

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülbahar ARIKAN

**AKDENİZ BÖLGESİ SÜS BİTKİSİ YETİŞTİRİCİLİK
ALANLARINDA KRİZANTEM (*Chrysanthemum
morifolium* Ramat.) BİTKİLERİNDE BULUNAN
VİROİDLERİN ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİMDALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKDENİZ BÖLGESİ SÜS BİTKİSİ YETİŞTİRİCİLİK
ALANLARINDA KRİZANTEM (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)
BİTKİLERİNDE BULUNAN VİROİDLERİN ARAŞTIRILMASI

Gülbahar ARIKAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Yıl: 2021, Sayfa: 85
Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Doç. Dr. Mustafa KÜSEK

Dünyada süs bitkilerinde virüs ve viroid etmenlerinin neden olduğu birçok hastalık bulunmaktadır. Günümüze kadar dünyada krizantemlere spesifik önemli ekonomik kayıplara neden olan 2 adet viroid cinsi tespit edilmiştir. Bunlar *Avsunviroidae* familyasından olan *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)'i ve *Pospiviroidae* familyasından *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) dir. Bu çalışmada Akdeniz Bölgesinde 3 farklı ilden toplanan krizantem bitkileri RT-PCR yöntemi ile taranarak 4 farklı viroid açısından araştırma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda krizantem bitkilerinde bulunan 3 viroid etmeni tespit edilmiştir. Bu etmenlerden ikisi *Hop stunt viroid* (HSVd) ve *Citrus exocortis viroid* (CEVd)'i diğer etmen ise CSVd olarak tespit edilmiştir. Çalışmada karantina etmeni olan CChMVd 'i tespit edilmemiştir. HSVd ve CEVd etmenleri ülkemizde krizantem bitkilerinde araştırdığımız kadarıyla ilk kez tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Süs bitkileri, *Chrysanthemum morifolium*, CEVd, HSVd, CSVd, CChMVd, viroid, krizantem

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF VIROID IN CHRYSANTHEMUM (<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.) PLANTS OF ORNAMENTAL PLANT GROWING AREAS AT THE MEDITERRANEAN REGION

Gülbahar ARIKAN

**CUKUROVA UNIVERSTY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Year: 2021 Page: 85

Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN

: Assoc. Prof. Dr. Mustafa KÜSEK

In the world, there are many diseases in ornamental plants caused by viruses and viroids. Until today, two viroids species have been identified in the World that cause significant economic losses specific to chrysanthemums. These are *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) from *Avsunviroidae* family and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from *Pospiviroidae* family. In this study, chrysanthemum plants collected from 3 different provinces in the Mediterranean Region were scanned by RT-PCR method and research was carried out for 4 different viroids. As a result of the study, 3 viroid agents were found in chrysanthemum plants. Two of these agents were *Hop stunt viroid* (HSVd) and *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and the other factor was CSVd. CChMVd, which is a quarantine agent was not detected in this study. HSVd and CEVd agents were first detected in chrysanthemum plants in our country and location.

Key Words: Ornamental plants, *Chrysanthemum morifolium*, CEVd, HSVd, CSVd, CChMVd, viroid

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Anavatanı Japonya olan krizantem bitkileri kesme ve saksılı süs bitkileri açısından oldukça önemli bir konuma sahiptir. Krizantem türleri peyzaj sektöründe kullanıldığı kadar endüstri sektöründe de kullanılan tarımsal bir üründür. 2019 yılı itibari ile kesme krizantem yetiştiriciliği yapılan alan miktarı 754.520 metrekaredir (TUİK,2020). Bu üretim alanı yıllar geçtikçe artmaktadır. Artan üretim miktarları ile birlikte hastalık etmenleri ve zararlıların neden olduğu ürün kayıpları da artmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden olan viroidler en küçük patojen olma özelliğindedir. Günümüzde viroid etmeni kaynaklı hastalıklar sebebi ile tonlarca ürün kaybı yaşamaktayız. Şuana kadar tespit edilmiş 30 a yakın viroid türü saptanmıştır (ICTV, 2020). Krizantem yetiştiriciliği dünyada ekonomik değere sahip süs bitkileri sektörünün önemli bir parçasıdır. Krizantem yetiştiriciliğinde *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ve *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)'leri bu bitki grubunu hastalandıran önemli viroid etmenlerindedir. Ancak bu viroidler dışında *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Hop stunt viroid* (HSVd) etmenleri de krizantem bitkilerinde karışım halinde veya tek olarak bulunmakta ve enfeksiyon oluşturabilmektedir. Ayrıca bu viroidler de ekonomik krizantem yetiştiriciliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu çalışmada krizantem bitkilerinden bodurluk, sararma ve çiçek yapısında bozulma simptomları gösteren 56 adet örnek toplanmıştır. CSVd etmenin tanınması için moleküler yöntem olarak RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR sonucunda kullanılan CSVd-1H5 ve CSVd-1R primerlerin agar jel üzerinde çoklu DNA bantları oluşturduğu görülmüştür. Etmenin nested-PCR ile tanınmasında kullanılan primer çiftleri ile KriAd-27 örneğinde sırası ile yapılan PCR sonuçları ile agar jel üzerinde 221 ve 253 bp uzunluğunda bantlar gözlemlenmiştir. Çoklu bant oluşturan örneklerde CEVd'ni araştırmak için CEVd-1F ile CEVd-2R primer çifti kullanılmıştır. KriAd-5, KriAd-27, KriAd-38, KriTa-4, KriTa-9 izolatları bu etmen açısından pozitif sonuç veren örneklerdir. HSVd'ini tanılamak için kullanılan CVD.IIc ve CVD.IIh primer çifti KriTa-4 ve KriAd-38 örneklerinde

sonuç vermiştir. Bu etmen için yapılan jel görüntülemesi sonucunda 300 bç seviyesindeki bantlar elde edilmiştir.

RT-PCR sonuçları doğrultusunda 56 örnekten 5 adet bitkinin CEVd etmeni ile, 2 adet bitki örneğin HSVd'i ile ve 2 adet bitkinin ise CSVd etmeni ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Sonuç alınan izolatlardan CEVd ve HSVd etmeni için KriTa- 4 ve KriAd-38 izolatları . CSVd etmeni için ise KriAd-27 izolatının genom dizilimleri tespit edilmiştir. Sekans sonucunda KriAd-27 izolatu 299 bç uzunluğunda belirlenmiştir. NCBI gen bankasına yüklenen bu izolatu soy ağacı haritası çıkarılmıştır. Adana ilinden alınan krizantem bitkilerinden elde edilen KriAd-27 izolatu, NCBI gen bankasında kayıtlı olan Hindistan (KP262537), Avusturya (JF414238) ve Çin (FJ031232) izolatları ile sırası ile %99.4, %98 ve %98 oranında benzer olarak gözlemlenmiştir. HSVd etmeninin elde edildiği 2 izolattan KriAd-38, 301 bç oluştururken KriTa-4 153 bç uzunluktadır. KriAd-38 izolatu NCBI gen bankası verileriyle karşılaştırıldığında %84.67 ile % 94.86 oranında farklı bitki gruplarıyla (turunçgil, bağ, incir, fıstık) benzer olduğu görülmüştür. Diğer bir izolat olan KriTa-4 izolatu ise 153 bç olarak elde edilmiş ve NCBI gen bankasına kayıtlı iki izolattan turunçgil bitkilerinden elde edilenle %95 oranında ve bağ bitkilerinden elde edilen izolatla %98 oranında benzerlik göstermiş olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda etmenler tarafından bulaşık olarak elde edilen TNA örnekleri indikatör etrog citron ve krizantem bitkilerine inokulasyonları yapılmıştır. İnokulasyon sonucunda CEVd ve HSVd'lerinin tanılanmış olduğu KriAd-27 ve KriTa-4 örnekleri etrog bitkilerinde yapraklarda kıvrırcıklaşma, uç kısımlarında arkaya doğru büküme ve yaprak damarlarında ve uçlarında hafif nekrozlar şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir. KriAd 27, KriAd-38 ve KriTa-4 bitki TNAlarının inokulasyonunun yapıldığı indikatör krizantem bitkilerinde genel olarak bodurluk belirtileri gözlemlenmiş olup KriAd-27 ve KriAd-38 örneklerinde özellikle yapraklarda kloroz ve küçülmeler gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez krizantem bitkilerinde HSVd ve CEVd etmenleri doğal infekteli olarak bulunmuştur. CSVd etmeni ise bölgemizde ilk kez bulunması ve ülkemizde ilk kez izole edilmesi bakımından oldukça önemlidir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca gerek ders gerek tez döneminde benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışmanım Prof. Dr. Nuket Önelge'ye,

Tez çalışmamın yürütülmesinde; doku kültüründen elde edilen Krizantem bitkilerinin temini konusunda yardımcı olan Zir. Müh. Halil Oymak'a ve Güney Agripark firmasına, moleküler çalışmalardaki desteklerinden dolayı Dr. Fabrice AFLOKOU'ya laboratuvar çalışmalarındaki yardım ve katkıları için Zir. Yük. Müh. Nurcan GÜCER'e ve Zir. Yük. Müh. Büşra FİDANCI AVCI'ya çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden itibaren manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Zir. Müh. Burçin Taş ve Zir. Müh. Nisa Kurtarıcı'ya çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve beni destekleyen babam Ali ARIKAN, annem Dilden ARIKAN, büyükbabam Güner ARIKAN ve babaannem Emsal ARIKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans eğitimimden tez aşamama kadar beni motive eden ve destekleyen Ablam Sema İsenç'e teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesine maddi olanak sağlayan, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Bitki patojeni viroidler	5
2.2. Krizantem bitkilerinde bulunan viroid etmenleri	9
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller	19
3.1.2. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyaller	19
3.1.3. Moleküler tanılama yöntemlerinde kullanılan materyaller	20
3.1.3.1. Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan materyaller	20
3.1.3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) çalışmalarında kullanılan materyaller.....	20

3.1.3.3. Elektroforez çalışmasında kullanılan materyaller	21
3.2. Metod.....	22
3.2.1. Çalışmada kullanılacak olan bitkisel materyalin seçilmesi.....	22
3.2.2. Bitkisel materyallerin alımı.....	22
3.2.3. TNA ekstraksiyonu çalışmaları.....	24
3.2.4. Moleküler Çalışmalar.....	26
3.2.4.1. RT-PCR (Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi) Çalışmaları.....	26
3.2.4.1.(1). Tamamlayıcı DNA sentezi (cDNA).....	26
3.2.4.1.(2). PCR aşaması.....	26
3.2.4.2. Nested-PCR aşamaları.....	27
3.2.5. Elektroforez çalışmaları ve örneklerin görüntülenmesi.....	28
3.2.6. Jel Üzerinden Viroid Saflaştırılması.....	28
3.2.7. Sekans analizi ve verilerin karşılaştırılması	29
3.2.8. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları	29
3.2.8.1. Biyolojik indekslemede kullanılacak bitkilerin yetiştirilmesi.....	29
3.2.8.2. Hastalık etmeninin bulaşık olduğu TNA'ların seçimi	31
3.2.8.3. Hastalığın Bitkilere İnokulasyonu	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Krizantem bitkilerinde viroid belirtilerine ilişkin sera ve satış yeri gözlemleri.....	33

