dokularında *S. citri* tespitini değerlendirmek için ddPCR ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, housekeeper geni spiralin ve çok kopyalı bir profaj geni olan SpV1 ORF1'e dayanan iki primer seti, SP1 ve SPV1 ORF1, kullanılmıştır. On kat seyreltme serilerindeki standart eğri analizleri, hem ddPCR hem de qPCR'nin iyi doğrusalılık ve verimlilik sergilediğini ortaya koymuştur. Ancak, ddPCR'nin qPCR'ye göre on kat daha fazla duyarlılığa sahip olduğu ve spiralin geninin tek kopyasını bile doğru bir şekilde ölçebildiği belirlenmiştir. Alıcı çalışma karakteristik (ROC) analizi, ddPCR metodolojisinin CSD tanısı için daha güvenilir olduğunu ve eğri altındaki alanın qPCR'ye kıyasla anlamlı derecede daha geniş olduğunu göstermiştir. Alan örnekleri, ddPCR'nin etkinliğini doğrulamak için kullanılmış ve daha yüksek bir patojen titresini nedeniyle meyve kolumellasındaki *S. citri* enfeksiyonunu saptamada qPCR'a eşit veya ondan daha iyi olduğu görülmüştür. ddPCR tahlili, qPCR'ye kıyasla hem *S. citri* spiralinini hem de SPV1 ORF1 hedeflerini kantitatif olarak yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit etmiştir. ddPCR'nin, her iki hedef için de oldukça tekrarlanabilir sonuçlar verdiği ve turuncgil dokusu ekstraktındaki PCR inhibitörlerine karşı qPCR'den daha yüksek direnç gösterdiği bulunmuştur.

Mello ve ark. (2010), bakteri dağılımını değerlendirmek için Kaliforniya'da yapmış oldukları çalışmada *S. citri*'nin pozitif olduğu bilinen ağaçlardan örnekler almıştır. Farklı yönde örneklerde ölçme işlemleri gerçekleştirilmiştir, *S. citri* ile pozitif ağaçlardan elde edilen meyveler, sağlıklı ağaçlara kıyasla daha küçük ve çoğunlukla şeklinin bozuk olduğunu gözlemlemişlerdir. *S. citri* ile infekteli ağaçlarda meyve sayısında önemli bir azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda *S. citri*'nin Kaliforniya'da üretime ve pazarlamaya ciddi bir endişe yaratabileceğini kanıtlamışlardır.

Shi ve ark. (2014), *S. citri*'nin tespiti için bir dizi çalışma yürütmüş ve bu çalışmalar sırasında *S. citri* tarafından salgılanan bir protein kullanmışlardır. Mikrobiyal patojenlerin, enfeksiyon sırasında infekte olmuş bitkilerde vasküler akışla sistemik olarak potansiyel olarak dağılabilen çeşitli proteinler salgıladıklarını ve bu nedenle de bu proteinlerin dağılımlarının patojen enfeksiyon bölgeleriyle sınırlı olmadığını ve enfeksiyon için biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. *S. citri* tarafından salgılanan bu proteinin turuncgil floem ekstraktı varlığında yüksek düzeyde eksprese edilebilen bir protein olduğu tespit edilmiş ve bu çalışmada kütle spektrometresi kullanılmıştır. *S. citri* ile infekte olmuş turuncgil ve cezayir menekşesinin (*Vinca spp.*) sağlıklı bitkilerden ayırt edilebilmesi için bu proteine karşı ScCCPP1 antikoru üretilmiştir. Bu antiserumun,

S. citri tespitinde özel laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duyulmadan doku baskısı analizi yapılmasında kullanılabildiği ve saha araştırmaları için uygun olduğu belirtilmiştir. Çalışma, patojen tarafından salgılanan proteinin turuncgil bakteriyel hastalığının teşhisi yönünde bir belirteç (indikatör) olarak kullanılmasını ve diğer bitki hastalıklarına da uygulanabileceğini ortaya koyulmuştur.

Abd El-Fatah ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada Mısır'da bulunan bahçelerde farklı çeşit mandarin ve portakallarda *S. citri*'yi tesbit etmişlerdir. Bahçeden alınan örneklerden belirlenen *S. citri*, yapay C-3G sıvı ortamında kültüre alınmış ve bunun sonucunda ortam sıvısının kırmızıdan sarıya dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. *S. citri*, düşük agarlı ortamda geliştiğinde, *S. citri* hücrelerinin agar matrisi boyunca hareket etme kabiliyeti nedeniyle ara sıra çevreleyen uydu kolonilerle birlikte kızarmış yumurta gibi bulanık koloniler oluşturmuştur. Simptomatik örneklerden ekstrakte edilen DNA, PCR ile *Spiralin-f/Spiralin-r* primer çifti kullanılarak 675 bp'lik ürünlerin amplifikasyonu için şablon olarak kullanmışlardır. Ayrıca *Spiralin* geni klonlanmış, dizilenmiş ve elde edilen izolat, Qualubia izolatı (AM157771), Mısır'dan Fewa izolatı (AM157770), İran'dan SPF1 izolatı (KT834818) ve Fransa'dan (U13996) izolatı ile yakın ilişkiyi gösteren dizi analizi ile moleküler olarak karakterize etmişlerdir.

Drais ve ark. (2018), yaptıkları araştırmada, *S. citri*'nin arazi tespiti için yeni araçlar geliştirmişlerdir. İlk olarak, taze kesilmiş doku yüzeyinden protein antijenlerinin nitroselüloz membrana aktarılmasıyla çalışan bir yöntem olan Doğrudan Doku Blot İmmunoAssay (DTBIA) geliştirilmiştir. Bu protokol, iki sitrus koleksiyonunda yapılan saha araştırmasıyla doğrulamışlardır. Ardından, yeni keşfedilen Cezayir *S. citri* izolatının moleküler karakterizasyonu yapılmış ve böcek vektörlerinin varlığı araştırılmıştır. Ayrıca, hızlı bir tespit yöntemi olan Döngü Medyatik İzotermal Amplifikasyon (LAMP) testi geliştirilmiş ve saha koşullarında başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Son olarak, Akdeniz ve Amerikan *S. citri* izolatları arasındaki genetik çeşitlilik incelenmiştir.

Çağlar ve ark. (2020), Türkiye'de bulunan *S. citri*'nin farklı izolatlarının tespiti için bir takım çalışmalar yapılmıştır. Çalışma zamanı farklı primer çiftleri kullanılmıştır. Bu primer çiftlerinden *Spiralin-f/r* primerinden hiçbir pozitif örnek tespit edilmemiştir. Aksine P89-r/f ve P58-6f/4r primer çiftleri ile tüm örnekler pozitif sonuç vermiştir. Filogenetik ağacın oluşturulması P89-r/f primer çiftinden elde edilen ampikonun dizilenmesi zamanı gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağacın gerçekleştirilmesi sonucunda Türkiye'de bulunan *S. citri* izolatlarının Fas, Mısır ve ABD'den izole edilenlere kıyasla Meksika, İspanya, Cezayir ve İtalya'dan izole edilenlerle daha yakın ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Çağlar ve ark., 2020).

El-Banna ve ark. (2020), *S. citri*'yi, mısır, ıhlamur, limon ve volkamerin ağacından hastalık belirtilerini temsil eden ıhlamur ağaçlarından toplanan örneklerden izole etmişler. *S. citri*'nin varlığı, mavi boyalı floem olarak Dienes boyasıyla lekelenen kesitlerin incelenmesiyle kontrol edilmiştir; bu, enfekte floem dokularında *Spiroplasma*'nın varlığını göstermiştir. C3-G'ye özgü sıvı ve katı ortamda kültürlenme de gerçekleştirmişdiler. İzole edilen *Spiroplasma*, spesifik poliklonal antikorlar kullanılarak DAS-ELISA ile *S. citri* olarak tanımlanmıştır. Transmisyon elektron

mikroskobu ile *S. citri*'nin kimliği ve morfolojisi doğrulanmıştır. Arkadaş hücrelerdeki nükleollerin hasar görmesi de *S. citri* enfeksiyonunun bir etkisi olarak gösterilmiştir. *S. citri* sıvı kültüründen gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu, Php-orf1 primer çifti kullanılarak diferansiyel spesifiklik göstermişti. Toplam DNA, beş taze örnekten başarıyla izole edilmiş ve Spiralın, P58 ve P89 primer çiftleri kullanılarak geleneksel PCR için şablon olarak kullanılmışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada, Fas'ta turunçgil bahçelerinde *S. citri*'nin rutin teşhisi için serolojik ve moleküler yöntemlerin doğrulanması amaçlanmıştır. Fas'ın turunçgil yetiştirilen ana bölgelerde *S. citri* enfeksiyonlarının mevcut durumunu güncellemek için bir araştırma yapılmıştır. Bu kapsamda, 2020 ve 2021 yıllarında toplam 23 turunçgil bahçesinden, *S. citri* enfeksiyonuna bağlı belirtiler gösteren 575 yaprak örneği toplanmıştır. Tüm örneklerde *S. citri* varlığı, çift antikorlu sandviç enzime bağlı immünosorbent analizi (DAS-ELISA) yöntemi ile test edilmiştir. Bu test sonucunda, 57 örnekte *S. citri* enfeksiyonu tespit edilmiş, 41 örnek şüpheli bulunmuş ve geri kalan örnekler negatif çıkmıştır. DAS-ELISA testinin sonuçlarını doğrulamak için 148 numune, üç farklı geni (varsayılan yapışma benzeri gen P58, varsayılan yapışma gen P89 ve spiralın geni) hedefleyen spesifik primer çiftleri kullanılarak, geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile ek moleküler testlere tabi tutulmuştur. Primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucunda, bitki dokusunda farklı özgüllük derecelerinde *S. citri* tespit edilmiştir. Sonuçlar, Fas turunçgil bahçelerinde *S. citri* yoğunluğunun %6,5 ile %78 arasında değiştiğini göstermiştir. Moleküler testler, özellikle varsayılan yapışma benzeri gen P58'i hedefleyen gerçek zamanlı PCR testleri, doğru teşhis için en hassas yöntemler olarak öne çıkmıştır. Gerçek zamanlı PCR, P58 genini hedefleyen primerlerle, pozitif ve şüpheli ELISA örneklerinin yanı sıra bazı negatif örneklerde de pozitif sonuçlar vermiştir. Bu, gerçek zamanlı PCR'nin yüksek duyarlılığını ve doğruluğunu kanıtlamıştır (Sagouti ve ark., 2023).

S. citri ile ilgili sınırlı sekans verisi nedeniyle, bakteri Fresno County, CA'daki bir çiftlikte yetiştirilen doğal olarak infekte olmuş Çin lahanasından izole edilmiştir. *S. citri* CC-2'den elde edilen DNA, LD8'deki saf bir kültürden çıkarılmış ve PacBio dizilemesine tabi tutulmuştur. Tek bir 1.709.192 bp dairesel kromozom ve 40.210, 39.313 ve 2.921 bp boyutlarında üç plazmid ile dört contig elde edilmiştir. Burada geliştirilen genom, *S. citri*'nin sekans veritabanını genişletmiştir ve Kaliforniyada *S. citri*'nin ilk tüm genom sekans kaydını oluşturmuştur (Yakomi ve ark., 2020).

İftikhar ve ark., (2020), yaptıkları çalışmada, patojenin Sp4 besiyeri ile teşhis edilmesi amacıyla *S. citri* infekteli yapraklardan ve meyvenin kolumella kısmından izole edilmiştir. Kültür ortamı 30°C'de inkübe edilmiştir. 7-14 gün inkübe edildikten sonra ortamın rengi kırmızıdan sarıya dönmüş ve bu, *S. citri*'nin başlangıçtaki varlığını göstermiştir. Tipik olarak katı besiyerinde kızarmış yumurta şeklinde koloni gözlenilmiştir. *S. citri*'nin moleküler tespiti için yaprak örneğinden DNA ekstrakte edilmiştir. *S. citri* spesifik Spiraline-f ve spiraline-r primer çifti, spiralın geninin 675 bp'lik bir ürünle amplifikasyonu için kullanılmıştır. Patojenite testi yapılmıştır. Başarılı aşılamanın ardından hastalığın varlığını doğrulayan belirtiler gözlemlenilmiştir. Ayrıca, inatçı turunçgillerin

tespiti, *Sargodha*'nın turunçgil bahçelerinde *S. citri*'nin ortamda biyolojik ve moleküler olarak ilk kez tanımlanmasına yol açtığını belirlemişlerdir.

Ceyran (2021), tarafından Adana'nın Kozan, Yüreğir ve Karataş ilçeleri ile Mersin'in Tarsus ilçesi ve Hatay'ın Erzin ilçesinde yetiştirilen Washington Navel, Valencia portakalı ve Satsuma mandarin bahçelerinde görülen *S. citri*'ye ev sahipliği yapan yabancı ot ve turunçgil örneklerinin PCR testi ile belirlenmesi ve izolatların moleküler benzerlik oranlarının incelenmesi yönünde bir çalışma yapılmıştır. Toplamda 45 örnek toplanmış olup, bunların 20'si yabancı ot, 25'si ise turunçgil yaprağı ve meyve örneklerinden oluşmuştur. PCR testi uygulanarak örneklerin moleküler karakterizasyonu belirlenmiştir ve P89-r/f primeri kullanılmıştır. 45 örnekten 18'i pozitif sonuç vermiştir. Yabancı ot örnekleri arasında *Portulaca oleracea*, *Euphorbia prostrata*, *Dinebra retroflexa*, *Mercurialis annua*, *Conyza canadensis*, *Solanum nigrum* pozitif sonuçlar vermiştir. Örneklerin moleküler karakterizasyonunu belirlemek için her bölgeden birer olmak üzere toplam 4 örnek diziye gönderilmiş ve incelenen izolatlar Türk ve yabancı izolatlarla %96 ile %100 benzerlik göstermiştir.