4.2. Krizantem bitkilerinde Tespit edilen Viroidlerin Biyolojik İndeksleme Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma.....	37
4.3. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma	41
4.3.1. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) Çalışmaları İle İlgili Bulgular ve Tartışma	41
4.3.1.1. CSVd ve CChMVd İle İlgili Bulgular Ve Tartışma.....	41
4.3.1.1.(1). CSVd'nin krizantem tohumlarında varlığı ile ilgili bulgular ve tartışma	46
4.3.1.2. CEVd ve HSVd İle İlgili Bulgular Ve Tartışma	47
4.3.2. Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analizler İle İlgili Bulgular ve Tartışma	50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
5.1. Sonuçlar.....	59
5.2. Öneriler.....	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER.....	80



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1. 1. 2016-2019 yılları arası Türkiye'deki süs bitkileri üretim (adet) ve ekim alanı (m2)	2
Çizelge 2.1. Bitki patojeni viroidlerin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.2. Krizantem bitkilerinde bulunan bazı viroidlerin farklı varyant sayıları ve nükleotid uzunlukları.....	10
Çizelge 3.1. RT aşamasında kullanılan primer	20
Çizelge 3.2. RT-PCR ve nested-PCR aşamalarında kullanılan primerler.....	21
Çizelge 3.3. Çalışma materyalini oluşturan krizantem bitkileri ve bunlar üzerinde gözlenen simptomlar	23
Çizelge 4.1. Akdeniz bölgesinde bulunan illerden toplanan bitki örneklerinde gözlemlenen hastalık simptomları ve örnek sayıları (+ Belirti mevcut, - Belirti mevcut değil)	34
Çizelge 4.2. İndikatör bitkilerde gözlemlenen belirtiler (B: Bodurlaşma, BAK: Boğum arası kısalma, KY: Küçülmüş yaprak, YHK: Yapraklarda hafif kloroz, KÇ: Küçük çiçek yapısı, YK: Yapraklarda kıvrıkcıklaşma).....	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Tarsus ve Adana illerinden alınan örneklerde görülen petal yapraklardaki bozukluk belirtileri.....	22
Şekil 3.2. Jelden pürifiye işlemlerinin aşamaları.....	29
Şekil 3.3. Doku kültüründen elde edilmiş olan açık köklü krizantem fideleri.	30
Şekil 3.4. Doku kültüründen elde edilen sağlıklı krizantem fidelerinin dikim aşamaları.....	30
Şekil 3.5. Krizantem ve etrog fidelerinin küçük saksılara şaşırtma aşamaları.....	31
Şekil 4.1. Kesme krizantem yetiştiriciliği yapılan bir serada çiçeklerde geç açılma ve bitki lerde bodurluk görüntüsü (Tarsus).....	34
Şekil 4.2. Krizantem yapraklarında meydana gelen klorotik beneklenme belirtileri (Adana).....	35
Şekil 4.3. Saksılarda yetiştirilen krizantemlerdeki çiçek yapısındaki renk kırılmaları ve geç çiçeklenme (Adana).....	35
Şekil 4.4. Krizantem bitkisinden petal yaprak gelişimini tam tamamlamamış çiçeklerin belirtisi (Adana).....	36
Şekil 4.5. Krizantem bitkilerinin yapraklarında meydana gelen renk açılmalar ve sararma belirtileri.....	39
Şekil 4.6. Etrog bitkilerinde CEVd etmeninin neden olduğu yaprak epinasti belirtileri.....	39

- Şekil 4.7. CSVd-1H5-1R primerlerinin kullanıldığı %1.5 Agar jel görüntüsü.1, 3 ve 7 numaralı örnekler 3'lü viroid bant, 2, 4 ve 6 numaralı örnekler ise 2'li viroid bantı oluşturmuştur. M Marker.100 bç. (sırası ile örnekler 1:KriAd-5, 2:KriTa-4, 3:KriAd-38, 4:KriTa-11, 5:KriAd-24, 6:KriAd-12, 7:KriAd-27, -K:- kontrol)..... 42
- Şekil 4.8. Nested-PCR çalışmalarının ilk aşamasında CSVd etmenini tanıyan CSVd1F ve CSVd1R primerlerinin kullanılarak pozitif olarak belirlenen örneklerin agar jelde 253 bç uzunluğundaki görüntüsü. 1; KriAd-5, 2;KriAn-1, 3;KriAd-27 ve 4;KriAd-38, 5;KriTa-5 M;markör (50bç). 42
- Şekil 4.9. Nested-PCR çalışmalarının ikinci aşamasında CSVd etmenini tanıyan CSVd2F ve CSVd2R primerlerinin kullanılarak pozitif olarak belirlenen örneğin agar jelde 221 bç uzunluğundaki görüntüsü. 6'da KriAd-27 örneğine ait bant görülmektedir. 50 bç'lik markör kullanılmıştır..... 43
- Şekil 4.10. CSVd'nin nested-PCR ürününün çoğaltılması 44
- Şekil 4.11. CChMVd'nin negatif çıkan jel fotoğrafı(M: 50 bç'lik Markır, 1: Negatif kontrol)..... 45
- Şekil 4.12. CEVd1F ve CEVd2R primerlerinin kullanıldığı PCR çalışması. Örnekler Sırası ile 1;negatif kontrol 2; pozitif kontrol, 3;KriAd-5, 4;KriAd-27, 5;KriAd-38, 6;KriTa-4 ve 7;KriTa-9 izolatlarına ait 371 bç uzunluğundaki bandların görüntüleri 48

Şekil 4.13. Krizantemlerde HSVd'nin %1.5'luk agar jel üzerinde oluşturduğu bant görünümleri M Markör, 2,3,4 KriAd-38 ve 5,6,7 KriTa-4 izolatları.....	50
Şekil 4.14. KriAd-27 izolatının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer CSVd izolatlarıyla karşılaştırılması.	53
Şekil 4.15. Adana ilinden elde edilen KriAd-27 izolatının soy ağacı.....	54
Şekil 4.16. KriTa-4 ve KriAd-38 CEVd İzolatlarının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer CEVd izolatlarıyla karşılaştırılması.	55
Şekil 4.17. KriAd-38 ve KriTa-4 CEVd izolatları ile oluşturulan soy ağacı	55
Şekil 4.18. HSVd İzolatının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer HSVd izolatlarıyla karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.19. Krizantem bitkisinden elde edilen KriTa-4 HSVd izolatına ait soyağacı.....	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
BLAST	: Basic Local Aligment Search Tool
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
cDNA	: Complemeter Deoksiribonükleik asit
CEVd	: Citrus Exocortis viroid
CSVd	: Chrysanthemum stunt viroid
CChMVd	: Chrysanthemum chlorotik mottle viroid
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPPO	: European and Mediterranean Plant Protection Organization
FW	: Forward
G	: Guanin
gr	: Gram
HSVd	: Hop stunt virod
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
l	: Litre

M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
RE	: Reverse
RNA	: Ribonükleik asit
R-PAGE	: Return-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sp.	: Tür
sPAGE	: Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spp.	: Türler
T	: Timin
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TE	: Tris-EDTA
TNA	: Total Nükleik Asit
TT	: Ters Transkriptaz
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Chain Reaction
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Süs bitkileri yetiştiriciliği evre, bahçe ve Őehir düzenlemeleri bakımından oldukça önemli olan tarımsal üretime dahil görsellik bakımından tercih edilen bir ürün gurubudur. Süs bitkileri kullanım amaçlarına göre; kesme iek, iç mekân (saksılı) süs bitkileri, dış mekân (tasarım) süs bitkileri ve iek soğanları olmak zer 4 guruba ayrılmaktadır (Titiz ve ark., 2000). Dünya genelinde 2015 yılı itibari ile bir milyon yedi yüz elli iki bin seksen bir (1.752.081 ha) hektar alanda süs bitkileri yetiştirilmektedir (Kazaz ve ark., 2016).

Çizelge 1.1 belirtildiği gibi 2019 yılı süs bitkileri ekim alanları verilerine göre lkemizde elli iki milyon dört yüz yetmiş yedi bin üç yüz altmış iki (52.477.362) m²'lik alanda üretim yapılmaktadır (TÜİK, 2020). Bunun %23'i kesme iekilik için kullanılırken %3,7 si iç mekân (saksılı) süs bitkileri için kullanılmaktadır. Süs bitkileri üretim miktarımız olan 1 milyar 718 milyon 98 bin 240 adet bitkinin %63,6'sını kesme iek ve %3'ise iç mekân süs bitkisi olarak bildirilmiştir (TUİK,2020).

Çizelge 1.1. 2016-2019 yılları arası Türkiye'deki süs bitkileri üretim (adet) ve ekim alanı (m²) (TÜİK,2020).

Süs bitkileri, 2016-2019	Toplam	Kasımpatı (Krizantem)	Diğer kesme çiçekler	İç mekan süs bitkileri	Çiçek soğanları	Dış mekan süs bitkileri
Ekim alanı (m²)						
2016	48.580.907	637.215	11.312.022	1.312.793	597.305	34.721.572
2017	50.089.031	627.965	11.120.400	1.650.710	426.885	36.263.071
2018	51.802.644	755.465	11.164.752	2.081.527	493.930	37.306.970
2019	52.477.362	754.520	11.619.589	1.992.021	412.145	37.699.087
Üretim (Adet)						
2016	1.513.712.547	44.915.925	993.080.450	38.150.927	25.337.330	412.227.915
2017	1.619.027.841	44.476.525	1.006.108.435	56.049.665	21.833.825	490.559.391
2018	1.711.773.663	47.586.925	1.008.196.717	60.149.981	88.657.000	507.183.040
2019	1.718.098.240	47.677.050	1.045.656.893	51.669.029	62.537.229	510.558.039

Ana vatanı Japonya olan kasımpatı-krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) bitkisi hem kesme çiçekçilik hem de iç mekân (saksılı) süs bitkileri gurubu içinde sınıflandırılan ülkemizde en fazla üretimi yapılan süs bitkilerindendir. Ülkemizde bitki üretimini olumsuz etkileyen hastalık etmenleri her yıl milyonlarca ürünün imha edilmesine ve ekonomik olarak zarara uğramalara neden olmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden olan viroidler en küçük patojen olma özelliğindedir.