Ateş (2021) göbekli portakallarda sorun oluşturan *S. citri*'nin *Neoliturus haematoceps*'e bağlı olarak yayılması incelenmiştir. Adana ili Kozan ilçesindeki Washington Navel portakal bahçelerinde yapılan araştırmada, *S. citri* enfeksiyon oranları farklı kültürel işlemlere göre karşılaştırılmıştır. Yabancı otların PCR ile test edilmesi sonucunda bazı türlerin(*Convolvulus arvensis*, *Taraxacum officinale*, *Sorghum halepense*, *Cynodon dactylon*, *Conyza canadensis*, *Amaranthus viridis*, *Chenopodium album*, *Paspalum dilatatum*, *Euphorbia heterophylla*, *Solanum nigrum*, *Mercurialis annua*, *Fumaria officinalis*) *S. citri* ile bulaşıklığı belirlemiş, ayrıca, *N.haematoceps* bireyleri ve simptom gösteren meyvelerin PCR ile test edilmesiyle de *S. citri* bulaşıcılığına dair pozitif sonuçlar elde etmiştir.

Yapılmış başka bir çalışma da *S. citri*'nin Malezya turunçgil bitkilerinde bulunup bulunmadığını belirlemek ve patojenin tespitine yönelik moleküler bir yöntem oluşturmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. CTAB DNA ekstraksiyon protokolleri kullanılarak turunçgil bitkisinden TNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Sonuç, turunçgil bitkisi örneğinin *S. citri* patojeninden arınmış olduğunu gösterilmiştir. Örnekte bant uzunluğunun bulunmaması, ekstraksiyon işlemi sırasında uzun süre nedeniyle örnek DNA'nın denatüre olmuş olabileceği gösterilmiştir. Jel elektroforezinden elde edilen sonuç, altı kopyanın tümünde marköre karşılık gelen görünür bir bant göstermediği, dolayısıyla PCR performansının zayıf veya başarısız olduğu gösterilmiştir (Hasan ve ark., 2022).

S. citri'yi tanımlamak için çeşitli moleküler ve biyokimyasal testler yapılmıştır. İn vitro koşullar altında *S. citri*, kızarmış yumurta benzeri şekilli bir koloninin gözlemlendiği SP4 besiyerinde büyüdüğünü ve hastalığın önemini koruyan mevcut kısa notta simptomoloji, tespit, bulaşma ve yönetimi kısaca anlatılmıştır (Kiptoo ve ark., 2021).

Yedi *S. citri* izolat genomunun, 1,58 Mbp ile 1,74 Mbp arasında değişen tek bir dairesel kromozom ve 1597-2232 protein kodlayan gen içerdiği bulunmuştur. Bu izolatlar, yaprak zararlısı

aktarımla ilişkili GII3-3X izolatından pSci6'ya benzer bir plazmide sahip olduğu belirlenmiştir. *S. citri* genomlarında bulunan profaj dizileri, konakçı aralığının genişletilmesine katkıda bulunabildiğini göstermişlerdir. Bu bulgular *S. citri*'nin genetik çeşitliliğine ilişkinliğini belirlenmiştir (Rattner ve ark., 2021).

Sagouti ve ark. (2022), infekte olmuş yabancı otlar, turuncgillere bulaşmanın ana kaynağı olduğunu ve infekteli turuncgillerden turuncgillere bulaşmanın yalnızca küçük bir yüzdesi olduğunu söylemişlerdir. Floemle beslenen birkaç yaprak zararlısı türü (Cicadellidae, Hemiptera), *S. citri*'nin kalıcı ve çoğaltıcı bir şekilde doğal yayılmasını desteklediğini ve yeni meyve bahçesi dikimlerinde ve tomurcuk sertifikasyonunda *S. citri* içermeyen tomurcuklar kullanıldığını, indeksleme çalışmaları başlatıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, *S. citri*'yi sınırlamak amacıyla yeni tanımlanan türler için bir karantina sistemi uygulamışlardır. Dünya çapında *S. citri* ile ilgili mevcut bilgi durumu bu genel bakışta özetlenmiştir; burada en iyi uygulamaların benimsenmesi yoluyla hastalığın yayılmasını önlemek veya sınırlamak için *S. citri* tespiti, karakterizasyonu, kontrolü ve yok edilmesindeki son gelişmeler vurgulanmıştır.

Benazzouz ve ark. (2023), tarafından farklı bir çalışma daha Cezayirde yapılmıştır. Cezayirde yapılan bu çalışmanın amacı *S. citri* izolatlarının varlığını tesbit etmiştir. Örnekler belirtilerin daha keskin gösterdiği yaprak ve meyvelerden alınmıştır. *S. citri*'nin tanımlanması için ELISA ve PCR testleri yapılmıştır. Simptomatik örneklerden ekstrakte edilen DNA, PCR ile Spiralini (Sc1 / Sc1-) ve (SpiF / SpiR) primer çiftleri kullanılarak 675 bp'lik ürünlerin amplifikasyonu için şablon olarak kullanmış olup, ayrıca spiralini geni klonlanmış ve dizilenmiştir. Kesin inatçı belirtiler gösteren numunelerin yaklaşık %18,23'ü ELISA pozitif olduğu belirlenmiştir. Dizi analiziyle moleküler karakterizasyon, aralarında %99 homoloji bulunan iki Cezayir izolatını tanımlanmıştır. *S. citri* İzolatı 12 (OQ078580) ve *S. citri* izolatı 14 (OQ068387) filogenetik ağaç, Cezayir *S. citri* izolatlarının İran ve Corse'den izole edilenlere göre Mısır ve İsrail ile daha yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Fasta bulunan turuncgil bahçelerinde serolojik ve moleküler yöntemleri doğrulamak için *S. citri*'nin teşhisi yönünde bir takım çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın yürütülmesi için 2020 ve 2021 yıllarında turuncgil bahçelerinden toplam 575 yaprak örneği alınmıştır. Tüm numuneler çift antikorlu sandviç enzim bağlantılı immünosorbent (DAS-ELISA) tahlili kullanılarak yapılmıştır. Yapılmış tahliller sonucunda 57 örnek pozitif, 41 örnek şüpheli ve geri kalan örnekler ise negatif olarak belirlenmiştir. Testin sonuçlarını doğrulamak için yeniden 148 örnek götürülerek geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) kullanılarak moleküler testler yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada kullanılan örneklerin %6,5 ile %78 pozitif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak Fas'ta bulunan turuncgil bahçelerinin *S. citri* ile infekteli olduğu ve pozitiflik yönünde *S. citri* için en duyarlı genin P58 olduğu belirlenmiştir (Sagouti ve ark., 2023).

McNeil ve ark. (2023), yapmış oldukları çalışmada, genç Washington navel portakallarını (*Citrus sinensis*), *S. citri* ile infekteli olduğu teyit edilen ağaçlardan elde edilen tomurcuklarla

aşlamıştır. Yaprak örnekleri metabolomik ve diferansiyel gen ekspresyonu analizleri için 10 ay boyunca aylık olarak toplanmıştır. Deney boyunca kontrol ve *S. citri* ile infekte ağaçlar arasında metabolitlerin konsantrasyonunda ve ifade edilen genlerde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Jasmonik asit sinyali, hücre duvarı modifikasyonu, amino asit biyosentezi ve antioksidan ve antimikrobiyal ikincil metabolitlerin üretimi dahil olmak üzere önemli savunma ve stres yollarıyla ilişkili metabolitler ve genler, çalışma boyunca ve hatta symptom gelişiminden önce *S. citri* tarafından etkilenmiştir.

Yapılmış başka bir çalışmada, *S. citri*'nin sadece turunçgil bitkilerini değil, aynı zamanda süs bitkilerini, havuç, turp gibi tek yıllık bitkileri ve yabancı otları da infekte ettiği bulunmuştur (Yokomi ve ark., 2020). *S. citri*'nin yaprak pireleri tarafından taşınan bir patojen olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu hastalık etmeninin ana konukçularının dışında yabani turpta kök çürüklüğüne neden olduğu (Fletcher, 1986) ve havuçta mor yaprak hastalığına yol açtığı gibi ekonomik açıdan önemli birçok bitki hastalığına sebep olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2006). *S. citri*'yi tespit etmek için en etkili araç olarak, spiralın genini hedefleyen PCR tespiti kabul edilmiştir (Lee ve ark., 2006; Yokomi ve ark., 2008).

Turunçgil yediverenleşme hastalığının (CSD) epidemiyolojik çalışmaları ve yönetim stratejileri için *S. citri*'nin tespiti için geliştirilen qPCR yöntemi, P58 varsayılan adezin geninden türetilen özgün primer çifti ve SYBR Green floresan bağlayıcı kullanılarak optimize edilmiştir. Bu yöntem, *S. citri*'nin BR3-3X suşundan elde edilen amplikonların sekans analiziyle doğrulanmış ve yüksek duyarlılık göstermiştir (8×10^{-5} ile 1.2×10^{-6} ng *S. citri* DNA'sı tahmini). Gerçek zamanlı PCR ile yapılan analizler, meyve kolumellasında yaprak orta şeritlerine göre daha yüksek *S. citri* titresi olduğunu ortaya koymuştur, bu da eski doku örneklerinin tercih edilen materyal olduğunu göstermiştir. İki orta Kaliforniya ilçesinde beş farklı test alanında gerçekleştirilen çalışmalar, CSD yoğunluğunun (%58.9, %4.2, %0, %13.4 ve %28.6) değişkenlik gösterdiğini ve bu yöntemin hastalık insidansının değerlendirilmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Yakomi ve ark., 2010).

Yakomi ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada genç turunçgillerde *S. citri*'nin tespiti için geliştirilen PCR yöntemlerinin önemini vurgulamıştır. *S. citri*'nin turunçgil fidanlığı endüstrisindeki varlığını belgelemek amacıyla kullanılan PCR yöntemleri, özellikle uzun latent periyot ve düşük patojen titresi gibi zorluklarla karşılaşmıştır. CCNB tarafından desteklenen bir proje kapsamında, Madam Vinous fidanlarında aşılı seralarda ve eleklerde *S. citri*'nin tespiti için gerçek zamanlı kantitatif (q) PCR kullanılmıştır. Aşılamadan sonra 33 gün içinde qPCR ile *S. citri* DNA'sı tespit edilirken, yetiştirme yöntemi ile bu sürenin minimum 42 gün olduğu belirlenmiştir. qPCR'ın ekonomik ve kullanıcı dostu olması, geleneksel PCR yöntemlerine tercih edilmesini sağlamıştır. Ayrıca, çalışma sonuçları göstermiştir ki, qPCR yöntemi tarla ağaçlarından alınan columella ve yaprak orta damarı gibi örneklerde *S. citri*'nin daha yüksek titresini istatistiksel olarak belirleyebilmektedir ($P < 0.001$). Bu bulgular, turunçgil fidanlıklarında *S. citri* enfeksiyonunun etkili

bir şekilde tespit edilebileceğini ve qPCR'nin patojeni belirlemek için güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur.

ICRSV kılıf protein geninin 164 bp'lik bir bölgesini hedef alan yeni tasarlanmış primerler, ICRSV'nin tespiti için bir SYBR Green bazlı kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) tahlilini geliştirmiş ve optimize edilmesi için bir çalışma yapılmıştır. RT-qPCR tahlili, tarama evinde tutulan ICRSV ile enfekte olmuş bitkilerden ve saha örneklerinden ekstrakte edilen viral RNA kullanılarak değerlendirilmiş ve doğrulanmıştır. Standart eğriler, 9.48.1 fmol (5.709×10^9) ile 0.000948 amol (5.709×10^2) arasında değişen sekiz log ICRSV-cRNA kopya numarası biriminde dinamik bir doğrusal aralık sergilemiştir; seri kullanılarak reaksiyon başına 5.709×10^2 kopya tespit sınırı belirlenmiştir. On kat seyreltilmiş in vitro kopyalanmış viral cRNA kullanılarak geliştirilen RT-qPCR, ICRSV'ye oldukça spesifiktir ve diğer turuncgil patojenlerine tepki vermemiştir. Ayrıca, geleneksel RT-PCR yöntemlerine göre yaklaşık 100 kat daha duyarlıdır. Bu nedenle, bu test yöntemi, bitki karantina istasyonlarında, turuncgil aşısı gözü sertifikasyon programlarında, laboratuvarlarda, KVK'larda ve fidanlıklarda kullanılabilir. Bu çalışma, ICRSV'nin RT-qPCR ile başarılı bir şekilde tespit edildiği ilk akademik çalışma olmuştur (Kokane ve ark., 2021).



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Alanı

Bu çalışma Adana ili Kozan ve Yüreğir; Mersin ili Tarsus ilçesi; Hatay ili Erzin ilçesinde yetiştiriciliği yapılan, Washington navel ve Satsuma mandarin bahçelerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada esnasında kullanılan örnekler, daha önce hastalığın tespit edildiği bahçelerden seçilmiştir.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Bitkisel Materyal

Örneklerin toplanması için 2022-2023 yıllarında Eylül-Ekim ayları arasındaki dönemde turunçgil ağaçlarının hastalık belirtilerini en iyi şekilde gözlemleyebildiğimiz zaman dilimlerinde bahçeler ziyaret edilmiştir. Adana'nın Kozan ve Yüreğir ilçelerinde, Mersin'in Tarsus ilçesinde ve Hatay'ın Erzin ilçesinde bulunan portakal ve mandarin ağacının yetiştirildiği alanlardaki bahçeler gezilerek hastalık belirtileri gösteren ağaçlardan meyve örnekleri alınmıştır.

Toplanan örnekler, tarih ve koordinat bilgilerini içeren kağıtlarla birlikte farklı plastik poşetlere konularak içinde buz bulunan buzluğa yerleştirilmiştir. Daha sonra, bu örnekler Çukurova Üniversitesi Turunçgil Virüsleri Laboratuvarına getirilmiş ve çalışma çalışma yapılincaya kadar +4 °C'deki buzdolabına veya -20°C'deki derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Çalışma için seçilen örnekler, sıvı azotta ezilerek hassas terazide 200-250 mg olacak şekilde tartılmış ve ekstraksiyon çalışması için hazır hale getirilmiştir. Ardından, moleküler çalışmalar için Turunçgil Virüsleri Laboratuvarında -20 °C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

Adana ili Kozan ilçesinden 10 örnek, Yüreğir ilçesinden 2 örnek. Mersin ili Tarsus ilçesinden 11 örnek ve Hatay ili Erzin ilçesinde ise 2 örnek olmak üzere toplam 25 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada örnekleme yapılan bölgeler ve örnek sayıları

İL	İLÇE	ÖRNEK NUMARASI
Adana	Kozan	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
	Yüreğir	11
		12
Mersin	Tarsus	13
		14
		15
		16
		17
		18
		19
		20
		21
		22
		23
Hatay	Erzin	24
		25
TOPLAM		25

3.1.3. Ekstraksiyon İçin Kullanılan Materyaller

Örneklerin ekstraksiyonu CTAB ekstraksiyon tamponu (PVP-40, Tris HCl, EDTA, NaCl, β-Mercaptoetanol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

Ekstraksiyon işlemi için kimyasal olarak; %2'lik CTAB tamponu, İzamil alkol (24:1), %2'lik hipoklorit, %100'lük izopropanol, %70'lik etil alkol, pH 8 olan TAE tamponu (Ek 2) ve saf su kullanılmıştır.

Gerekli malzemeler arasında; 1,5 ml ve 2 ml eppendorf tüpleri, makas, havan ve dövücüler, pipet ve pipet uçları, bulunmaktadır.

Kullanılan cihazlar arasında; Weightlab Instruments WN-CM15® mikrosantrifüj, Basic® laboratuvar analitik terazi, Scilogex MX-S® vorteks, Kotterman® su banyosu, Eppendorf® spektrofotometre ve otoklav yer almaktadır.

3.1.4. PCR Analizi İçin Kullanılan Materyaller

PCR analizi için Yokomi ve diğerleri (2008) tarafından yapılan çalışmada, Spiroplasmaların moleküler teşhisi için P89 primerleri kullanılmıştır. Kullanılan diğer malzemeler arasında ddH₂O, GoTaq Hot start mix (GoTaq Polimeraz, dNTP'ler ve MgCl₂++), Progema® ve reaksiyon tamponları, pipetler, pipet uçları ve PCR eppendorf tüpleri bulunmaktadır. Çalışmada Weightlab Instruments WN-CM15® mikrosantrifüj, Basic® laboratuvar analitik terazi, Scilogex MX-S® vorteks, Eppendorf® spektrofotometre ve TA-Technogene® PCR cihazları kullanılmıştır.

PCR reaksiyonları için, 1x GoTaq tamponu, 8,5 µl H₂O, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 12,5 µl GoTaq Polimerazı ve 2,0 µl DNA olmak üzere toplam 25,0 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. PCR’da kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasallar	Konsantrasyonlar
Go Taq hot start mix	12,5 µl
Primer F	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
Saf su	8.5 µl
TNA	2,0 µl
Toplam	25.0 µl

3.1.5. Elektroforez İçin Kullanılan Materyaller

Elektroforez çalışmalarında, PCR çalışmasından elde edilen ürünler için %1,8 Agaroz, Ethidium bromid, markörler, yükleme boyası, 1X TAE tamponu, pipetler ve pipet uçları ile birlikte Biorad® elektroforez tankı kullanılmıştır. Agaroz jelde oluşan bantların görüntülenmesi için kamera ve UV görüntüleme cihazı kullanılmıştır.

Toplam 25 örnek her biri sırasıyla jel elektroforezde yürütülmüştür. Örnekler jelde yerleştirildiği zaman öncesinde markör daha sonra örnekler en sonda ise kontrol amaçla negatif örnek koyularak yürütülme işlemi başlatılmıştır.

3.1.6. qPCR İçin Kullanılan Materyaller

Bu aşamada SYBR Green mix, ddH₂O, primer P58-3f/P58-4r, P58-1f/P58-2r primer çiftleri ve DNA kullanılarak Roche Light Cycler 480 II marka cihazda qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan diğer malzemeler arasında pipetler, pipet uçları ve PCR eppendorf tüpleri de yer almaktadır. Hazırlanan her bir örneğe Çizelge 3.6.’teki PCR basamakları uygulanmıştır.

PCR reaksiyonları için 11 µl SYBR Green mix, 11 µl ddH₂O, 0.5 µl P58-3f/4r, 0.5 µl P58-3f/P58-4r primerleri ve 2 µl DNA olmak üzere toplam 25 µl reaksiyon karışımı hazırlanmış, ayrıca 0,05 rox solüsyonu ilave edilmiştir (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. qPCR’da kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasallar	Konsantrasyonlar
Sybrgreen mix	11 µl
Primer P58-3f	0.5 µl
Primer P58-3r	0.5 µl
Saf su	11 µl
TNA	2 µl
Rox solüsyonu	0,05 µl
Toplam	25.05 µl

3.2. Metod

Çalışmada kullanılan örnekler önceden belirlenen arazilerde bulunan portakal bahçelerinden toplanmıştır.

Örneklerin alındığı bahçelerde, simptomolojik olarak öncelikle ağacın bodur görünümü, kaşık şeklini almış yapraklar, çinko noksanlığı belirtisine benzer yapraklardaki sarı lekeler, yaprakların internodlarında kısılma ve buna bağlı çalılışma, ağaç üzerinde aynı zamanda irili ufaklı farklı dönemlerde meyveler, yeni sürgünler ve çiçek oluşumu, meyvelerde eksen kayması, yeni sürgünlerin yukarı doğru büyümesi şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir. Toplanan örnekler, tarih ve koordinat bilgileri ile birlikte plastik torbalara konularak buzlukta muhafaza edilmiş, daha sonra laboratuvara getirilen örnekler Turunçgil Virüsleri laboratuvarındaki +4°C buzdolabında veya -20°C derin dondurucularda muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Arazide Hastalıklı Bitkilerin Teşhisi ve Bitki Materyali Elde Edilmesi

Araştırmada kullandığımız örnekler önceden belirlediğimiz turunçgil bahçelerinden elde edilmiştir. Toplanan 25 örneğin hepsi farklı ağaçlardan ve/veya farklı bahçelerden toplanmıştır.

- ✓ Zamansız çiçek açımı
- ✓ Bodur bitki
- ✓ Küçük ve kaşık şeklini almış yapraklar
- ✓ İnternod kısılması
- ✓ Meyvede küçülmeler, palamut şeklini alma ve eksen eğikliği
- ✓ Genel olarak ağacın üst sürgünlerinin boğum araları kıaldığı için çalılışma görünümü gibi hastalık belirtileri aranmıştır.

3.2.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.3. Total DNA Ekstraksiyon Yöntemi

Stubborn hastalık belirtileri gösteren bitkilerin sadece meyve kolumellası çalışmada kullanılmış ve bu kolumellalar sıvı azot kullanılarak ezilmiştir. Ezilen kolumella dokuları, moleküler çalışmalar için hazır hale getirilmek üzere 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine 200-250 mg arasında tartılarak konulmuştur.

Ekstraksiyon yöntemi olarak Dr. Öğr. Üyesi Orhan Bozan'ın Li ve ark. (2008)'den modifiye ettiği ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Ek 3).

3.2.4. Primerler

Yokomi ve ark.'larının (2008) çalışmasında önerdikleri P89 primeri çiftleri, Spiroplazmaların moleküler teşhisinde kullanılmıştır. Bu primerler, spiralın geninden elde edilen bir DNA parçasıdır ve aynı zamanda *S. citri* genomunda bulunduğu varsayılan adenin protein gen bölgesini tanıyan bir genidir. qPCR çalışmasında kullanılan 2 primer çifti (P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r) Yokomi (2008) tarafından dizayn ve tavsiye edilen ve bir çok *S. citri* çalışmasında kullanılan primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan primerler;

Primer	Hedef Gen	Primer dizilimi	Boyut
P89-f P89-r	Varsayılan P89 adezin geni	ATTGACTCAACAAACGGGATAA CGGCGTTTGTAAATTTTGGTA	707 bp
P58-3f P58-4r	Varsayılan P58 adezin benzeri gen	GTCCCTAATGCACCGTGAAAA	119 bp
P58-1f P58-2r	Varsayılan P58 adezin benzeri gen	TTCGCTCGCATAAGTATCATATCTTC	86 bp

3.2.5. Spiroplazma DNA'sının Klasik PCR ile çoğaltılması

P89-f/P89-r primer çifti kullanılarak yapılan PCR çalışmasında DNA amplifikasyon parametreleri aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.5.). Başlangıç denatürasyonu 95°C'de 3 dakika (1 döngü), denatürasyon 95°C'de 30 saniye, replikasyon 52°C'de 30 saniye, uzatma 72°C'de 1.5 dakika, 40 döngü ve son uzatma 72°C'de 10 dakika (1 döngü).

Çizelge 3.5. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR aşamaları

Sıcaklık	Zaman	Döngüler
95 °C	3 dakika	1 döngü
95 °C 52 °C 72 °C	30 saniye 30 saniye 1 dakika	40 döngü
72°C	10 dakika	1 döngü

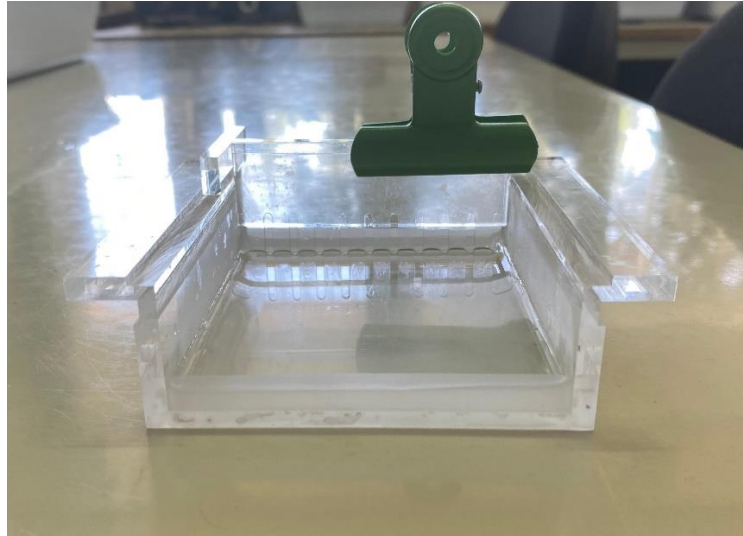
3.2.6. Elektroforez Çalışmaları

Elektroforez işlemlerinde DNA markörleri hazırlamak için markörlerden 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) kullanılmıştır.

Agar jel metodu kullanıldığında, ilk olarak 1,8 g'lık agaroz (%1,8) 50 ml TAE buffer (1x) içinde mikrodalga kullanılarak çözülmüştür. Agaroz jel karışımı jel tepsisine dökülmüş ve donması için bekletilmiştir. Jel donduktan sonra, elektroforez tankı içine yerleştirilmiş ve TAE buffer uygun bir şekilde (jel kaplanana kadar) jel tankına dökülmüştür (Şekil 3.1.).

Bundan sonra, hazırlanan markörden 10 µl PCR çalışması sonucu elde edilen ürünlerden 8 uL jeldeki oyuklara koyulmuş ve 110 volt gücü ile yaklaşık 90 dakika boyunca jel yürütülmüştür.

PCR ürünleri, jel yürütme işlemi tamamlandıktan sonra etidyum bromür içinde 10 dakika bekletilmiş, ardından UV transilluminator cihazı kullanılarak bantlar gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır



Şekil 3.1. 1.8% hazırlanmış agaroz jel

3.2.7. *Spiroplasma* DNA'sının qPCR yoluyla çoğaltılması

P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r primer çiftleri kullanılarak yapılan qPCR çalışmasında DNA amplifikasyon parametreleri aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.6.): Başlangıç olarak 5 dakika boyunca 95°C'de ve ardından 15 saniye boyunca 95°C'de ve 45 saniye boyunca 61.5°C'de 45 döngüden oluşmuştur.