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

Günümüzde dünya çapında yapılan çalışmalar ile 30 civarında viroid hastalık etmeni birçok kültür bitkisinde saptanmış durumdadır. Aynı şekilde ülkemizde bazı ürün gruplarında viroid hastalık etmenleri daha önce yapılan

çalışmalarda belirlenmiştir (Önelge, 1994; Gümüş ve ark., 2007; Bostan ve ark., 2010, Şevik, 2015).

Bu çalışmanın konusu olan krizantem bitkilerinde bulunan viroid hastalıkları ilk kez Dimock (1947) tarafından varlığı virüs olarak bildirilmiştir. Ancak bu virüslerin karakterizasyonu konusunda herhangi bir bildirimde bulunulmamıştır.

Viroidler, protein kılıfı içermeyen, düşük moleküler ağırlıkta, dairesel, tek sarmallı patojenik RNA'lardır. Viroidler proteinleri kodlamaz veya değiştirmezler. Bu etmen grubu bitkilerde büyüme ve gelişme geriliğinin yanı sıra şiddetli ölümlere kadar değişebilen makroskobik belirtiler oluşturur. Şu ana kadar belirlenmiş en küçük patojen grubu olan viroidler, 246 ile 410 arasında değişen nükleotid (nt) sayısına sahip tek sarmal dairesel RNA molekülleridir. Biyolojik fonksiyonları için gerekli proteinleri kodlama yetenekleri yoktur. Bu nedenle replikasyonları tamamen konukçu hücreye bağımlıdır (Bussiere ve ark., 1996).

Viroidler replikasyon şekline göre *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* olmak üzere iki familyaya ayrılmakta ve bu iki familyada toplam 32 adet viroid türü tanımlanmış durumdadır (Di Serio ve ark., 2014).

Krizantem yetiştiriciliği dünyada ekonomik değere sahip süs bitkileri sektörünün önemli bir parçasıdır. Krizantem yetiştiriciliğinde *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ve *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)'leri bu bitki grubunu hastalandıran önemli viroid etmenlerindedir. Ancak bu viroidler dışında *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Hop stunt viroid* (HSVd) etmenleri de krizantem bitkilerinde karışım halinde veya tek olarak bulunmakta ve enfeksiyon oluşturabilmektedir. Ayrıca bu viroidler de ekonomik krizantem yetiştiriciliğini önemli ölçüde etkilemektedir.

Süs bitkileri yetiştiriciliği ve bunun içinde krizantem yetiştiriciliği son yıllarda gerek ülkemizde gerekse bölgemizde hızla artmaktadır. Ancak bu gruptaki bitkilerde bulunan viroid etmenleri üzerinde yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır.

Bu çalışmada krizantem bitkilerinde bulunan krizantem viroidlerinin Akdeniz Bölgesi'ndeki yetiştiricilik alanlarındaki durumu belirlenmeye çalışılmış ayrıca bu bitki grubunda bulunan viroidlerin moleküler ve biyolojik açıdan tanımlanmaları gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki patojeni viroidler

“Viroid” terimi ilk olarak Theodor Diener tarafından patates iğ yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığını vurgulamak için önerilmiştir. Araştırmacı bu hastalığa neden olan etmenin yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ve poliakrilamid jel elektroforezinin bir kombinasyonu ile, dahili marker RNA'ları kullanarak, enfeksiyöz RNA'nın, 2.5×10^4 ila 1.1×10^5 dalton arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip çeşitli etmenlerden oluştuğunu gözlemiştir. Etmenin kendini çoğaltamayacak kadar küçük genetik yapıya sahip olması ve protein kılıfının olmamasıyla virüs olamayacağını bildirmiştir (Diener, 1971).

Patates iğ yumru hastalığının etmeninin viroid olarak bildirilmesiyle Turunçgil cüceleşme hastalığı (Semancik ve Weather,1972) hemen ardından Krizantem bodurluk hastalığının (Diener ve Lawson,1973) etmen özelliklerinin düşük moleküler ağırlığa sahip enfeksiyöz RNA yapısında olduğu bildirilerek viroid olarak belirtilmiştir.

Viroidler dairesel tek sarmal RNA (ssRNA) yapısında olup 246 ve 401 nt arasında uzunluğa sahip bitki patojeni hastalık etmenleridir. Viroidler çoğalırken yuvarlanan çember mekanizmasını kullanmaktadır ve bu mekanizma asimetric ve simetric olarak 2'ye ayrılmaktadır. *Pospiviroidae* familyası asimetric yolu, *Avsunviroidae* familyasının ise simetric yolu kullandığı bildirilmiştir (Di Serio, 2014).

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) verilerine göre viroidlerin *Avsunviroidae* ve *Pospiviroidae* olmak üzere 2 familyada sınıflandırıldığı görülmektedir. Moleküler yapıları, çoğalma stratejileri ve konukçu hücredeki buldukları yerlerin farklılıkları bu iki familyayı birbirinden ayıran özelliklerdir. *Pospiviroidae* familyası üyelerinin moleküler yapısı olgun formdaki halleri dallanma göstermeyen çubuk şeklinde olduğu, bu yapının sağ ve sol terminal, merkezi korunmuş bölge, patojenite ve değişken bölge olmak üzere 5

farklı fonksiyonel bölgeye ayrıldığı bildirilmiştir (Keese ve Symons, 1985). Bu familyanın üyelerinin genom yapısında bulunan merkezi korunmuş bölge ve kendi kendine kesim yeteneğine sahip olmayan stabil çubuk şekilli yapılar oluşturduğu bildirilmiştir (Steger ve Riesner, 2003).

Avsunviroidae familyasının genom yapısı çekiç başı görünümlü ribozim oluşturan yapılarıyla kendi kendilerine kesim yeteneğine sahip oldukları ve korunmuş bölge içermedikleri bildirilmiştir (Fadda ve ark., 2003). İn situ hibridizasyon ve hücre kesiti çalışmaları ile *Pospiviroidae* familyasının çekirdekte çoğaldığını *Avsunviroidae* familyasının kloroplastta çoğaldıkları ortaya koyulmuştur. Böylece iki familyanın farklı hücre organellerinde çoğaldıkları bildirilmiştir (Navarro ve ark., 1999; Verhoven, 2010; Flores ve ark., 2003).

Günümüzde yeni gelişmiş moleküler tanılama yöntemleri ile tanımlanmış birçok bitki türünde bulunan enfeksiyöz ve latent olarak bulunan viroid türü keşfedilmiştir. Bitkilerde rapor edilmiş 8 cins içinde yer alan yaklaşık 32 tür viroid etmeni vardır. Bunlar ICTV verilerine göre oluşturulmuş Çizelge 2.1'de belirtilmektedir.

Çizelge 2.1. Bitki patojeni viroidlerin sınıflandırılması (ICTV,2020).

Grup	Familya	Cins	Tür	
Riboviria	Pospiviroidae	Abscaviroid	<i>Apple dimple fruit viroid</i>	
			<i>Apple scar skin viroid</i>	
			<i>Australian grapevine viroid</i>	
			<i>Citrus bent leaf viroid</i>	
			<i>Citrus dwarfing viroid</i>	
			<i>Citrus viroid V</i>	
			<i>Citrus viroid VI</i>	
			<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>	
			<i>Grapevine yellow speckle viroid-2</i>	
			<i>Pear blister cancer viroid</i>	
		Cocadviroid	<i>Citrus bark cracking viroid</i>	
			<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	
			<i>coconut tinangaja viroid</i>	
			<i>Hop latent viroid</i>	
		Coleviroid	<i>Coleus blumei viroid 1</i>	
			<i>Coleus blumei viroid 2</i>	
			<i>Coleus blumei viroid 3</i>	
		Hostuviroid	<i>Dahlia latent viroid</i>	
			<i>Hop stund viroid</i>	
		Pospiviroid	<i>Chrysanthemum stund viroid</i>	
			<i>Citrus exocortis viroid</i>	
			<i>Columnea latent viroid</i>	
			<i>Iresine viroid 1</i>	
			<i>Pepper chat fruit viroid</i>	
			<i>Potato spindle tuber viroid</i>	
			<i>Tomato apical stunt viroid</i>	
			<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	
		<i>Tomato planta macho viroid</i>		
		Avsunviroidae	<i>Avsunviroid</i>	<i>Avacado sunblotch viroid</i>
			<i>Elaviroid</i>	<i>Eggplant latent viroid</i>
			<i>Palemoviroid</i>	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>
				<i>Peach latent mosaic viroid</i>

Viroid etmenlerinin dünyanın hem tropik hem de ılıman bölgelerinde viroid hastalıklarına neden olmalarına rağmen, yüksek sıcaklıklarda şiddetli semptomları tetiklediği bildirilmiştir (Soliman, 2012).

Viroid ve virüs semptomlarının, birbirlerine benzerlik göstermesine karşın viroidlerin proteinleri kodlamadığı için genomik RNA yada ikincil yapılarına bağlı olarak hücrenin enzimlerini kullandığı bildirilmektedir. Bitkilerde görülen bodurlaşma (stunting) göze çarpan en tipik viroid belirtisi olmakla yapraklarda bozulma, damar aralarının daralması buruşukluk, kıvrırcıklaşma (epinasti), çeşitli derecelerde kloroz ve nekrozlar, yaprak saplarında kısılma-kalınlaşma, kabukta çatlama, kavlama, zamklanma, çukurlar ve çıkıntılar, yumrulara şekil bozukluğu (malformation) ve üreme ile ilgili organlar olan çiçeklerde renk kırılmaları, küçülme, geç açılma, meyvelerde renk ve şekil değişiklikleri, sayılarının azalması ve tohumlarda steril ve büyümüş çekirdek gibi semptomlara neden olduğu bildirilmiştir. Hastalık şiddetinin, konukçu bitkiye ve viroidin baz dizilimine göre değiştiği araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Hadidi ve ark., 2003; Skoric, 2017).

Bazı viroid ırkları belirti oluşturmadığı hücre içerisinde diğer bitki patojenlerinin aksine basit RNA replikonları gibi davrandığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber belirtilerin çevre koşullarına bağlı olduğu bitki patojeni virüslerde olduğu gibi enfeksiyon sırasında değiştikleri bildirilmiştir (Semancık, 2003).

Dünya üzerindeki Antartika kıtası hariç bütün kıtalarında viroid etmenleri bildirilmiştir. Meyve ağaçları (Avakado, asma, elma, armut, şeftali, turuncgil, hindistan cevizi), *Solanaceae* familyasına ait bitki türleri (Patates, domates, patlıcan, biber vb.), şerbetçi otu ve süs bitkileri olmak üzere birçok bitki grubunda bulunduğu ve ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Fagoaga ve ark., 1996; Hammond ve Owens, 2006; Verhoven, 2010; Hadidi ve ark., 2017).

Viroidlerin, süs bitkilerindeki ekonomik önemi, tüketilebilir ürün bitkilerinden geri planda kaldığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Süs bitkilerinde bilinen en önemli etmenler krizantemler üzerinde doğrudan etkili olan

CSVd ve CChMVd'leridir. Süs bitkilerinde bazı viroid enfeksiyonlarının latent olarak kaldığı bilinmektedir. Bununla birlikte latent enfeksiyonların dolaylı yoldan ticari etkilere sebep olabileceği örneğin, viroidle enfektelendiğinde ciddi kayıplar oluşturabilecek ana bitkiler için inokulum kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Verhoven ve ark., 2017).

Dünyada süs bitkilerinde doğal olarak enfekteli 12 adet viroid türü rapor edilmiştir. Bunlar; *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Coleus blumei viroid-I* (CbVd-1), *Coleus blumei viroid-II* (CbVd-2), *Coleus blumei viroid-III* (CbVd-3), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Iresine viroid-I* (IrVd-I), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Dahlia latent viroid* (DLVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Portulaca latent viroid* (PoLVd)'dir (Verhoven et. al., 2017).

2.2. Krizantem bitkilerinde bulunan viroid etmenleri

Günümüzde krizantem bitkilerini enfekte eden 6 adet viroid türü rapor edilmiştir (Çizelge 2.2). Krizantemlerde doğal olarak bulunan viroid türü 3 adet olarak bildirilmiştir. Bunlardan ilki krizantemlerde ekonomik kayıplara neden olan Krizantem bodurlaşma hastalığının (KBH) etmeni *Chrysanthemum stunt viroid* (Diener ve Lawson, 1973) dir. İkinci viroid ise Krizantem klorotik benek hastalığının (KKB) etmeni olan *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*'dir (Navarro ve Flores, 1997). Krizantemlerde doğal enfekteli olarak tespit edilen diğer viroid ise *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) olmuştur (Lemetty ve ark., 2011). Araştırmacılar *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus viroid-IV* (CVd-IV) ve *Hop stunt viroid* (HSVd)'lerinin deneysel konukçu olarak krizantem bitkilerine inokulasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Niblett ve ark., 1980).

Çizelge 2.2. Krizantem bitkilerinde bulunan bazı viroidlerin farklı varyant sayıları ve nükleotid uzunlukları.

Familyası\Cinsi	Türü	Varyant sayısı	Nükleotid uzunluğu
<i>Pospiviroidae</i> \ <i>Pospiviroid</i>	<i>Potato spindle tuber (PSTVd)</i>	109	341-364
	<i>Chrysanthemum stunt (CSVd)</i>	19	348-356
	<i>Citrus exocortis (CEVd)</i>	86	366-475
	<i>Hop stunt (HSVd)</i>	144	294-303
<i>Avsunviroidae</i> \ <i>Palemoviroid</i>	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle (CChMVd)</i>	21	397-401

CSVd etmeninin neden olduğu KBH ile ilgili ilk bulgular 1945 yılına dayanmaktadır. 1947 yılında Dimock tarafından bu hastalığın Amerika'da krizantem bitkilerinde ciddi verim ve ekonomik kayıplara yol açtığını bildirmiştir.

Brierly ve Smith (1949) Amerika'da krizantem bitkilerinde 1945 ve 1947 yılları arasında epidemi derecesinde zararlara neden olan KBH etmeninin virüs olabileceğini bildirmişlerdir.

Olson (1949) KBH etmeninin yaprak sürtünmesi ile bitkiden bitkiye taşınabildiğini tespit etmiş, Brierley (1950) ve Keller (1953) ise bu etmenin bitkiden bitkiye mekanik taşınmasını yapmış oldukları çalışmalarla desteklemişlerdir.

Brierley ve Smith (1951) etmenle bulaşık ve bulaşık olmayan aynı yaşta olan krizantem bitkilerini yan yana gelişimlerini izlediğinde hastalığın tipik belirtisinin bodurluk belirtisi olduğunu bildirmişler. Spesifik olan küçük yaprak belirtilerinin de eşlik ettiği bazı çeşitlerde gözlemişlerdir. Ayrıca yaprakların sık sık daha ince, normalden soluk yeşil, özellikle çiçek sapına doğru olan yaprakların normal bitki yapraklarına göre daha küçük olduğunu bildirmişlerdir. Bazı krizantem çeşitlerinin alt yapraklarının kenarlardan uçlara doğru kıvrılmaların olduğunu, yaprak kenarlarının yakınlarına doğru soluk noktaların yayıldığı, yaprak

boyutlarının normal bitkilere oranla daha küçük kaldığını ve Mistletoe çeşidinde etmenin en dikkat çekici yaprak belirtisi olan beyaz noktaların olduğunu belirtmişlerdir. Etmenin çiçekteki belirtilerini, bronz ya da kırmızı çiçekli çeşitlerin bazılarında petal çiçeklerinin renklerinin açık tonlara dönmesi, yeşil veya beyaz çiçekli çeşitlerin pembeleşmesi olarak gözlemlemiştir. Bu tanımlanan belirtilerin farklı krizantem çeşitleri üzerinde değişiklik gösterdiğini belirlemiştir.

Brierley (1952), KBH etmeninin ısıya son derece dayanıklı olduğunu bulmuş etmenle bulaşık Mistletoe çeşidi krizantem dokularının, kaynatıldıktan sonra bile bitkiye bulaşabildiğini bildirmiştir. Ayrıca etmenin alkolle işleme tabi tutmuş olduğu halde bulaşıcılığının korunduğunu tespit etmiştir.

Brierley (1953), etmenin deneysel konukçu bitkilerini bulduğu çalışmada 76 adet farklı tür ve çeşit bitkide çoğunlukla *Compositae* familyası olmak üzere 36 türün duyarlılığını ve 7 çeşidin 5'i *Chrysanthemum spp.* çeşitlerinden, 2'si ise cineraria (*Senesio cruentus*)'da gözle görülebilir belirtiler oluşturduğunu bildirmiştir. Brierley bu çalışmada cinerarianın yaprak yüzeyinde lokal inokulasyon sonucunda simptom gözlemlemiş olmasına rağmen simptomların değişkenlik gösterebileceğini bildirmiştir.

Hollings ve Stone (1973) yapmış oldukları çalışmada Krizantemlerde bodurluk hastalığının etmeninin viroid olabileceğinden bahsetmişler ve PSTVd, CEVd için kullanılan Gynura, domates ve etrog bitkilerine inokulasyon gerçekleştirmişler ancak herhangi bir simptom gözlemediklerini bildirmişlerdir..

Diener ve Lawson (1973) krizantemlerde bodurluğa, yapraklarında beneklenmelere neden olan etmen için misteol çeşidi krizantem ve cineraria bitkilerine inokulasyon gerçekleştirmiş ve bu bitkilerden elde edilen patojenin düşük ağırlıklı, tek iplikçikli, dairesel bir RNA molekülü olduğu belirleyerek etmenin viroid olduğunu bildirmişlerdir.

CSVd dairesel ve doğrusal bir yapıda görülebilmektedir. Palukalitis ve Symons (1980) CSVd'nin %15'lik bir kısmının doğrusal formda olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar CSVd'nin *Pospiviroidae* familyasına ait olduğu

belirlemişlerdir. Haseloff ve Symons (1981), CSVd'nin 356 nükleotit (nt) uzunluğunda olduğunu ve 19 varyantının bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu viroidin PSTVd ile %69 oranında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Gross ve ark., (1982) CEVd ile yapmış oldukları bir çalışmada CSVd ile %67 oranında benzer olduğunu belirlemişlerdir.

Kryczynski ve ark. (1988) Rutgers ve Najwczesniejszy çeşidi domateslerde CSVd'nin polen ve tohumla taşınabildiğini tespit etmişlerdir. Chung ve Pak (2008) CSVd'nin krizantem bitkilerinde de tohumla taşındığını ve polen taşınımının düşük olduğunu ortaya koymuşlardır.

CSVd dünya üzerinde 26 ülkede rapor edilmiştir (Yoon ve Palukaitis, 2013). Bu ülkelerin 15'i Avrupa (Avusturya, Belçika, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Fransa, Almanya, Bulgaristan, İtalya, Litvanya, Norveç, Polonya, İspanya, İsveç, Hollanda ve Birleşik Krallık)'da, 4'ü Asya (Çin, Hindistan, Japonya ve Güney Kore)'da, 2'si Afrika (Mısır ve güney Afrika)'daki 3'ü Amerika (Kanada, ABD ve Brezilya) ve 1'i Avustralya kıtasında olduğu bildirilmiştir (Palukaitis, 2017).

Netwong ve ark. (2020)'ı Tayland-Nakhon Ratchasima bölgesinden bodurluk, yapraklarda klorotik lekeler, çiçek yapısında küçülme ve yapısal bozukluk belirtileri gözlemlenen 23 adet krizantem bitki örneği toplamışlardır. Etmeni tanılamak için yapılan RT-PCR çalışması sonucunda bu ülkede ilk defa krizantem bitkilerinde doğal enfekteli olarak CSVd etmenini tespit etmişlerdir.

CSVd'nin günümüze kadar doğal olarak enfekteli 10 adet konukçu bitkisi olduğu bildirilmiştir. Bunlar; *Asteraceae* familyasından *Chrysanthemum morifolium* (Diener and Lawson, 1973), *Ageratum sp.* (Henkel ve Sängner, 1995), *Petunia sp.* (Verhoeven ve ark., 1998), *Argyranthemum frutescens* (Menzel ve Maiss, 2000), *Verbena sp.*, *Vinca major* (Bostan ve ark., 2004), *Solanum jasminoides* (Verhoeven ve ark., 2006), *Dahlia sp.* (Nakashima ve ark., 2007) ve *Pericallis hybrida* (Verhoeven, 2010)'dur.

2019 yılında Matsushita ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucunda CSVd'nin Rusya'da patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda bulunan patates bitkilerinde latent olarak doğal enfekteli bir şekilde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Gobatto ve arkadaşlarının 2019 yılında Breziya'nın Sao Paula bölgesindeki krizantem üretimi yapılan yerlerde yapmış oldukları çalışmada 17 adet yabancı ot çeşidinin CSVd'nin taşıyıcısı olduğunu bildirmişlerdir.