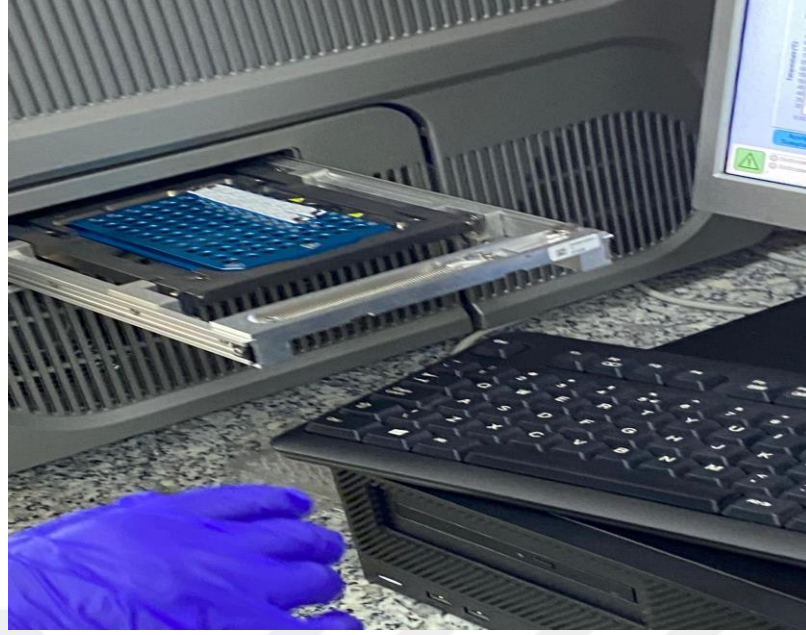
Çizelge 3.6. qPCR basamakları

Sıcaklık	Zaman	Döngüler
95 °C	5 dakika	45 döngü
95 °C	15 saniye	
61.5 °C	45 saniye	

Örnekler öncesinde pipet yardımıyla qPCR tüplerine aktarılmış (Şekil 3.2.) sonrasında yukarıda çizelgede (Çizelge 3.6.) verildiği gibi tek tek döngüler seçilmiş ve Roche LightCycler® (Şekil 3.4.) markalı cihaza yerleştirilmiştir (Şekil 3.3.)



Şekil 3.2. qPCR işleminin yapılışı



Şekil 3.3. qPCR örneklerinin cihaza yerleştirilmesi.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan Roche LightCycler® markalı qPCR cihazı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Turunçgil Yediverenleşme Hastalığı ile İnfekteli olduğu düşünülen bahçelerde gözlemlenen belirtiler

Adana'nın Kozan ve Yüreğir ilçelerinde, Mersin'in Tarsus ilçesinde ve Hatay'ın Erzin ilçesinde ziyaret edilen turunçgil bahçelerinde, ağaçların en belirgin hastalık belirtilerinin görüldüğü aylar Eylül-Ekim ayları olduğundan çalışılacak örnekler belirtilen aylarda toplanmış ve örnek numaraları ile birlikte laboratuvara getirilmiştir. İncelenen turunçgil bahçelerindeki ağaçlar genel olarak 15-20 yaşlarındaki Washington portakal ve çok azı Satsuma mandarin çeşitlerinden oluşmaktadır. Belirtiler olarak yapılan gözlem çalışmalarında Adana ili Kozan ilçesinden 10 örnek (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10), Yüreğir ilçesinden 2 örnek (11,12), Mersin ili Tarsus ilçesinden 11 örnek (13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23), Hatay ili Erzin ilçesinden ise 2 örnek (24,25) olmak üzere hastalık ile infekteli olduğu düşünülen 25 örnek toplanılmıştır. Bu örneklerden Adana ili Kozan ve Yüreğir ilçesi, Mersin ili Tarsus ilçesinden toplanan toplam 23 örnek (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) Washington Navel portakal çeşidinden ve Hatay ili Erzin ilçesinden toplanan 2 örnek (24, 25) ise Satsuma mandarin çeşidinden toplanmıştır (Çizelge 4.1.). Arazide alınan örneklerde genel olarak gözlemlenen belirtilerin başında diğer sağlıklı ağaçlarla karşılaştırıldığında bodurlaşma gelmektedir. Hastalıkla infekteli olarak düşünülen ağaçların büyük kısmında bodurlaşma ön plana çıkmaktadır (Şekil 4.1). Ağaçlarda diğer belirgin olarak görülen belirtiler olan yaprakların küçük, ovale yakın bir şekil alarak kaşık gibi çukurlaşmış ve çinko noksanlığına benzer şekilde damar aralarında sarımsı renk açılmaları gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Bilinen belirtiler olan sürgünlerin yukarı doğru yönelmesi ve ağaçlarda genel bir çalılışma gezilen bahçelerde görülen diğer belirtiler gruplarındandır (Şekil 4.3) Yine aynı ağaçlarda *S. citri*'nin en tipik belirtileri olarak bilinen zamansız çiçek oluşumu, farklı olgunlaşma evrelerinde irili ufaklı meyveler (Şekil 4.4), meyvelerin olgunlaşma evresinde meşe palamudu şeklini alması (Şekil 4.5) ve bu tür meyvelerde meyvenin sap kısmına yakın kabuğunun daha kalın olması, meyve göbeğine yakın kısımlarda ise meyve kabuğunun daha ince görüldüğü belirtiler (Şekil 4.6) gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. Bodurlaşma görülen ağaçların görünüşleri.



Şekil 4.2. Yaprakların kaşık şeklini alması simptomsu



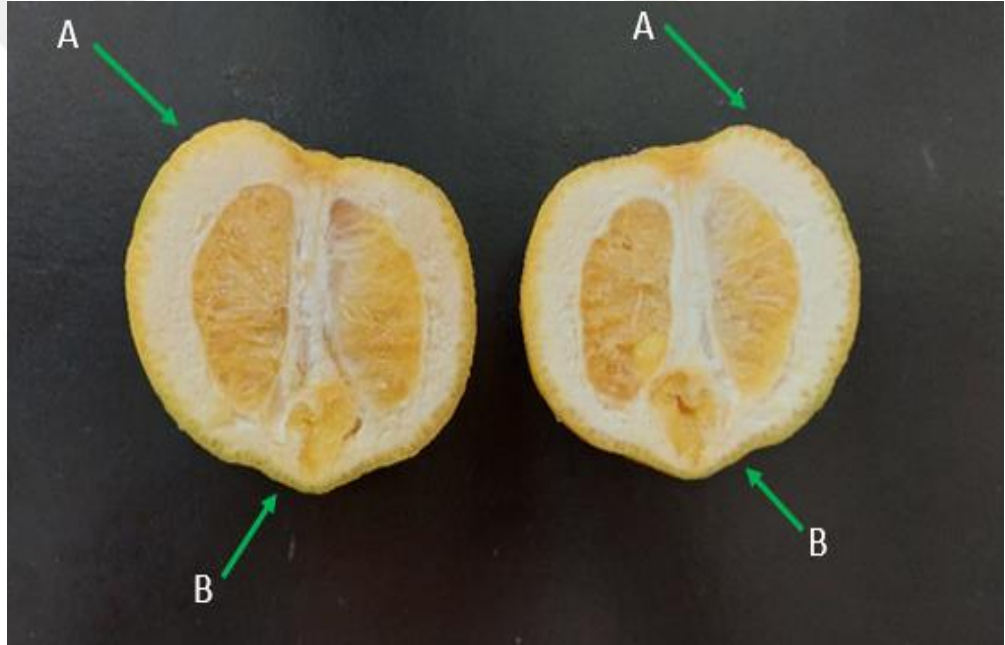
Şekil 4.3. Turunçgil Yediverenleşme hastalığının turunçgil ağaçlarında boğum aralarının kısalması, yukarı doğru büyüyen yeni sürgünler ve ağaçlarda çalılışma.



Şekil 4.4. Ağaç üzerinde irili ufaklı meyveler ve yeni sürgünleri yukarı yönelmesi.



Şekil 4.5. Meyvelerin palamut şeklini alması.



Şekil 4.6. Meyvenin sap kısmına yakın kabuğunun daha kalın (A), göbek kısmına yakın kabuğun daha ince (B) olması ve eksen kayması.

Çizelge 4.1. Örneklerin çeşit farklılıkları ve lokasyonlara göre verileri

İL	İLÇE	ÖRNEK NUMARASI	ÇEŞİT
Adana	Kozan	1	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	2	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	3	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	4	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	6	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	7	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	8	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	9	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	10	Portakal (Washington)
Adana	Kozan	11	Portakal (Washington)
Adana	Yüreğir	12	Portakal (Washington)
Adana	Yüreğir	13	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	14	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	15	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	16	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	17	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	18	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	19	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	20	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	21	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	22	Portakal (Washington)
Mersin	Tarsus	23	Portakal (Washington)
Hatay	Erzin	24	Mandarin (Satsuma)
Hatay	Erzin	25	Mandarin (Satsuma)

Yapılan farklı çalışmalar sonucunda bazı araştırmacılar tarafından hastalığın semptomları ile ilgili benzer bulgulara rastlanılmıştır. Bu bulgular aşıllı ağaçlarda daha fazla gözlemlenmiştir. Aşı yapılmış ağaçlarda genel görünüm olarak ağaçların bodur görünüm aldığı ve infekteli yaprakların normalden daha fazla küçük olduğu bildirilmiştir (Fawcett ve ark., 1944).

S. citri 'nin Akdeniz Bölgesinde yoğun bir şekilde turuncuğil üretiminin yapıldığı alanlarda meyve kalitesinde bir takım zarara neden olduğu ve *S. citri*'den etkilenen ağaçların dikey bir şekilde uzadığını, genel olarak ağaçlarda bodurlaşma oluştuğunu ve boğum aralarının kısalıp sarı renk açılması gösteren yapraklarla birlikte kloroz görünümüne sahip olan cılız yaprakların olduğunu

belirtilmiştir. Çoğu meyvenin de henüz olgunlaşma evresine gelmeden ağaç dalından kopup düştüğü ve olgunluk çağına gelmiş çok az sayıda meyvenin de görünüm olarak meşe palamudu şeklinde olduğunu gözlemlemişlerdir (Cacciola ve ark., 2017).

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan diğer çalışmalarda ağaç boylarında kısıklık, şekil bozuklukları ve meyve veriminin azalması gibi simptomların görülmesinin sebebinin muhtemelen floemde beslenen *S.citri*'nin konukçuluğunu yaptığı bitkinin karbonhidrat ve sterol kullanmasıyla ilgili olup bu enerji kaynakları için konukçularıyla rekabet ederek bazı şeker ve hormonların tükenmesine ve bazılarının birikmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Ortaya çıkan bu sonucun, turunçgil bitkisinin metabolizmasını etkileyerek yaprakta renk açılmalarına, bodurluğa, mevsim dışı çiçeklenmeye, daha küçük ve daha az meyve üretimine neden olduğu bildirilmiştir (Gaurivaud ve ark., 2000; Wei ve ark., 2006; Iftikhar ve ark., 2020).

Diğer bir çalışmada *S. citri* ile bulaşık olan ağaçlarda bulunan meyvelerin tadının ekşi, yavan ve anormal derecede acı olduğu kalitesinin düşük olduğu ve hastalığa maruz kalmış infekteli ağaçların %30-50 oranında verimde kayba neden olduğu rapor edilmiştir. *S. citri*'nin bulaştığı bitkinin bünyesinde devamlı kalıp 30-32°C olan optimum sıcaklıkta kolaylıkla gözlemlendiğini ve simptom gösterdiği saptanmıştır (Saglio ve ark., 1971).

Yapılan başka bir çalışmada simptomolojik belirtilere göz önüne alınarak ağacın yaprak, sürgün ve meyvelerinde rastlandığı bildirilmiştir. Yaprakların normal şeklinin küçülüp ovale yakın bir şekil aldığı ve bazen de kaşık gibi çukurlaştığı gözlemlenmiştir. Buna ilaveten yaprakların uç kısımlarında beneklenmeler, yaprakların damar aralarında çinko noksanlığını andıran sarımsı lekeler tespit etmişlerdir. Ağaçlarda rastladıkları diğer simptomolojik bulguların ise ağaç üzerinde mevsimsiz çiçek oluşumu, irili ufaklı meyvelerin olması, oluşmaya başlamış çiçeklerin ise çok az bir kısmının meyve vermesi ve bu meyvelerin çoğunluğunun olgunlaşmadan dökülmesi gibi bulgular olduğu bildirilmiştir (Manna ve ark., 2013).

Doğu Akdeniz bölgesinde yapılmış bir çalışmada ise *S. citri*'ye hassas olan ağaçların genç yaştaki ağaçlar olduğu ve genç yaştaki ağaçlarda yaşlı ağaçlara göre simptomolojik belirtilerin daha kolay bir şekilde gözlemlendiği saptanmıştır. *S. citri* simptomları gösteren portakal ağaçlarının bölgelere göre %21.6 ile %67.4 oranında farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Güllü, 1989).

Yokomi ve ark., (2010), qPCR yöntemi ve *spiroplasma* kültürü yöntemini kullandıkları çalışmada simptomolojik olarak hafif veya şiddetli belirtiler gösteren ağaçlardaki bakteriyel dağılımı tespit etmişlerdir. Şiddetli belirtiler gösteren ağaçlarda meyve ağırlığının, meyve büyüklüğü ve meyve sayısında azalma olduğu ifade edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen simptomolojik bulgular ile yukarıda farklı araştırmacıların elde etmiş olduğu simptomolojik bulgular karşılaştırıldığında bu çalışma ile örtüştüğü, benzeştiği görülmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen simptomolojik araştırma bulguları farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla desteklenmektedir.

4.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular

Turunçgil örneklerinden toplam DNA izolasyonu, cetyltrimethyl-ammoniumbromide (CTAB) yöntemi (Li ve ark., 2008) modifiye edilerek gerçekleştirilmiş ve bu DNA'lar, çalışmamızda PCR kalıbı olarak kullanılmıştır.