2006 ve 2009 yılları arasında Türkiye de yapılan bir çalışmada patates, domates ve bazı süs bitkilerinde *Pospiviroid* familyasına ait viroid etmenleri tespit edilmiştir (Bostan ve ark. 2010). Bu çalışmada araştırmacılar toplamda 1.766 örnek olmak üzere, 1.047'si patateslerden 258'i domateslerden ve 461 adet süs bitkilerinden örnekler incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 891 patates yumrusunun 6'sı PSTVd ile bulaşık; 154 krizantem bitkisinden ise 2'sinin CSVd ile bulaşık olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile araştırmacılar Türkiye'de CSVd'yi ilk kez rapor etmişler ancak sekans verilerini belirtmemişlerdir.

CSVd nin moleküler tanılama yöntemlerinden RT-PCR ile tanınması Kusunoki ve arkadaşları tarafından 1993 yılında gerçekleştirilmiştir. Etmenin ayrıca Return poliakramid jel elektroforez (r-PAGE) (Watermayer, 1984), Dot blot hibridizasyonu (Candresse ve ark., 1990) ve Tissue Print Hibridizasyonu (Hooftman et. al., 1996) yöntemleri ile de teşhis edilebildiği araştırmacılar tarafından belirlenmiştir.

Krizantem klorotik benek hastalığı (KKB) ilk olarak Yellow Delaware (*Chrysanthemum morifolium*) krizantem çeşidinde New York eyaletinde bildirilmiştir (Dimock ve Geissinger, 1969).

Dimock ve arkadaşları (1971) KKB hastalığının Yellow Delaware, Delaware, blue ridge, deep ridge ve tinker bell çeşidi krizantemlerde yaprak üzerinde belirgin noktalar ve bunları izleyen sararmaları, Dark red star, giant betsy ross, hurricane, icecap, madalav, torch, ruby mound ve rosey nook çeşitlerinde yapraklarda beneklenmeler, renk açılmaları ve gelişim geriliği, Knob hill, matador,

mermaid, red cab, winter carnival, zonta çeşitlerinde yapraklarda klorotik beneklenme, damar renginin açılması, tüm bitkide orta derecede sararma ve Albatross, blue chin, bright golden anne, fanfare, fred shoemith, good news, indianapolis ve 18 bahçe varyetesinde hiçbir simptom belirtisine rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Navarro ve Flores (1997) KKB hastalığının etmeninin moleküler karakterizasyonunu Dot blot hibridizasyon ve northern blot hibridizasyon yöntemleri ile genomik RNA'sının diziliminin 399 nt'den oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Nükleotid dizisinin 87 tane Adenin (A) (%21,8), 112 adet Guanin(G)(%28,1), 109 adet Sitozin (C) (%27,3) ve 91 adet Urasil (U) (%22,8) bazından meydana geldiğini belirlemişlerdir. Bu hastalığın etmeninin viroid olduğunu bildirmişler ve etmeni *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*'i (CCHMVd) olarak adlandırmışlardır. Etmenin *Avsunviroidae* familyasından *Pelamoviroid* cinsi içerisinde sınıflandırılması yapılmıştır.

398-401 nt içeren genom yapısına sahip etmenin 25 varyantı olduğu bilinmektedir. Belirti gösteren (S) ve belirti göstermeyen (NS) 2 ırkı bulunmaktadır. NS ırkı çiçek gelişiminin geciktirdiği ve tüm üretim alanlarında görülebilen ihtimalinin fazla olması nedeni ile üreticileri ekonomik kayıplara uğratabileceği bildirilmiştir (Flores ve ark., 2003).

Etmenin deneysel olarak taşınması ilk kez hastalıklı bitkiden alınan dokunun sağlıklı bitkiye aşılması ile gerçekleştirilmiştir (Dimock ve ark., 1971).

Krizantemlerde KKB hastalığı ABD'deki ilk bildiriminden sonra Danimarka, Fransa ve Hindistan'da bildirilmiştir (Horst, 1987). Hastalığın etmeni belirlendikten sonra ise Güney Kore (Chung ve ark., 2006) ve Çin (Zhang et. al., 2011)'de de etmenin bildirimi yapılmıştır. Aynı zamanda etmenin NS ırkını Japonya ve Hollanda'da tanımlamışlardır (Hosokawa ve ark., 2005; Yamamoto ve Sano, 2006).

Krizantemlerde bulunan CChMVd etmeni moleküler yöntemlerden RT-PCR (De la Pena ve ark., 1999) ve indikatör bitki olarak Yellow Delaware, Bonie

Jean Deep Ridge krizantem varyetelerinin kullanıldığı biyolojik indeksleme yöntemi ile de tanımlanmıştır (Navarro ve Flores, 1997). Günümüzde ise farklı RT-PCR yöntemleri ile tanımlamalarının yapılmakta olduğu bildirilmiştir (Flores ve ark., 2017).

Exocortis hastalığı ilk kez 1948 yılında tanımlamışlar ve anaç olarak kullanılan üç yapraklı (*Poncirus trifoliata*) üzerinde kabuk kavlamaları belirtileri oluşturduğunu bildirmişlerdir (Fawcett ve Klotz, 1948). Ülkemizde ise hastalığın varlığını ilk olarak Norman (1963) ve Moreira (1965) bildirmiştir. Semancık ve Weather (1972), Exocortis hastalığının belirtilerini gösteren ağaçlarda düşük moleküler ağırlığa sahip enfeksiyöz RNA moleküllerinin bulunduğunu ve etmenin viroid olduğunu bildirmişler. Etmeni *Citrus exocortis viroid* (CEVd)'i olarak isimlendirmişlerdir. CEVd 'in genom yapısının 371-410 nükleotid uzunluğunda değişmekte olduğu ve *Pospiviroidae* familyasının *Pospiviroid* cinsi içerisinde sınıflandırıldığı bildirilmiştir (DuranVila, 2017).

CEVd Turunçgillerde üç yapraklı ve türlerinde ve rangpur laymında (Weather ve Calavan, 1961) hastalık belirtileri oluşturmakla birlikte bütün turunçgil türlerini ve çeşitlerini enfekte edebildiği bildirilmiştir (Roistacher, 1991).

Turunçgiller dışında domates (*Lycopersicon esculentum*), Havuç (*Dacus carota*), Brassica napus, patlıcan (*Solanum melongena*), bakla (*Vicia faba*), asma (*Vitis sp.*) ve bazı süs bitkilerinde (*Verbena spp.*, *Impatiens sp.*, *Solanum jasmonoides*) doğal olarak enfekte olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Fagoaga ve ark., 1995; Fagoaga ve DuranVila, 1996; Mishra ve ark., 1991; Flores ve ark., 1985; Bostan ve ark., 2004; Verhoeven, 2008a-b; Singh ve ark., 2006).

Krizantem bitkisini CEVd için indikatör bitki olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (DuranVila ve ark., 1988).

Bu etmenin dünyanın turunçgil yetiştirilen tüm ülkelerinde bulunduğu yapılan indeksleme çalışmaları sonucunda araştırmacılar tarafından ortaya koyulmuştur (Semancık ve DuranVila, 1999).

Ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunç anacı üzerinde aşılı olan turunçgil çeşitlerinde etmenin latent enfekteli ve bahçelerde bulaşıklık oranının yoğun olduğunu bildirmişlerdir (Güllü, 1989; Önelge, 1994).

Şerbetçi otu cücelik hastalığının ilk olarak Japonya'da şerbetçi otu üretim alanlarında ortaya çıktığını ve 1960'lı yıllarda artış gösterdiğini bildirmişlerdir (Yamamoto ve ark., 1973). Sasaki ve Shikata (1977), ilk kez hastalık etmenini *Hop stunt viroid* (HSVd)'i olarak tanımlamışlardır. *Pospiviroidae* familyasında *Hostuviroid* cinsi içerisinde sınıflandırılan HSVd'i tek iplikli, sirküler yapıda ve 294-304 adet nükleotid içeren RNA moleküllerinden oluştuğu bildirilmiştir (Flores ve ark., 2005).

Bazı turunçgil türlerinde önceleri Cachexia/Xyloporosis adlı hastalığın etmeni olarak bilinen *Citrus viroid-II* (CVd-II) ve Hollanda'da varlığı tespit edilen *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd)'inin varyantı olduğu bildirilmiştir (Sano ve ark., 1984).

Şerbetçi otu, hıyar, asma, narenciye, erik ve şeftali bitkilerinden izole edilen izolatları arasında yapılan sekans diziliminin karşılaştırılması ile etmenin 5 filogenetik grup (erik tipi, asma\şerbetçi otu tipi, turunçgil tipi, erik-turunçgil tipi ve erik-şerbetçi otu\cit3 tipi) altında sınıflandırılabilceği araştırmacılar tarafından ortaya koyulmuştur (Shikata 1990; Kofalvi ve ark., 1997; Amari ve ark., 2001; Hataya, 2017).

Ülkemizde turunçgil bitkileri başta olmak üzere nar, kayısı, badem, kiraz ve asma gibi bitki türlerinde bulunduğu bildirilmiştir (Önelge, 2000; Amari ve ark., 2000; Sipahioğlu ve ark., 2002; Torres ve ark., 2004); Sipahioğlu ve ark., 2006; Gazel ve ark., 2006; Gümüş ve ark., 2007; Gümüş ve ark., 2008; Gazel ve ark., 2008a; Gazel ve ark., 2008b; Gazel ve ark., 2008c).

Biyolojik testlemelerinde kullanılan Hıyar bitkisi en yaygın kullanılan indikatör bitkisi olarak bildirilmiştir. 25-30C arasındaki sıcaklık koşullarında 3-4 hafta içerisinde patojenin inokule edildiği hıyar bitkisinde yapraklarda kıvrılma,

damarlarda renk açılmaları ve bodurlaşma gibi belirtilerin oluşturduğunu bildirmişlerdir (Sasaki ve Shikata, 1977).

HSVd'nin Dot Blot ve Northern Blot nükleik asit hibridizasyon, Poliakrilamid jel elektroforez türleri (PAGE, r-PAGE) (Li ve ark., 1995) ve RT-PCR (Yang ve ark., 1992) gibi yöntemlerle tanılanmasının doğruluk ve hızlılık açısından daha kullanışlı olduğunu belirtilmektedir.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller

Bu alışma Akdeniz Bölgesi'nin Adana, Mersin ve Antalya illerinde park ve bahçelerinde bulunan, süs bitkisi olarak üretilen ve satılan krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca marketlerde satışta olan saksılı krizantem bitkileri, kesme iek olarak satılan bitkiler ve piyasada satışta olan ticari krizantem tohumları da materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyaller

Biyolojik indeksleme çalışmalarında bitkisel materyaller olarak doku kültüründen elde edilmiş olan Krizantem fideleri (*C. morifolium* Ramat. türüne ait 'sprey krizantem' çeşidi olan 'Bacardi') ve tohumdan yetiştirilmiş Etrog citron (*Citrus medica* L.) bitkileri kullanılmıştır. Krizantem bitkileri Antalya'da bulunan özel bir doku kültürü laboratuvarından temin edilmiştir.