4.2.1. Klasik PCR Çalışmaları

Çalışmada yediverenleşme hastalık etmeninin moleküler olarak tanımlanması için güvenilir bir yöntem olan PCR analizi kullanılmıştır. Kullanılan örneklerin tamamı meyve kolumellası (Şekil 4.7.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda meyve kolumellası *S. citri* hastalığının belirlenmesinde en uygun doku olarak belirlendiği için çalışmada bu doku kullanılmıştır. *S. citri*'nin belirlenmesi amacıyla, Yokomi ve ark. (2008) tarafından dizayn edilen P89-f/P89-r primer çiftiyle klasik PCR analizi gerçekleştirilmiştir. PCR analizi sonucunda elde edilen görüntüler, Markör kullanılarak DNA amplifikasyon materyalinin boyutları ölçülmüş ve beklenen 707 bp boyutlarında amplifiye materyal elde edilmiştir.



Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan meyve kolumellası

P89-f/P89-r primer çiftiyle toplam 25 örnek PCR analizine tabi tutularak PCR ürünleri 10 taraklık (1 markör, 8 örnek, 1 negatif kontrol) agar jelde toplamda 4 kez yürütülerek çalışma tamamlanmıştır. Jellerin ilk tarak kuyusuna 100 bp'lik markör, yanındaki 8 kuyuya örnekler ve son kuyuya negatif kontrol yüklenmiştir. Son jelde ise ilk kuyuya markör yanına son, 25. örnek ve negatif kontrol yüklenmiştir. Çalışılan toplam 25 simptomolojik olarak infekteli olduğu düşünülen örnekten

10 adedi (1-4-5-6-7 (Adana/Kozan), 11 (Adana/Yüreğir), 14-15-16-20 (Mersin/Tarsus) numaralı örnekler) 707 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş ve bu örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2.).

Yokomi ve ark., (2008), hastalığın PCR yöntemi ile belirlenmesi için 675 bp moleküler ürünü veren spiralline-f ve spiralline-r primer çiftlerini ve 707 bp moleküler ürünü veren P89-f/ P89-r primer çiftlerini kullanmışlar ve klasik PCR için en iyi sonucun P89-f/ P89-r primer çiftleri olduğunu bildirmişlerdir. Manna ve ark. (2013), *S. citri*'nin tespiti için P89-f/ P89-r ve spiralline-f/ spiralline-r primerlerini kullanmışlardır. Spiralline primerlerinin, yaz aylarında toplanan örneklerle çalışıldığında en iyi sonucu verdiğini açıklamışlardır. Aynı zamanda yaptıkları bu çalışmada P89-f/ P89-r primer çiftlerinin, Mısır izolatlarının *S. citri* tespiti için spesifik ve etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı primerler El-Fatah ve ark., (2016) tarafından da kullanılmış P89-f/ P89-r primer çiftleri en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan P89-f/ P89-r primer çifti bir çok araştırmacı tarafından kullanılmış ve *S. citri*'nin saptanması için en iyi sonucun bu primerlerle alındığını bildirmişlerdir (Yokomi ve ark., (2008); Manna ve ark. (2013); El-Fatah ve ark., (2016)).

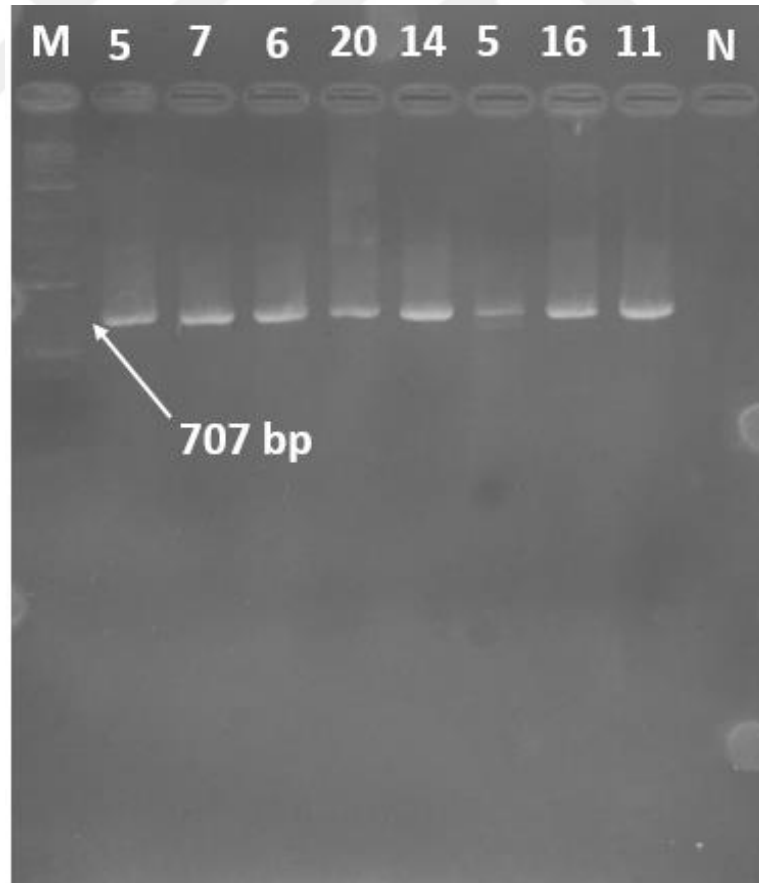
Çizelge 4.2. Çalışma alanlarından alınan meyvelerin kolumella kısımları kullanılarak elde edilen sonuçlar.

ÖRNEK NUMARASI	İL	İLÇE	ÇEŞİT	MEYVE	POZİTİF/NEGATİF
1	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
2	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
3	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
4	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
5	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
6	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
7	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
8	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
9	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
10	Adana	Kozan	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
11	Adana	Yüreğir	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
12	Adana	Yüreğir	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
13	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
14	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
15	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
16	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
17	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
18	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
19	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
20	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Pozitif
21	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
22	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
23	Mersin	Tarsus	Portakal (Washington)	Kolumella	Negatif
24	Hatay	Erzin	Mandarin (Satsuma)	Kolumella	Negatif
25	Hatay	Erzin	Mandarin (Satsuma)	Kolumella	Negatif

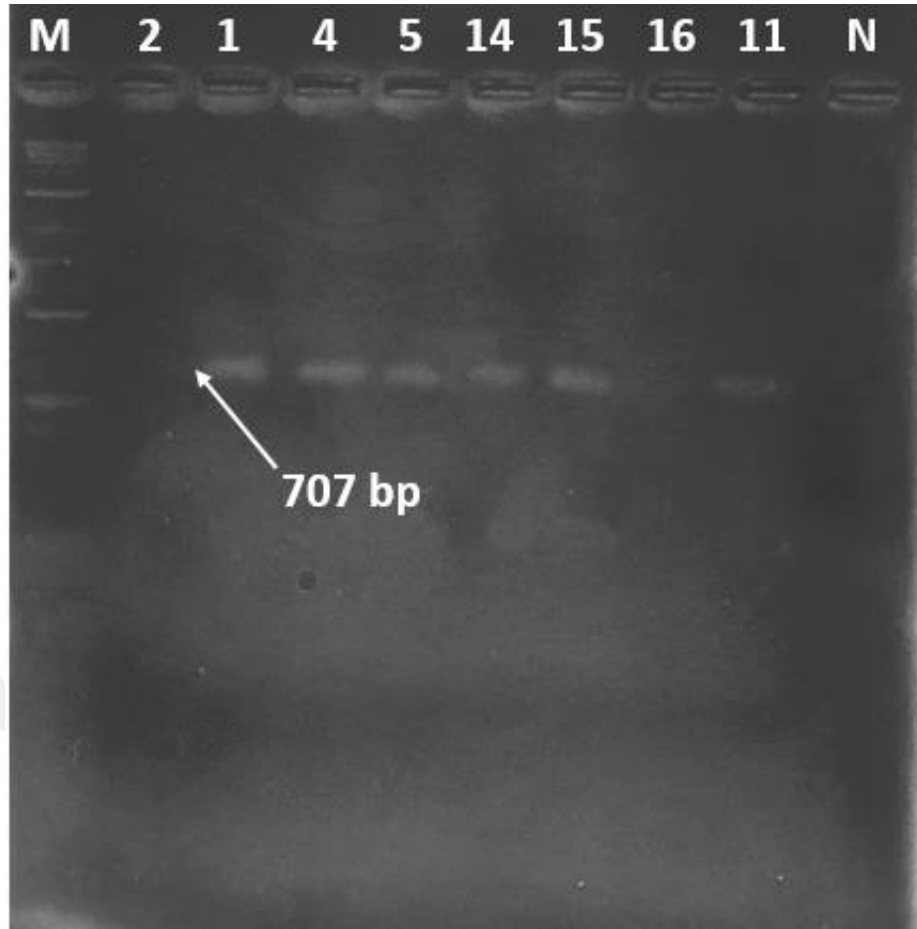
Yukarıda da belirtildiği gibi toplam 25 örnekten 4 farklı jel yürütülmüştür. Yürütülen 4 farklı jel sonucunda 10 örnek pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan ek bir çalışma ile 10 örneği tek bir jelde göstermek amacıyla 2 farklı jel daha yapılmıştır. İlk jele sırasıyla örnekler (M (markör), 5, 7, 6, 20, 14, 15, 16, 11 negatif kontrol) yerleştirilmiş, ikinci jelde ilk jelde kullanılmayan örnekler ve ek olarak aynı olan örnekler (M (markör), 2, 1, 4, 5, 14, 15, 16, 11 negatif kontrol) kullanılmış ve Şekil 4.8. ve Şekil 4.9. daki jel görüntüleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. Toplam 25 örneğin jel sonuçları, pozitif (+) ve negatif (-) olarak elde edilen sonuçlar

Markör	Örnek numaraları ve PCR sonuçları								Negatif kontrol
M	1	2	3	4	5	6	7	8	NK
	+	-	-	+	+	+	+	-	
M	9	10	11	12	13	14	15	16	NK
	-	-	+	-	-	+	+	+	
M	17	18	19	20	21	22	23	24	NK
	-	-	-	+	-	-	-	-	
M	25								NK
	-								



Şekil 4.8. Moleküler Çalışmalar Sonucu %1,8'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen PCR ürünlerinin ethidium bromid boyaması ile alınan jel görüntüleri (1. jel). (M: Markör, 5, 7, 6, 20, 14, 15, 16, 11 pozitif bulunan örnekler, N: negatif kontrol).



Şekil 4.9. Moleküler Çalışmalar Sonucu %1,8'lik agaroz jel elektroforezi ile elde edilen PCR ürünlerinin ethidium bromid boyaması ile alınan jel görüntüleri (2. jel). M: Markör, 1,4,5,14,15,,11 pozitif bulunan örnekler, N: negatif kontrol.

4.2.2. qPCR Çalışmaları

S. citri'nin belirlenmesi amacıyla, Yokomi ve ark. (2017) tarafından dizayn edilen P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r primer çiftleri ile (Çizelge 4.4.) qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. qPCR analizleri sonucunda elde edilen görüntüler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.9.).

Çizelge 4.4. P58-3f/4r ve P58-1f/2r primer çifti kullanılarak yapılan qPCR sonuçları

Örnekler	P58-3f/4r		Örnekler	P58-1f/2r
1	+		1	-
4	+		4	-
5	+		5	-
14	+		14	-
15	+		15	+
11	+		11	-
17(N)	+		14	-
H ₂ O	-		15	-

Yapılan qPCR çalışmasında kullanılan 2 primer çiftide (P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r) bir çok *S. citri* çalışmasında kullanılan primer çiftleridir. Bu çalışmada ilk kez Yokomi (2008) tarafından dizayn ve tavsiye edilen bu primer çiftleri çalışmada denemek amacıyla kullanılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda Klasik PCR çalışmasında elde edilen toplam 10 pozitif örnekten (1, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20 nolu örnekler) 6'sı (1, 4, 5, 11, 14, 15 nolu örnekler) ve 1 adet yine klasik PCR'da negatif bulunan bir örnek (17 nolu örnek) negatif kontrol olarak qPCR çalışmasına dahil edilmiştir. Her iki primer çiftinin (P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r) kullanıldığı örneklerle renklendirici özelliğe sahip olan ROX boya maddesi eklenmiştir. Sadece ikinci primer çiftinin son iki örneği (14, 15) kontrol olarak yeniden kullanılmış ve ROX boya maddesi eklenmemiştir. Çalışma sonucunda boya maddesi eeklenmeyen iki örnekte (14, 15) negatif sonuç vermiştir. P58-3f/P58-4r primer çiftinin kullanıldığı qPCR çalışmasında tüm örnekler pozitif sonuç verirken P58-1f/P58-2r primer çiftinin kullanıldığı qPCR çalışmasında sadece 15 (ROX boya maddesi ile boyanan 15 nolu örnek) numaralı örnek pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca Klasik PCR'da negatif bulunup bu çalışmada negatif kontrol olarak kullanan 17 numaları örnekte qPCR çalışmasında pozitif sonuç vermiştir. Her iki primer çifti değerlendirildiğinde *S. citri*'nin qPCR ile tanılanmasında P58-3f/P58-4r primer çiftinin hastalığı tanılamada çok iyi çalıştığı, tüm örnekler için pozitif sonuç verdiği, hatta Klasik PCR'da negatif çıkan bir örneğin bu çalışmada qPCR ile pozitif sonuç verdiği görülmüştür. P58-1f/P58-2r primer çifti her ne kadar 6 örnekten sadece 1 örneği pozitif bulsada pozitif olarak bilinen tüm örneklerden sadece 1 tanesi pozitif saptayabildiği görüldüğünden *S. citri* çalışmalarında çok güvenilir olarak görülmemiştir (Çizelge 4.4.).