Krizantem ve etrog bitkilerinin yetiştirilmesinde steril torf, perlit, toprak, viyol ve plastik saksılar kullanılmıştır. Bitkilerin sıcaklık isteklerinin yerine getirilmesi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fak. Bitki Koruma ABD. binası iklimlendirme odalarında gerçekleştirilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları sırasında etmenin tanımlanmış olduğu krizantem rneklerinin Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyon çözeltileri, şıngıncu, latex eldiven, %2'lik Sodyum hipoklorid zeltisi, 1X TKM tamponu çözeltisi, saf-steril su, parafilm bantlar, viyoller, plastik saksılar olmak üzere çeşitli materyaller kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler tanılama yöntemlerinde kullanılan materyaller**3.1.3.1. Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan materyaller**

TNA ekstraksiyonu çalışmaları için; Antalya, Adana ve Mersin illerinden toplanan krizantem bitki örnekleri, farklı markalara ait paketlenmiş krizantem tohum örnekleri, hassas terazi, CTAB tampon çözeltisi, havan, dvc, tüpler (1,5ml-2ml), rak, pipet, pipet ucu, sıcak su banyosu, santifirj cihazı, vortex, kloroform: izoamil alkol (24: 1), izopropanol, TE tamponu çözeltisi %70'lik etil alkol, saf su cihazı, derin dondurucu (-20C), etüv ve otoklav gibi laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır.

3.1.3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) alışmalarında kullanılan materyaller

Bu alışmanın Ters transkriptaz (RT) aşamasında thermal cycle cihazı, ters transkriptaz (RT)-enzim, 5x tampon çözeltisi, dNTP zeltisi, Revers primerler (izelge 3.1), DTT zeltisi, steril distile su, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, vorteks, buz makinesi, santrifirj cihazı ve tp (0.2 ml) gibi materyaller kullanılmıştır.

Çizelge 3.1.RT aşamasında kullanılan primer

Primerler	Sekans dizilimi
Random Primer (Hexamer)	NNNNNN

Çalışmanın PCR aşamasında kullanılmış olan materyaller, RT aşamasından sonra elde edilen cDNA'lar, DreamTaq Green (ThermoFisher), Saf distile steril su, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, vorteks, buz makinesi, santrifüj cihazı, tüp (0.2ml) ve primerler (izelge 3.2) olmuştur. Ayrıca jelden yapılan purifikasyon çalışmasında Roche Moleculer Biochemicals-High Pure PCR Pruduct Prification Kit'i kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR ve nested-PCR aşamalarında kullanılan primerler.

Viroid-Primer	Sekans Dizilimi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	oğaltılan Bölge\Uzunluk	
CSVd-1H5	5' TTCTTGTAAGCAGCAGGGT 3'	55.3	55-36	Shiwaku et. al., 1996
CSVd-1R	5' AAAGAAATGAGGCGAAGAAGTC 3'	56.5	56-77	
CChMVd-2R	5' AAAGGACCGGAACTGGATCT 3'	57.3	217-236	Hosokawa et al. 2005
CChMVd-2F	5' ATCCATGACAGGATCGAAAC 3'	55.3	29-48	
HSVd-CVd.IIc	5' GGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGTC 3'	64	271-288	Reanwarakorn ve Semancik, 1998
HSVd-CVd.IIh	5' GGGGCAACTCTTCTCAGAATCC 3'	64	283-302	
CEVd-FI	5' GTGCTCACCTGACCCTGCAGG 3'	60	371	nelge, 1997
CEVd-RII	5' ACCACAGGAACCTCAAGAAAG 3'	60		
CSVdF	5' CAACTGAAGCTTCAACGCCTT 3'	58	253	Hosokawa ve ark., 2004
CSVdR	5' AGGATTACTCCTGTCTCGCA 3'	59		Hosokawa ve ark., 2004
CSVd-2F	5' CCAATCTTCTTTAGCACCGG 3'	65	221	Hosokawa ve ark., 2004
CSVd-2R	5' AGTGGGGTCCTAAGCCCCAA 3'	55		Hosokawa ve ark., 2004

3.1.3.3. Elektroferez çalışmasında kullanılan materyaller

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan ürünler, %1-1,5'luk agar jel, mikrodalga fırın, pleyt, g nitesi cihazı, elektroferez tankı, 1X TAE ortam çözeltisi, pipet ve pipet ucu gibi materyaller bu çalışmada kullanılmıştır. Görüntüleme aşamasında ise etidyum bromid zeltisi, UV görüntüleme cihazı, saf su ve spatula kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Çalışmada kullanılacak olan bitkisel materyalin seçilmesi

Çalışmada kullanılan krizantem bitkisi rnekleri, Antalya, Adana ve Mersin illerinden alınmıştır. Örnekler alınırken viroidlerin spesifik belirtilerini gösteren bodurluk, yapraklardaki renk açılmaları, yapraklarda sarı beneklenmeler, iek yapısındaki anormallikler (şekil 3.1), petal yapraklarda renk kırılmaları, küçük iek yapısı, iek oluşumunda gecikmeler gibi belirtiler gözlemlenerek seçilmiştir.



şekil 3.1. Tarsus ve Adana illerinden alınan örneklerde görülen petal yapraklardaki bozukluk belirtileri

3.2.2. Bitkisel materyallerin alımı

Krizantem bitkilerinden yapraklarda sararma, bitkilerde bodurluk, yapraklarda beneklenme, iek yapısında bozulma, petal yaprakta renk açılmaları, geç çiçeklenme gibi viroid etmeni kaynaklı hastalıkların karakteristik belirtilerini gösteren örnekler kesme iek ve saksılı olarak yetiştiriciliği yapılan seralardan, iek mezatı, süs bitkisi satış noktaları, peyzaj materyali olarak kullanılan yerler parklar, refüjler ve ev bahçelerinden alınmıştır.

Adana ilinden 41 rnek, Antalya ilinden 2 örnek ve Mersin ilinden 13 örnek olmak üzere toplamda 56 adet hastalık belirtisi ve besin elementi noksanlığı gösteren krizantem bitkisi alınmıştır. Alınan rnekler poşet içerisinde alınıp etiketlenmiştir. Etiketlenen rnekler buz içerisinde muhafaza edilerek TNA

ekstraksiyonuna kadar buzdolabında muhafazası sağlanmıştır. Ayrıca tohum çalışmaları için 10 farklı markaya ait paket içerisindeki tohumlar viroid etmenleri açısından testlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma materyalini oluşturan krizantem bitkileri ve bunlar üzerinde gözlenen simptomlar

rnek No	Alındığı Yer	Simptomları
KriTa-1	Tarsus-Mersin	Yapraklarda sararma
KriTa-2	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-3	Tarsus-Mersin	Yapraklarda beneklenme
KriTa-4	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk, petal yaprakta renk açılmaları
KriTa-5	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-6	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-7	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-8	Tarsus-Mersin	iek yapısında bozulma
KriTa-9	Tarsus-Mersin	iek yapısında bozulma
KriTa-10	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-11	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-12	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriTa-13	Tarsus-Mersin	Bitkide bodurluk
KriAd-1	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-2	Adana	Bitkide bodurluk, petal yaprakta renk açılmaları
KriAd-3	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-4	Adana	Bodur bitki
KriAd-5	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-6	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-7	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-8	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-9	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-10	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-11	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-12	Adana	Bodur bitki

Çizelge 3.3(devamı)

KriAd-13	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-14	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-15	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-16	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-17	Adana	Geç ieklenme
KriAd-18	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-19	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-20	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-21	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-22	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-23	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-24	Adana	Geç ieklenme
KriAd-25	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-26	Adana	Yaprakta renk açılmaları
KriAd-27	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-28	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-29	Adana	Bitkide bodurluk
KriAd-30	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-31	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-32	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-33	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-34	Adana	Bodur bitki
KriAd-35	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-36	Adana	iek yapısında bozulma
KriAd-37	Adana	Yapraklarda sararma
KriAd-38	Adana	Yapraklarda sararma
KriAd-39	Adana	Yapraklarda beneklenme
KriAd-40	Adana	Yapraklarda sararma
KriAd-41	Adana	Geç ieklenme, iek yapısında bozulma
KriAn-1	Antalya	Geç ieklenme, iek yapısında bozulma
KriAn-2	Antalya	Bitkide sararmalar, bitkide bodurluk

3.2.3. TNA ekstraksiyonu alışmaları

Krizantem bitkilerinde bulunan viroidlerin tanınması için CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tampon çözeltisi temelli total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon alışmaları Murray ve Thompson

(1980)'e göre modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışmalar Çukurova Üniversitesi Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri laboratuvarında yürütülmüştür. Toplanan bitkilerden viroid saflaştırılması her bir örnek için aşağıda verilen protokole göre yapılmıştır.

- Krizantem örneklerinin yapraklarından 400 mg miktarında alınarak 1:10 m/v CTAB ortamı eklenmiş ve homojen bir görüntü oluşana kadar ezilmiştir.
- Ezilen örneklerin öz suları 2 ml'lik tüplere 2 ml miktarında olacak şekilde alınmıştır.
- Örnekler 65°C'de 60 dakika boyunca sıcak su banyosunda ısıtılmıştır.
- Isıtılan örnekler 10.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüpte iki faz oluşmuştur. Bu fazlardan bitki dokusu içermeyen üst bölgeden 1ml alınarak 2 ml'lik başka bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 1 ml Kloroform: İzooamil alkol (24:1) eklenmiş iyice çalkalanmıştır.
- Örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra 750 µl üst fazdan alınarak 1,5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Üzerine 450 µl soğuk 2-isopropanol eklenip kibarca 2 defa karıştırılmıştır. Sonrasında örnekler -20°C'ye alınmış ve 30-60 dakika inkübe edilmiştir.
- Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpten sıvı kısım dikkatli bir şekilde çöpe boşaltılmıştır.
- Tüpün tabanına çöken katı fazın üzerine %70'lik etanol eklenmiştir ve 13.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında dikkatli bir şekilde %70'lik etanol boşaltılmıştır.
- Örnekler hava yolu ile kurutulmuştur ve katı kısım 100 µl 1XTE ortamı ile çözdürülmüştür.

- Elde edilen TNA ekstraksiyonları derin dondurucuda -20°C'de kullanılanana kadar saklanmıştır.