Yokomi ve ark., (2010), Kaliforniya'da yaptıkları çalışmada, Real Time PCR kullanılarak *S. citri*'nin SYBR Green kullanarak *S. citri*'nin tanılanması için P-58-3f/4r primer çiftini geliştirmişlerdir. Çalışmada *S. citri*'den klonlanmış amplikonlardan elde edilen dizilerin sekansı, *S. citri* izolatu BR3-3X'in varsayılan adhezin geninin nükleotid dizisiyle %100 özdeşlik göstermiştir. Deneme duyarlılığının, arazideki turuncgil ağaçlarından toplanan dokunun mg'ı başına 8 x 10⁻⁵ ile 1,2 x 10⁻⁶ ng *S. citri* DNA'sı (hedef genin 6,14 x 10⁵ ile 9,6 x 10³ kopyası) olduğu tahmin edilmiştir. *S. citri* titresi, meyve kolumellasında yaprak orta damarlarına göre sürekli olarak daha yüksek bulunmuş ve bu da önceki dokuyu örnekleme için en iyi seçim haline getirmiştir. Real Time PCR, beş test alanında 1.239 ağacı araştırmak için kullanılmış ve CSD yoğunluğu sırasıyla %58,9, %4,2, %0, %13,4 ve %28,6 oranlarıyla sonuçlanmıştır. Bu, Kaliforniya'nın merkezindeki bazı turuncgil bahçelerinde CSD'nin önemli infeksiyon yoğunluğunun meydana geldiğini göstermiş ve CSD infeksiyon yoğunluğunu değerlendirmek için bir araç olarak Real Time PCR'ın faydasını ortaya koymuştur.

Yokomi ve ark., (2008), *S. citri*'nin kantitatif tespitini her iki primer çiftini (P58-3f/4r) kullanılarak elde etmişlerdir. P58-3f/4r primerleri kullanılarak, beklenen büyüklükte amplikonlar *S. citri* kültürlerinden üretilmiştir. PCR sonuçları, kullanılan primerlere bağlı olarak %85 ile %100 oranında kültüre alma sonuçlarıyla eşleştirilmiştir. Daha da önemlisi, kültür çalışmalarında negatif

bulunan ağaçlardan *S. citri* örneklerinden PCR ile %5 ile %15'inde pozitif tespit edilmiştir; bu da PCR'ın saha örneklerinde *S. citri*'nin tespiti için kültüre alma kadar iyi veya daha iyi performans gösterildiği bildirilmiştir. Böylece Real Time PCR'ın tespit için en iyi yöntem olduğunu kanıtlanmıştır. Örneklerin P58 primer çiftlerine farklı tepkisi, *S. citri*'nin iki popülasyonunun tarihsel ve günümüz tarla izolatlarında bulunduğunu göstermektedir. Hastalığın görülme sıklığının iki bahçede %58,3 ve %3,7 olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, arazideki ağaçlarda *S. citri*'nin güvenilir bir şekilde saptanması için PCR'nin etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Sagouti ve ark., (2023), Fas'ta turuncgil bahçelerinde *S. citri* tanısı için serolojik ve moleküler yöntemleri doğrulamayı amaçlamışlardır. Fas turuncgil bahçelerindeki patojen salgınının mevcut durumu hakkında güncelleme sağlamak için, Fas'ın ana turuncgil yetiştirme bölgelerinde *S. citri* araştırması yapmışlardır. *S. citri* enfeksiyonuna benzeyen semptomlara sahip turuncgil ağaçlarından toplam 575 yaprak örneği toplanılmıştır. 2020 ve 2021 yıllarında 23 turuncgil bahçesinden örnekler toplanılmıştır. Tüm örneklerde *S. citri*'nin varlığı DAS-ELISA kullanılarak test edilmiştir. Bu yöntemle, 57 örneğin *S. citri* ile infekte olduğu, 41 örneğin şüpheli sonuçlara sahip olduğu ve kalan örneklerin negatif olduğu bulunmuştur. DAS-ELISA testinin sonuçlarını doğrulamak için, üç farklı geni (P58 geni, P89 geni ve spiralin geni) hedefleyen spesifik primer çiftlerine dayalı geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) kullanılarak ek moleküler test için 148 örnek seçilmiştir. P58'i hedef alan primerler kullanılarak, *S. citri* farklı özgülük derecelerine sahip bitki dokusundan geleneksel ve gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu ile tespit edilmiştir. Sonuçlar, %6,5 ile %78 arasında değişen geniş bir pozitif örnek aralığıyla tüm Fas turuncgil bahçelerinde *S. citri* yoğunluğunu belirlenmesine ve özellikle P58 primeri kullanılarak gerçekleştirilen Real Time PCR analizlerinin *S. citri*'nin doğru teşhisi için en hassas testler olduğunun görülmesine olanak sağlamıştır. Özellikle P58 hedefli primerlerle yapılan Real Time PCR, tüm pozitif ve şüpheli ELISA örneklerinin yanı sıra bazı negatif örneklerde de pozitif sonuçlar vermiş olup, OD değeri sağlıklı örneklerin 1,5 katına yakın bir değerde olup, bu da bu tekniğin yüksek duyarlılığını göstermektedir.

Tüm qPCR sonuçlarının değerlendirdiğimizde qPCR moleküler tanılama yönteminin hastalığı tanılamada klasik PCR'dan daha iyi çalıştığı, daha hızlı sonuç verdiği, daha az laboratuvar malzemeleri kullanımını sağladığı, kansorejen malzemelerinin (Ethidium bromide) kullanımının gerekmediği bir yöntem olarak etkin ve güvenilir olduğu belirlenmiştir. Yine bu çalışmada kullanılan primer çiftlerden P58-3f/P58-4r primer çiftinin hastalığı tanılamada çok iyi çalıştığı qPCR yönteminde rahatlıkla kullanılabileceği görülmüştür.

qPCR testi sonuçlarına ait veriler resimde gösterildiği şekilde kayda alınmaktadır. Elde edilen verilere göre A1 değeri 1 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 8,95; A2 değeri 4 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 11.78; A3 değeri 5 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 22.66; A4 değeri 14 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 22.66; A5

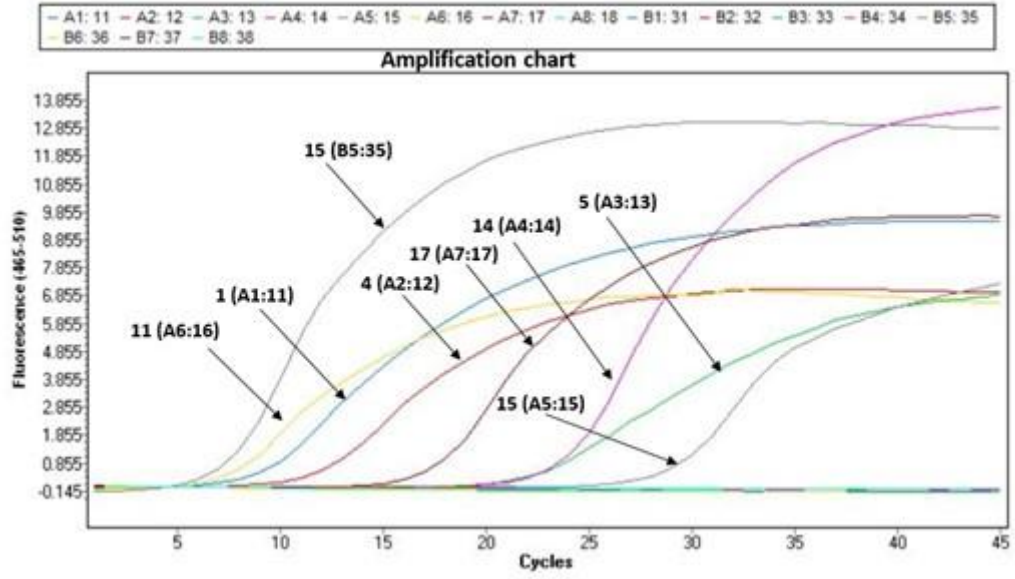
değeri 15 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 6.75; A6 değeri 11 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 7,65; A7 değeri 17 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 16.88; B5 değeri 15 numaralı örneği temsil etmekte olup titre değeri 28.51 saptanmıştır. Şekil 4.7.’den görüldüğü gibi klasik PCR testinde negatif çıkan örneklerden B5 değeri 15 numaralı örnek qPCR testi sonucunda yüksek titre değeri göstermiştir (Şekil 4.10.).

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	11	Unknown	8.95			
☒	A2	12	Unknown	11.78			
☒	A3	13	Unknown	22.66			
☒	A4	14	Unknown	22.66			
☒	A5	15	Unknown	6.75			
☒	A6	16	Unknown	7.65			
☒	A7	17	Unknown	16.88			
☒	A8	18	Unknown				
☒	B1	31	Unknown				
☒	B2	32	Unknown				
☒	B3	33	Unknown				
☒	B4	34	Unknown				
☒	B5	35	Unknown	28.51			
☒	B6	36	Unknown				
☒	B7	37	Unknown				
☒	B8	38	Unknown				

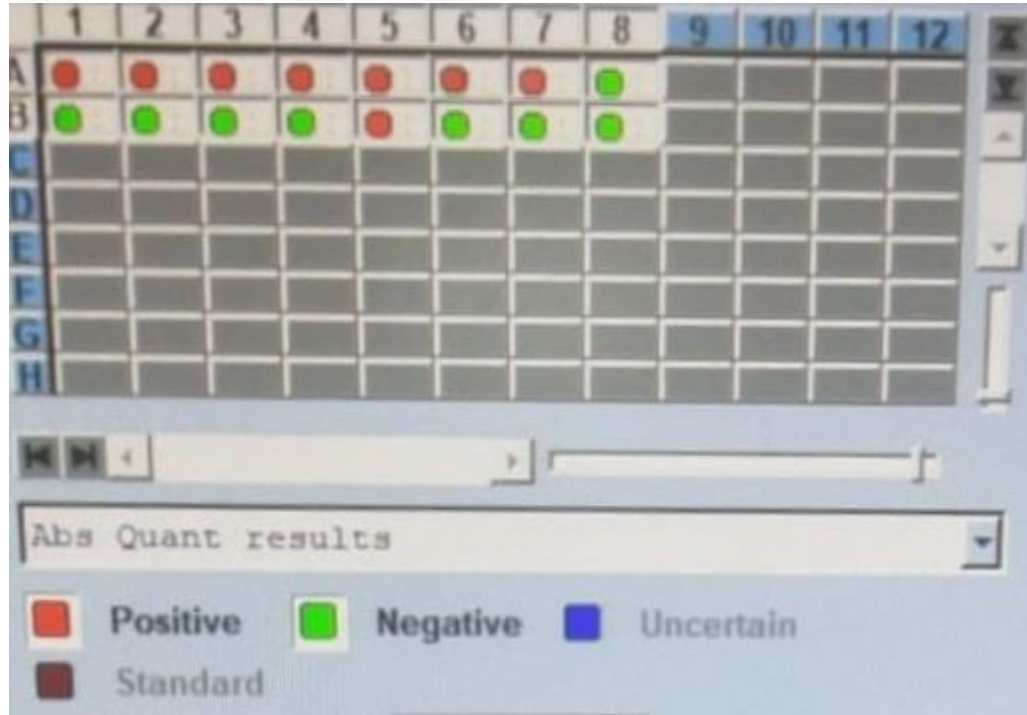
Şekil 4.10. qPCR analizi sonucunda elde edilen titre değerleri

Şekil 4.11.’de gösterilen qPCR analizi sonucu amplifikasyon grafiğinde dikey eksenindeki floresan miktarının yatay eksenindeki döngü sayısına göre grafiği çizilerek, tüm PCR reaksiyonu süresince ürün birikimini temsil eden bir amplifikasyon grafiği oluşturulmuştur. Eşik değeri değerleri, örnekteki nükleik asit miktarı ile ters ilişkilidir. Düşük eşik değerleri yüksek miktarda hedeflenen nükleik asidi gösterirken, yüksek eşik değerleri hedef nükleik asidin daha düşük (ve hatta çok az) miktarlarını ifade eder.



Şekil 4.11. qPCR analizi sonucu amplifikasyon grafiği

qPCR analizi sonucu elde edilen verilerden olan mutlak sonuç (Abs quant results) tablosu incelendiğinde negatif ve pozitif olarak gösterilmektedir. Verilere incelendiğinde A1 değeri 1 numaralı örnek; A2 değeri 4 numaralı örnek; A3 değeri 5 numaralı; A4 değeri 14 numaralı örnek; A5 değeri 15 numaralı örnek; A6 değeri 11 numaralı numaralı örnek; A7 değeri 17 numaralı örnek; B5 değeri 15 numaralı örnek infekteli olarak gösterilmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Örneklerin bilgisayarda negatif ve pozitif durumlarının göstergesi.