3.2.4. Moleküler alışmalar

3.2.4.1. RT-PCR (Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi) alışmaları

3.2.4.1.(1). Tamamlayıcı DNA sentezi (cDNA)

Çalışmanın ilk aşamasında tek iplik RNA yapısında olan viroidlerin RT enzimi yardımıyla cDNA sentezlemesi yapılmıştır. Bu sentezleme aşağıdaki Revers1 ve Revers 2 aşamalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Revers 1

- ✓ 200 µl'lik tüplere her bir örnek için;
 - ✓ 1µl dNTP,
 - ✓ 1µl Random Primer\Revers Primer,
 - ✓ 6µ ddH₂O ve
 - ✓ 4µl Total Nükleik asit rneği eklenmiştir.
- ✓ Thermo cycle cihazında 95°C'de 3 dakika çalıştırılmış ardından örnekler 10 dakika buzda bekletilmiştir.

Revers 2

- ✓ Elde edilen örnekler üzerine sırası ile;
 - ✓ 4µl 5X buffer,
 - ✓ 2µl 0,1 DTT,
 - ✓ 0,2µl RT enzim ve
 - ✓ 1,8 µl ddH₂O eklenmiştir.
- ✓ Elde edilen rnler 42°C'de 40 dakika ve 70°C'de 15 dakika bekletilmiştir.

3.2.4.1.(2). PCR aşaması

- ✓ Buz zerindeki steril 200µl'lik tp içerisine her bir örnek için;

- 1µl Revers Primer,
 - 1µl Forward Primer,
 - 8,5µl ddH₂O ve
 - 12,5µl Dream Taq eklenmiş ve kısa santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üzerine 2 µl cDNA eklenerek hacim 25µl'ye tamamlanmıştır
- ✓ Kısa santrifüj yapılarak karıştırılan ürünler thermo cycle cihazına yerleştirilmiştir.
- ✓ Kullanılan bazı primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PCR koşulları :

ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır.

- ✓ Elde edilen tüm PCR ürünleri, elektroforez ve Nested-PCR çalışmalarına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Nested-PCR aşamaları

Ayrılma Sıcaklığı	94°C	5 dakika	1 döngü
Bağlanma Sıcaklığı	94°C	30 saniye	35 döngü
	55 - 64°C	30 saniye	
	70°C	1 dakika	
Uzama Sıcaklığı	72°C	10 dakika	1 döngü

Çalışmada bazı örnekler CSVd için Hossokawa ve ark, (2004)'nın yapmış oldukları Nested-PCR çalışmalarına göre yürütülmüştür. PCR primerlerinin kullanılmış olduğu PCR çalışmasında CSVd-2F ve CSVd-2R primerleri ile ikinci bir PCR yürütülmüştür. Elde edilen DNA ürünü agar jel elektroforez işlemi ile değerlendirilmiştir.

3.2.5. Elektroforez çalışmaları ve örneklerin görüntülenmesi

Bu çalışma Önelge (1997)'ye göre yapılmıştır. Çalışma agar jelin hazırlanması, elektroforez cihazında jel yüklemesi ve ethidium da bekletilen jelin UV de görüntülenmesi aşamalarından oluşmuştur.

%1,5'luk agar jel aşağıda verilen yönteme göre hazırlanmıştır.

- ✓ 100ml 1XTAE ortamı çözeltisi üzerine 1,5 mg toz agar eklenerek karışım homojen bir görüntü alınca kadar mikrodalga fırında çözdürülmüştür.

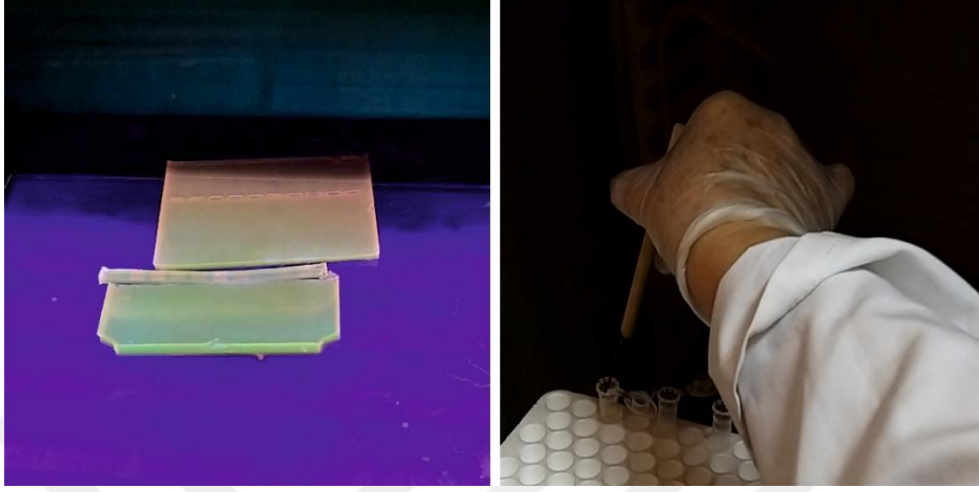
Eritilen agar jel karışımı pleylere dökülmüş ve jel donduğunda 1X TAE ortamı bulunan elektroforez küvetine yerleştirilmiştir.

Jel üzerinde bulunan deliklere elde edilen ürünler ve markır yüklenmiştir. Elektroforez cihazı 120 Volt ve 480 Miliamperde 30 dk boyunca çalıştırılmıştır. Elektroforez işlemi bittikten hemen sonra agar jel etidyum bromid çözeltisi içerisinde 10dk boyunca bekletilmiştir.

Daha sonra UV ışını yardımı ile jel görüntülemesi yapılmış ve fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.6. Jel Üzerinden Viroid Saflaştırılması

Çoklu bant oluşturan örneklerden bir kısmı jel üzerinden kesilererek Roche Moleculer Biochemicals-High Pure PCR Product Prification Kit'i kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem firmanın önerdiği basamaklara göre yapılmıştır.



Şekil 3.2. Jelden pürifiye iŐlemelerinin aşamaları

3.2.7. Sekans analizi ve verilerin karşılaştırılması

Jel görüntülemesi sonucunda viroid etmeninin varlığının kesinleŐtiđi PCR rnleri aynı koşullarda PCR uygulanarak 200µl hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örneklerin saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla adana ilinde bulunan MOLGENTEK firmasına gönderilmiştir.

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

Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri ‘‘MEGA X VERSION 10.0.2’’ (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak ‘‘Neighbour Joining’’ metodu ile sınıflandırılmıştır (Kumar ve ark., 2018).

3.2.8. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları

3.2.8.1. Biyolojik indekslemede kullanılacak bitkilerin yetiştirilmesi

Biyolojik indeksleme çalışmalarında krizantem ve etrog citron (*Citrus medica* L.) bitkileri kullanılmıştır. CSVd ve CEVd etmenlerinin biyolojik

indeksleme yöntemi ile tanısı sağlıklı krizantem ve etrog citron bitkileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Steril ortamda doku kültüründe yetiştirilmiş olan krizantem fideleri viyollere 1:1:1 oranındaki toprak, torf ve ponza taşı karışımına aktararak çoğaltılmıştır. Etrog citron bitkileri tohumdan yetiştirilerek elde edilmiştir. Bitkilerin gelişimi ve indeksleme çalışmaları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Turunil Virüsleri Laboratuvarı İklimlerme odasında gerçekleştirilmiştir.



şekil 3.3. Doku kültüründen elde edilmiş olan açık köklü krizantem fideleri.



şekil 3.4. Doku kültüründen elde edilen sağlıklı krizantem fidelerinin dikim aşamaları.



Şekil 3.5. Krizantem ve etrog fidelerinin küçük saksılara Şaşırtma aşamaları

3.2.8.2. Hastalık etmeninin bulaşık olduğu TNA'ların seçimi

Toplanan krizantem örneklerinin yaprak, gövde ve çiçeklerinde CSVd, HSVd ve CEVd etmenlerinin karakteristik olarak oluşturduğu simptomları gösteren bitkilerin TNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Yapılan ekstraksiyon sonrasında pozitif bulunan bitkilerden 3'Őer adet örnek biyolojik indeksleme çalışmasına alınmıştır.

3.2.8.3. Hastalığın Bitkilere İnokulasyonu

Tohumdan yetiştirilen etrog citron bitkileri ve doku kültüründen yetiŐtirilip çoğaltılan krizantem indikatör bitkilerine mekanik olarak gövde izme (Stem Slash) yöntemi ile patojen bulaŐtırılması yapılmıştır.

Çalışmada 8 yapraklı hale gelen krizantem bitkilerinin alt kısımdaki 4 yaprak koparılarak steril Őırınga ucu ile gövdeye çizikler oluŐturulmuŐtur. Oluşturulan bu çizikler zerine TKM buffer ile ½ oranında sulandırılmıŐ TNA zeltisi damlatılmıŐtır. Gövdenin nemini koruması için parafinle sarılmıŐtır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Krizantem bitkilerinde viroid belirtilerine ilişkin sera ve satış yeri gözlemleri**

Sera ziyaretlerinde özellikle krizantem viroidlerinin oluşturduğu simptomlar aranmış ve bunun yanında diğer diğer viroid etmenleri için de simptomolojik gözlemler yapılmış ve örnekler toplanmıştır.