4.2.3. Klasik PCR ve qPCR'ın Karşılaştırılması

Moleküler biyoloji alanında sıkça kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen yöntemlerden biri klasik PCR'dır (Gibson, 2006). Bu yöntem, zamanla önemini koruyarak çağımızda daha da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Geçmiş dönemlerde kullanılan moleküler yöntemlerin, bugünkü yöntemlere kıyasla daha yavaş ve doğruluk oranının daha düşük olduğu görülmektedir. Modern araştırmalarda ise bilim insanları ve araştırmacılar, yeni nesil moleküler yöntemlerden biri olan qPCR'ı tercih etmektedirler. qPCR, birçok farklı özelliği ile çalışmalar sırasında daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Ayrıca, jel elektroforezi gibi eski tekniklere kıyasla qPCR ile çalışmanın daha hızlı ve etkin olduğu gözlemlenmiştir. qPCR aşamalarında, örnekler doğrudan cihaza yerleştirilerek analiz edilmekte ve sonuçlar ekranda belirlenmektedir (Şekil 3.3). Bazı cihazlar için tetikleyici özelliklerine bağlı olarak Rox solüsyonu kullanılması gerekebilmektedir. Rox solüsyonunun Roche LightCycler® gibi markalı cihazlarda kullanılması, pozitif sonuçlar elde etmede etkili olmaktadır. Klasik PCR ile qPCR yöntemleri karşılaştırıldığında, klasik PCR sırasında farklı mix, farklı primer, jel elektroforez yöntemleri ve UV görüntüleme kullanılmaktadır. Buna karşılık, qPCR sırasında farklı mix, farklı primer ve nihayetinde floresans boyama tekniği uygulanmaktadır (Saunders ve ark., 2004).

Yapılan bir çok çalışmada Klasik PCR ile negatif olarak değerlendirilen bazı izolatların qPCR ile pozitif sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Yokomi ve ark., (2008); Manna ve ark. (2013); El-Fatah ve ark., (2016)). Bu çalışmada klasik PCR toplam 25 örnekten 10 tanesi pozitif olarak değerlendirilmiş ve 6 örnek yeniden qPCR'a tabi tutulmuştur. Kullanılan bu 6 örnekten tamamı da pozitif sonuç vermiştir. Çalışmada klasik PCR ile negatif bulunan 17 numaralı örnek qPCR çalışması sonucu pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.5.). Bu çalışma sonucu da göstermiştir ki qPCR Klasik PCR'dan daha güvenilir sonuç vermiştir.

Çizelge 4.5. qPCR ve klasik PCR karşılaştırılması.

Örnekler	qPCR	Klasik PCR
1	+	+
4	+	+
5	+	+
11	+	+
14	+	+
15	+	+
17	+	-

4.3. Arazide Gözlemlenen Simptomolojik Bulguların ve Moleküler Sonuçların Karşılaştırılması

Arazi çalışmaları sırasında, turunçgil ağaçlarında zamansız çiçek açımı, genel bir bodurluk, olgun meyve ve küçük meyvenin aynı anda bulunması, boğum aralarının kısalması ve çalılışma benzeri belirtiler ile yapraklarda küçülme, kaşık şeklini alarak çukurlaşma, çinko noksanlığına benzer sarı benekler ve meyvelerde palamut şekli ve eksen kayması gibi hastalık belirtileri gözlemlenmiştir. Bu belirtiler, moleküler yöntemlerden klasik PCR ve qPCR ile test edilmiştir. Toplam 25 örnek P89-f/P89-r primerleri kullanılarak klasik PCR ile testlenmiştir. PCR sonucunda simptomolojik olarak infekteli olarak belirlenen 25 örnekten 10 örnek (1-4-5-6-7-11-14-15-16-20 nolu örnekler) pozitif olarak saptanmıştır. Örneklerin klasik PCR ile incelenmesi sonucu 10 adeti pozitif sonuç vermiştir. Q PCR ile yapılan çalışmada ise toplam 25 örneğin 11'inde pozitif sonuç bulunmuştur. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında klasik PCR ve qPCR analizlerinin güvenilir testler olduğu, iki PCR yöntemi içinde de qPCR yöntemi *S. citri* hastalığının belirlenmesinde en güvenilir yöntemlerden biri olduğu görülmektedir. Yokomi ve ark. (2008), yaptıkları benzer bir çalışma qPCR yönteminin güvenilir ve hassas bir tanılama yöntemi olduğunu vurgulamışlardır.

Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada *S. citri*'nin epidemiyolojisi araştırılmıştır. Moleküler yöntem olarak PCR ve kültüre alma yöntemleri ile iki bahçe seçilmiş ve hastalık yüzdesi %1-4 ile %46-85 arasında ölçülmüştür. Karşılaştırılan iki bahçede meyve kalitesi ve verimi göz önünde bulundurularak hafif simptom gösteren bahçede verimlilik iyi olmasına rağmen *S. citri* ile infekteli bahçede meyve verim ve kalitesinin %30 oranında daha düşük olduğunu saptamışlardır (Mello ve ark., 2010).

Yokomi ve ark.(2008), Kaliforniya'da turunçgil palamutlaşma hastalığının belirlenmesinde P58 ve P89 primer çiftini kullanarak *S. citri*'nin varlığını PCR ile testlemişler ve Kern County (Kaliforniya, ABD)'deki iki turunçgil bahçesinden örnek alıp patojenin kültürleri ile karşılaştırma yapmışlardır. PCR sonuçları doğrultusunda örnekler % 85 ile % 100 arasında kültürleri ile eşleştirilmiştir. PCR ile örneklerin negatif kültürlerinde dahi *S. citri*'nin varlığını saptamışlardır.

Fas'ta bulunan turunçgil bahçelerinde serolojik ve moleküler yöntemleri doğrulamak için *S. citri*'nin teşhisi yönünde bir takım çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın yürütülmesi için 2020 ve 2021 yıllarında turunçgil bahçelerinden toplam 575 yaprak örneği alınmıştır. Tüm numuneler DAS-ELISA analizi kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 57 numune pozitif 41 numune şüpheli geri kalan numune ise negatif olarak belirlenmiştir. Testin sonuçlarını doğrulamak için yeniden 148 örnek götürülerek klasik PCR ve qPCR kullanılarak moleküler testler yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada kullanılan örneklerin %6,5 ile %78 pozitif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak Fas'da bulunan turunçgil bahçelerinin *S. citri* ile infekteli olduğu ve pozitiflik yönünde *S. citri* için en duyarlı genin P58 olduğu belirlenmiştir (Sagouti ve ark., 2023).



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, Adana'nın Kozan ve Yüreğir ilçelerinde, Mersin'in Tarsus ilçesinde ve Hatay'ın Erzin ilçesinde bulunan portakal ve mandarin bahçelerinde yediverenleşme hastalığını tespit etmek amacıyla örnekler seçilmiştir. Ziyaret edilen turuncgil bahçelerinde, bodurlaşma gösteren ağaçlar, zamansız çiçek açımı belirtileri sergileyen dallar, küçülmüş ve kaşık şeklini almış, çinko noksanlığına benzer sarı benekli yapraklar, internodları kısalmış ve dik uzayan genç sürgünler ile meyvelerde şekil bozukluğu, palamut şeklinde irili ufaklı meyvelerin bir arada bulunduğu ağaçlar incelenmiştir.

Hastalık belirtilerinin tümü turuncgil ağaçlarında gözle görülemeyebilir, zira hastalık etmeni olan *S. citri* bitki içerisinde homojen bir dağılım sergilemez. Bu durum, arazi gözlemlerinde CSD hastalık belirtilerini diğer hastalık belirtileri veya bitki besin elementi eksiklikleriyle karıştırılabilir. Hastalığın kesin ve doğru teşhisi için güvenilir olan moleküler yöntemlerden öncelikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve qPCR yöntemi kullanılmalıdır.

Arazi çalışmaları sırasında, yukarıda verilen belirtileri gösteren örnekler moleküler yöntemlerden klasik PCR ve qPCR uygulanmıştır. Toplam 25 örnek P89-f/P89-r primerleri kullanılarak klasik PCR ile testlenmiştir. PCR sonucunda 10 örnek (1-4-5-6-7-11-14-15-16-20 nolu örnekler) pozitif olarak saptanmıştır. Adana'nın Kozan ilçesinden 5 örnek (1-4-5-6-7 nolu örnekler), Adana'nın Yüreğir ilçesinden 1 örnek (11 nolu örnek), Mersin'in Tarsus ilçesinden 4 örnek (14-15-16-20 nolu örnekler) infekteli bulunmuştur.

Yapılan qPCR çalışmasında kullanılan 2 primer çifti de (P58-3f/P58-4r ve P58-1f/P58-2r) birçok *S. citri* çalışmasında kullanılan primer çiftleridir. Bu çalışmada ilk kez Yokomi (2008) tarafından dizayn ve tavsiye edilen bu primer çiftleri çalışmada denemek amacıyla kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Klasik PCR çalışmasında elde edilen toplam 10 pozitif örnekten (1, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20 no'lu örnekler) 6'sı (1, 4, 5, 11, 14, 15 no'lu örnekler) ve 1 adet yine klasik PCR'da negatif bulunan bir örnek (17 nolu örnek) negatif kontrol olarak qPCR çalışmasına dahil edilmiştir. P58-3f /P58-4r primer çiftinin kullanıldığı qPCR çalışmasında tüm örnekler pozitif sonuç verirken P58-1f/P58-2r primer çiftinin kullanıldığı qPCR çalışmasında sadece 15 numaralı örnek pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca Klasik PCR'da negatif bulunup bu çalışmada negatif kontrol olarak kullanan 17 numaralı örnekte qPCR çalışmasında pozitif sonuç vermiştir. Her iki primer çiftini değerlendirildiğinde *S. citri*'nin qPCR ile tanımlanmasında P58-3f/P58-4r primer çiftinin hastalığı tanılamada çok iyi çalıştığı, tüm örnekler için pozitif sonuç verdiği, hatta Klasik PCR'da negatif çıkan bir örneğin (17 numaralı örnek) bu çalışmada qPCR ile pozitif sonuç verdiği görülmüştür. P58-1f/P58-2r primer çifti her ne kadar 6 örnekten sadece 1 örneği pozitif bulsada pozitif olarak bilinen tüm örneklerden sadece 1 tanesi pozitif saptayabildiği görüldüğünden *S. citri* çalışmalarında çok güvenilir olarak görülmemiştir. Ayrıca qPCR testi sonuçlarına ait elde edilen verilere göre 1 numaralı örneğin titre değeri 9.07; 4 numaralı örneğin titre değeri 11.77; 5 numaralı örneğin titre değeri 22.38;

14 numaralı örneğin titre değeri 23.77; 15 numaralı örneğin titre değeri 6.97; 17 numaralı örneğin titre değeri 17.17; 15 numaralı örneğin titre değeri ise 28.80 olarak saptanmıştır. Klasik PCR testinde negatif çıkan örneklerden B5 değeri 15 numaralı örnek qPCR testi sonucunda yüksek titreme göstermiştir. Bu yöntem sayesinde, hastalık etmeninin varlığı kesin bir şekilde tespit edilerek doğru teşhis sağlanmıştır.



KAYNAKLAR

- Abd El-Fatah, W., Egiza, A. O., Youssef, S. A., & Shalaby, A. A. (2016). Isolation and identification of *S. Citri* associated with citrus stubborn disease in Egypt. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(9), 223-231.
- AKİB, 2020. Akdeniz Yaş Meyve ve Sebze İhracatçıları Birliği. İnternet Adresi; <http://www.ymss.org.tr/files/downloads/istatistikler/2023/nisan-2021.pdf>
- ADATÜB, 2023. Adana Turunçgil Üreticileri Birliği 2023-2024 Üretim Sezonu Değerlendirme Raporu.
- Ateş, F.C., 2021. Turunçgil Bahçelerinde *Spiroplasma Citri* (Saglio Et Al.) Enfeksiyonuna Ara Ekim *Neaaliturus (Circulifer) Haematoceps (Mulsant & Rey) (Hemiptera: Cicadellidae)* İlişkisinin Etkisi. *Agricultural Faculty*. 52-94.
- Atlı H.F. ve Şahin A., 2021. Hatay İli Dörtüyl İlçesinde Portakal Üretim ve Pazarlaması, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 8(3): 834–846, 2021.
- Atlı H.F. ve Söyler O., 2018. Dünyada ve Türkiye’de Turunçgil Üretiminin ve İhracatının Değerlendirilmesi, *Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi*.
- Azeri, T, 1987. Necrotic of Satsuma Dwarf and Stubborn Disease on Satsuma Mandarin Tress in İzmir Province of Turkey. *J. Turkish Phytopatholog* 15(3) :8999.
- Benazzouz, K., Belkahla, H., Dubrana, M. P., & Lehad, A. (2023). Occurrence of *Spiroplasma citri* in Algerian Citrus Orchards.
- Bove, J.M., 1986. Stubborn and its natural transmission in the Mediterranean area and the Near East. *FAO Plant Prot. Bull.* 34: 15-23.
- Calavan., E.D.Olson, D.W. Christiansen,1972. Transmission of the Stubborn Pathogen in Citrus By Leaf Piece Grafts. In ‘Proc. 5 th. Conf. IOCV’ (W.C. Price, ed.) 11-14 pp. Univ. Fla. Press. Gainesville.
- Calavan, E. C. and Bove, J. M. 1989. Ecology of *Spiroplasma citri*. Pages 425-484 in: *The Mycoplasmas*, Vol. 5: *Spiroplasmas, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of Plants and Arthropods*. R. F. Whitcomb and J. G. Tully.
- Cengiz, A., 1965. Güney Bölgesi Turunçgillerinde Stubborn Hastalığı Üzerine Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 5(4); 163-169s eds. Academic Press, London, U.K.
- Ceyran, M., E., 2021. Farklı Bitkilerde Turunçgil Stubborn Hastalığının Moleküler Olarak İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi. Adana, Türkiye, 80 s.
- Childs, J.F.L., And Carpenter, J.B., 1961. Observation on Stubborn and Other Disease of Citrus in Morocco. *The Citrus Industry*, August, 1961, 5-6, 12-13pp.
- Cacciola S.O, Bertaccini A., Pane A. and Furneri M.P.,2017. *Spiroplasma spp.*: A Plant, Arthropod, Animal and Human Pathogen Additional information is available at the end of the chapter <http://dx.doi.org/10.5772/66481>

- Çağlar, B. K., Satar, G., Baloğlu, S., DRAİS, M. İ., & Djelouah, K. (2020). Detection of *S. citri* from citrus trees in Turkey by molecular techniques. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1), 37-42.
- Çağlayan, K. ve Çınar, A. (1990). Doğu Akdeniz bölgesindeki narenciye ağaçlarında gözlemlenen inatçı hastalığın etken maddesi olan *Spiroplasma citri*'nin simptomatolojisi ve tespitine yönelik çalışmalar. *Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 14 (2), 58-70.
- Drais, M. I. (2018). Development of new tools for on-site detection of *Spiroplasma citri*, the causal agent of citrus stubborn disease.
- El-Banna, O. H. M., Kheder, A. A., Ali, M. A. H., Sayed, A. M., & Haseeb, G. M. (2020). Biological and molecular characterization of different egyptian isolates of *Spiroplasma citri*. *Plant Arch*, 20, 6457- 6469.
- FAO (2023). Tarım İstatistikleri Verileri. İnternet Adresi; www.fao.org (Erişim Tarihi 2024) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- FAO (2021); Tarım İstatistikleri Verileri, <https://kutuphane.tarimorman.gov.tr/baslik/17/FAOSTAT>
- Fawcett, H.S., Perry, J.C., And Johnston, J.C., 1944. The Stubborn Disease of Citrus Calif. *Citrograph*. 29: 146-147.
- Fletcher J, Slack Sa (1986) Latex agglutination as a rapid detection assay for *Spiroplasma citri*. *Plant Disease* 70: 754-75.
- Güllü, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakal ve Satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virüs ve virüs benzeri hastalık surveyi ve indekslenmesi iizerinde araştırmalar. (PhD thesis). Adana-Turkey 266 pp.
- Gaurivaud, P., J.-L. Danet, F. Laigret, M. Garnier, and J. M. Bove'. (2000a). Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 13: 1145-1155
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* 2006; 363:32-47.
- Iftikhar, Y., Bakhtawar, F., Hussain, I., Sajid, A., Mubeen, M., Ahmad, M., & Iqbal, S. (2020). Detection of *Spiroplasma citri* causing citrus stubborn disease in Sargodha, Pakistan. *International Journal of Botany Studies*, 5(3), 481-485.
- Kiptoo, J. J., Mubeen, M., Usman, H. M., Abbas, A., Pixley, K., Chemoiwa, E., & Kiptoo, G. J. (2021). Stubborn disease of citrus caused by *Spiroplasma citri*: A short note.
- Kubaa, R., Saponari, M., Djelouah, K., Yokomi, R.K., El-Khateeb, A., And Jamal, M., 2009. Molecular Detection of *Spiroplasma citri* Associated with Stubborn Disease in Citrus Orchards in Syria. *Arabian Journal of Plant Protection*. 27(V57):93.
- Hasan (2022), A Step Wise Molecular Techniques For Detection Of Bacterial Pathogen (*Spiroplasma Citri*) In Citrus Plant: A Mini. *Best Journal* 19(3): 39 – 41.

- Kubaa, R., Saponari, M., Djelouah, K., Yokomi, R.K., El-Khateeb, A., And Jamal, M., 2009. Molecular Detection of *Spiroplasma citri* Associated with Stubborn Disease in Citrus Orchards in Syria. *Arabian Journal of Plant Protection*. 27(V57):93.
- Kersting, U., Baspinar, U. H., Cinar, A., Sengonea, C., & Uygun, N. (1993). New findings on the epidemiology of *Spiroplasma citri* in the Eastern Mediterranean region of Turkey. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (Vol. 12, No. 12).
- Kiptoo, J. J., Mubeen, M., Usman, H. M., Abbas, A., Pixley, K., Chemoiwa, E., ... & Kiptoo, G. J. (2021). Stubborn disease of citrus caused by *Spiroplasma citri*: A short note.
- Kokane, A. D., Lawrence, K., Kokane, S. B., Gubyad, M. G., Misra, P., Reddy, M. K., & Ghosh, D. K. (2021). Development of a SYBR Green-based RT-qPCR assay for the detection of Indian citrus ringspot virus. *3 Biotech*, 11(7), 359.
- Lee Im, Bottner Kd, Munyaneza Je, Davis Re, Crosslin Jm, Du Toit Lj, Crosby T (2006) Carrot purple leaf: a new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. *Plant Disease* 90: 989- 993.
- Maheshwari, Y., Selvaraj, V., Hajeri, S., & Yokomi, R. (2017). Application of droplet digital PCR for quantitative detection of *Spiroplasma citri* in comparison with real time PCR. *PLoS One*, 12(9), e0184751.
- Mannaa, M.; Anna, M.; Djelouah, K.; Cavallo, G. and Valentini, F. (2013). Improvement of Detection Methods and Further Characterization of *Spiroplasma citri*, the Causal Agent of Citrus Stubborn Disease in Egypt. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, 4, 245-249. *citri Curr. Microbiol.* 68 (1), 96-104 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184751>.
- McNeil, CJ, Araujo, K., Godfrey, K. ve Slupsky, CM (2023). *Spiroplasma citri* ile İnfekte Edilmiş Washington Göbekli Portakallarda (*Citrus sinensis*) Genlerin Metabolit İmzası ve Diferansiyel İfadesi. *Phytopathology®* 113 (2), 299-308.
- Mello, AFS, Yokomi, RK, Payton, ME ve Fletcher, JACQUELINE (2010). Narenciye inatçı hastalığının Kaliforniya'daki ticari bir meyve bahçesinde göbekli portakal üretimi üzerine etkisi. *Bitki Patolojisi Dergisi* 429-438.
- Nejat, N., Vadamalai, G., & Dickinson, M. (2011). *Spiroplasma citri*: a wide host range phytopathogen. *Plant Pathology Journal*, 10, 46–56.
- Osorio-Acosta, F. (1999). Progression, detection and yield loss of persistent disease in citrus. U University of California, Riverside.
- Oldfield, G. N., Kaloostian, G. H., Pierce, H. D., Sullivan, D. A., Calavan, E. C., & Blue, R. L. (1977). New hosts of citrus stubborn disease. *Citrograph*, 62(10), 309-312
- Rattner, R., Thapa, S. P., Dang, T., Osman, F., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., & Yokomi, R. (2021). Genome analysis of *Spiroplasma citri* strains from different host plants and its leafhopper vectors. *BMC genomics*, 22(1), 373.

- Saglio, P., D. Lafleche, D.C. Bonisol And J.M. Bove, 1971. Isolation and culture in vitro mycoplasma associated with the stubborn of citrus fruits and their observation in electronic microscope. C.R. Acad. Sci., 272: 1387-1390.
- Saunders NA. Quantitative Real-Time PCR. In Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.) Real-Time PCR, An Essential Guide, p. 103-123. 2004. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- Sagouti, T., Belabess, Z., Rhallabi, N., Barka, E. A., Tahiri, A., & Lahlali, R. (2022). Citrus stubborn disease: Current insights on an enigmatic problem prevailing in citrus orchards. *Microorganisms*, 10(1), 183.
- Sagouti, T., Rhallabi, N., Polizzi, G., Tahiri, A., Belabess, Z., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2023). Comparison of Serological and Molecular Methods for Detection of *Spiroplasma citri* in Moroccan Citrus-Growing Areas. *Plants*, 12(3), 667.
- Shi, J., Pagliaccia, D., Morgan, R., Qiao, Y., Pan, S., Vidalakis, G., & Ma, W. (2014). Novel diagnosis for citrus stubborn disease by detection of a *Spiroplasma citri*-secreted protein. *Phytopathology*, 104(2), 188-195.
- TÜİK, 2022. Tarım İstatistikleri Verileri. İnternet Adresi; <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1> (Erişim Tarihi 2024)
- TÜİK, 2023 Tarım İstatistikleri Verileri. İnternet Adresi; <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Adrese-Dayali-Nufus-Kayit-Sistemi-Sonuclari-2023-49684> (Erişim Tarihi 2024)
- Umar, U. D. U., Naqvi, S. A. H., Ahmed, I., Rehman, A., Zulfiqar, M. A., Ullah, S., & Rehman, A. (2020). Prevalence and serological detection of *Spiroplasma citri*, a cause of citrus stubborn disease in southern Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 33(4), 748-753.
- Uygur, S., F.N.,U, A. Çınar, 1991.Çukurova Bölgesinde *Spiroplasma citri* Konukçusu Olan Yabancı Ot Türlerinin Saptaması.VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri 7-11 Ekim, 1991. izmir 3
- Wang, X., Doddapaneni, H., Chen, J., & Yokomi, R. K. (2015). Improved real-time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Disease*, 99(1), 149-154.
- Yokomi, R. K., Mello, A. F., Saponari, M., & Fletcher, J. (2008). Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Disease*, 92(2), 253-260.Yokomi, R. K., Fletcher, J., & Parlier, C. A. Project Concluded Final Report, December 31, 2009.
- Yokomi, R. K., Mello, A. F. S., Fletcher, J., & Saponari, M. (2010). Estimation of citrus stubborn incidence in citrus groves by real-time PCR. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 17, No. 17).

- Yokomi, R., Chen, J., Rattner, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Osman, F., & Vidalakis, G. (2020). Genome sequence resource for *Spiroplasma citri*, strain CC-2, associated with citrus stubborn disease in California. *Phytopathology*, 110(2), 254-256.
- Zarei, Z., Salehi, M., Azami, Z., Salari, K., & Béven, L. (2017). Stubborn disease in Iran: diversity of *Spiroplasma citri* strains in *Neoliturus (Circulifer)* haematoceps leafhoppers collected in sesame fields in Fars Province. *Current microbiology*, 74(2), 239-246.
- Wei W, Opgenorth DC, Davis RE, Chang CJ, Summers CG, Zhao Y, et al Characterization of a novel adhesin-like gene and design of a real-time PCR for rapid, sensitive, and specific detection of *Spiroplasma kunkelii*. *Plant Disease*. 2006; 90(9):1233-1238





ÖZGEÇMİŞ

Tahmina Tahmina MUSTAFAYEVA, ilkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Azerbaycan'da tamamladı. 2017 yılında Azerbaycan Devlet Tarım Üniversitesi'nde başladığı lisans eğitimini 2021 yılında tamamladı. 2021 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı.







EKLER



EK-1. CTAB Tamponu (Ekstraksiyon Tamponu)

CTAB : 2,00 gr

PVP-40 : 2,00 gr

100 nM EDTA : 1,57 gr

1,4 M NaCl : 8,17 gr

Hazırlanan çözelti için, 80 ml steril saf suya çözündürüldükten sonra pH değeri 8,0 olarak ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere %,1 oranında 2-Mercaptoethanol eklenmiştir.



EK- 2. 1X TAE Tamponu

10 mM Tris-Base : 1,211 gr

0,5 mM EDTA : 0,186 gr

5 mM Sodium acetate : 0,680 gr

Öncelikle, 800 ml steril saf suya belirli miktarlarda çözünme adımları uygulanmıştır. Daha sonra bu çözeltiye ,1 N NaOH ve N HCl kullanılarak pH değeri 8,3 olarak ayarlanmıştır. Sonrasında ise hacim tamamlanarak toplamda 100 ml'lik bir karışım elde edilmiştir. Hazırlanan karışım otoklavda steril edilmiştir ve cam bir kap içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir.



EK- 3. Total DNA Ekstraksiyon Yöntemi

Her örnekten 250 mg hassas terazide tartılarak 1,5 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur.

- 1000 ul CTAB örneklere eklenmiştir.
- Her örnek 1 dakika vortekslenmiştir.
- Örnekler -20 °C'de 30 dakika bekletilmiştir.
- Dolaptan çıkarılan örnekler 10 saniye kadar vortekslenmiştir.
- 60 °C' de 60 dakika inkübe edilmiş ve her 15 dk'da bir tüpler ters-düz edilmiştir.
- 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Her örneğin üst fazından 500 ul alınmıştır.
- Her örneğe 500 ul kloroform eklenmiştir
- Tüpler elle alt-üst edilmiştir.
- 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Her örneğin üst fazından 250 ul alınmıştır. Üzerine 175 ul soğuk propanol eklenmiştir.
- Tüpler elle kibarca 2 defa sallanmıştır.
- Örnekler 60 dakika inkübe edilmiştir.
- 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Tüplerdeki pelletin üzerindeki sıvı faz dikkatli bir şekilde dökülerek ve kalan pelletin üzerine 500 ul %70'lik alkol eklenmiştir.
- Tüpler elle hafifçe sallanmıştır.
- 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Her tüpteki pelletler kalacak şekilde dikkatlice içindeki alkol dökülmüş ve örnekler bir peçetenin üstüne ağzı açık kalcak şekilde kurumaya bırakılmıştır.
- Her örneğe 100 ul Buffer eklenip ve pellet eritilmiştir.
- Total DNA 'ları kullanılıncaya kadar -20°C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.