Simptomolojik araştırmalar sırasında örnek toplanırken yapılan gözlemlerde ilk aranılan simptom CSVd ve CChMVd'nin oluşturduğu bodurluk ve yapraklardaki klorotik renklenmeler olmuştur. Yapılan araştırmada çiçek yapısındaki geç gelişmeler, petal yapraklardaki renk kırılmaları, normalden daha küçük çiçek yapıları, gövde yapısında boğum aralarının ksalması dolayısıyla bodur bir görünüm oluşması, yaprak sararması ve yapraklarda klorotik beneklenmelerinve besin elementi noksanlıklarının gözlenmiş olduğu bitkilerden örnekler toplanmıştır

Çizelge 4.1. de gösterildiği gibi Adana ilinden 41 örnek, Antalya ilinden 2 örnek ve Mersin ilinden 13 örnek olmak üzere 56 adet hastalık belirtisi gösteren krizantem bitkisi çalışmaya alınmıştır. Toplanan örneklerde, bitkilerinde bodurluk (Şekil 4.1.), yapraklarında sararma ve beneklenme (Şekil 4.2.), geç çiçeklenme (Şekil 4.1.), çiçek yapısında bozulma (Şekil 4.4.) ve petal yaprakta renk açılmaları (Şekil 4.3.) gibi simptomlar gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. Akdeniz bölgesinde bulunan illerden toplanan bitki örneklerinde gözlemlenen hastalık simtomları ve örnek sayıları (+ Belirti mevcut, - Belirti mevcut değil)

Simptom	Mersin-Tarsus	Adana	Antalya-Varsak
Bitkide bodurluk	+	+	+
Yapraklarda sararma	+	+	+
Yapraklarda beneklenme	+	+	-
Geç çiçeklenme	+	+	+
Çiçek yapısında bozulma	+	+	-
Petal yaprakta renk açılmaları	+	+	-
Toplam Örnek Sayısı	13	41	2



Şekil 4.1. Kesme krizantem yetiştiriciliği yapılan bir serada çiçeklerde geç açılma ve bitki lerde bodurluk görüntüsü (Tarsus)



Şekil 4.2. Krizantem yapraklarında meydana gelen klorotik beneklenme belirtileri (Adana)



Şekil 4.3. Saksılarda yetiştirilen krizantemlerdeki çiçek yapısındaki renk kırılmaları ve geç çiçeklenme (Adana)



Şekil 4.4. Krizantem bitkisinden petal yaprak gelişimini tam tamamlamamış çiçeklerin simptomsu (Adana)

Arazi çalışmalarında krizantem bitkilerinde gözlenen simptomlar literatürde hastalıkla ilgili belirtilen simptomlara benzerdir. Krizantemlerde en fazla gözlenen simptom bodurluk simptomsu olmuştur. Bu simptom bölgedeki her üç ilde gözlenmiştir. İkinci en yaygın simptom ise yapraklarda kloroz (sararma) ve geç çiçek açımı simptomlarıdır. Petal yapraklarda renk açılması, yapraklarda beneklenme ve çiçek yapısındaki bozulmalar Adana ve Antalya illerinde daha yaygın gözlenen simptom olmuştur.

Araştırmacıların 2009 yılında Slovenya’da krizantem bitkilerinde CSVd ile ilgili yapmış oldukları çalışmada bodurluk ve yapraklarında sarı beneklenme belirtilerini gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Mehle ve ark., 2010).

Kore’de, Chung ve ark. CSVd ile enfekteli farklı krizantem türlerinde yapmış oldukları çalışmada krizantem yapraklarında, sararmalar, sarı benekler, damarlarda renk açılmaları, damar kıvrılması ve buruşması, çiçek yapısında

bozulmalar, renk kırılmaları ve değişimleri, bitki boyu ve yapraklarında küçülme belirtilerini bildirmişlerdir (Chung ve ark., 2005).

Japonya'da Shizuoka ve Hyoga eyaletlerinde alınan bodur sprej çeşidi krizantem bitkilerinde CSVd etmeni tespit edilmiştir. Çalışmanın diğer yarısında araştırmacılar bu izolatu krizantem bitkilerine inokulasyonunu gerçekleştirmişlerdir ve bu bitkilerde bodurluk simtomunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Doi ve Kato, 2004).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda da görüldüğü gibi Krizantem viroidleri açısından bölgemizde gözlenen simptomlar ortak özelliğe sahip benzer simptomlardır. Araştırmacıların belirttiği gibi krizantem viroidleri açısından en belirgin simptom bodurluk simptomudur. Bu simptomu çiçek yapılarında bozulmalar, geç çiçeklenme, çiçek renklerinde değişim, yapraklarda kloroz ve beneklenme simptomları izlemektedir. Bazı araştırmacılar herhangi bir makroskobik simptom oluşumu gözlenmeksizin de krizantem bitkilerinde viroidlerin var olabileceğini ve latent formda bulunabileceğini yapmış oldukları araştırmalarda belirtmişlerdir (Matsushita ve ark., 2007; Hollings ve Stone, 1973).

4.2. Krizantem bitkilerinde Tespit edilen Viroidlerin Biyolojik İndeksleme Çalışmalarına ait Bulgular ve Tartışma

Çalışmanın moleküler kısmında jel üzerinde 2li ve 3lü bant gelişimi gösteren örneklerden toplam 3 tanesi biyolojik indeksleme çalışmasına alınmıştır. Bu aşamada her krizantem bitkisi örneği için 3'er adet olmak üzere doku kültüründen elde edilmiş sağlıklı krizantem bitkileri biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmalarında patojenin inokulasyonu mekanik olarak gövde çizme yöntemi ile bitki öz suyu ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da her izolat için 3'er adet etrog citron bitkisi de indikatör olarak kullanılmıştır.

İndikatör bitkilerdeki simtomlar inokulasyondan yaklaşık 6 hafta sonra simptom gelişimi açısından gözlemlenmeye başlamıştır. İndikatör bitkilerinden

krizantemlerde ilk belirtiler, bodurlaşma, boğum aralarında kısıalma ve yaprak boyutlarında küçülmeler hafif klorozlar olarak gözlemlenmiştir. İlerleyen dönem içinde çiçek yapısında da farklılaşmalar gözlenmiş olup çiçeklerin küçük kaldığı ve tam açılma göstermediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. İndikatör bitkilerde gözlemlenen belirtiler (B: Bodurlaşma, BAK: Boğum arası kısıalma, KY: Küçülmüş yaprak, YHK: Yapraklarda hafif kloroz, KÇ: Küçük çiçek yapısı, YK: Yapraklarda kıvrıkcıklaşma)

İZOLATLAR	İNDİKATÖR BİTKİ	GÖZLEMLENEN BELİRTİLER				
		KY	B\BAK	YHK	KÇ	YK
KriAd-27	Krizantem	+	+	+		-
KriTa-4	Krizantem		+			-
KriAd-38	Krizantem	+	+	+	-	-
Kontrol -	Krizantem	-	-	-	-	-
KriAd-27	Etrog citron	-	-	-	-	+
KriTa-4	Etrog citron	-	-	-	-	+
KriAd-38	Etrog citron	-	-	-	-	+
Kontrol+(CEVd için)	Etrog citron	-	-	-	-	+
Kontrol -	Etrog citron	-	-	-	-	-

Çizelge 4.2 de görüldüğü gibi indikatör krizantem bitkilerinde sararma, bodurlaşma ve çiçek yapısında küçülme gibi belirtiler gözlemlenmiştir. Mekanik olarak patojenin bulaştırıldığı krizantem bitkisinin yapraklarında oluşan renk açılması bodurluk, küçük çiçek yapısı ve sararma belirtileri gözlemlenilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Krizantem bitkilerinin yapraklarında meydana gelen renk açılmalar ve sararma belirtileri



Şekil 4.6. Etrog bitkilerinde CEVd etmeninin neden olduğu yaprak epinasti belirtileri.

Niblett ve ark,(1980) yürütmüş oldukları çalışmada CSVd etmeninin inokulasyonunun gerçekleştirildiği bitkilerde bodurluk, yapraklarda klorotik lekeler oluştuğunu bildirmişlerdir. CEVd etmeninin inokulasyonunun yapılmış olduğu bitkilerde ise bodurluk, yapraklarda bükülme gibi belirtileri gözlemediklerini bildirmişlerdir.

CEVd ve HSVd'leri için yapılan çalışmada etrog bitkilerinde yapraklarda kıvrıklaşma, uç kısımlarında arkaya doğru büküme ve yaprak damarlarında ve uçlarında hafif nekrozlar şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Duran-Vila ve ark. (1988) yapmış oldukları çalışmada etrog bitkilerinin bu iki etmene karşı hassasiyet gösterdiklerini ve krizantem bitkilerinde de CEVd'in bodurluk belirtisi geliştirdiğini, HSVd'nin ise çok hafif belirtiler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Krizantemlerde bulunan viroidlerin araştırıldığı bu çalışmada da yukarıdaki araştırmacılarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Krizantem indikatör bitkilerinde gözlenen belirtiler doğada krizantem bitkilerinde gözlenen belirtilerle benzerdir. İndikatör bitkiler üzerinde de bodurluk, boğum aralarında kısılma, kloroz, yapraklarda beneklenme ve çiçek oluşturan bitkilerde çiçek yapısında bozulma gibi belirtiler geliştirmiştir (Şekil 4.7). Krizantem bitkilerinde bodurluk ve hafif kloroz dışında herhangi bir belirti oluşturmayan CEVd ve HSVd viroidleri yapılan biyolojik indeksleme çalışmasında krizantem indikatör bitkilerinde bodurluk ve yapraklarda küçülme belirtisi dışında farklı bir belirtiler geliştirmemiştir. Elde edilen bulgular daha önce araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir (Hollings ve Stone, 1973; Niblett ve ark., 1980; Önelge, 1994; Matsushita ve Penmetcha, 2009).

4.3. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.3.1. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) Çalışmaları İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.3.1.1. CSVd ve CChMVd İle İlgili Bulgular Ve Tartışma

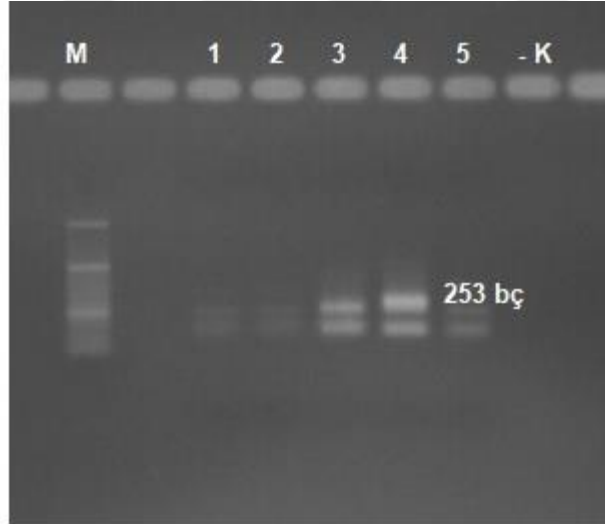
Çalışmanın konusunu oluşturan CSVd'nin bölgemizdeki krizantem bitkilerinde varlığını ve yoğunluğunu araştırmak amacıyla yürütülen bu çalışmada toplam 56 adet izolat RT-PCR ile incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında CSVd-1H5 ve CSVd-1R primer çifti kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda jel üzerinde örneklerde 2'lü ve 3'li bantlar elde edilmiştir. İncelenen 56 adet örneğin 15 tanesinde çoklu bant elde edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda incelenen 9 adet örneğin tamamı 3'lü bant, 6 örnek ise 2'li bant oluşturmuştur (Şekil 4.7). Daha sonra pospil1R ve pospil2F evrensel primerleri devreye sokulmuş ancak bu iki primer çifti kullanıldığında herhangi bir bant oluşumuna rastlanılmamıştır.

Bu aşamada Roche Molecular Biochemicals-High Pure PCR Pruduct Prification Kit'i kullanılarak çoklu bantlardan 2 tanesi (KriTa-4, KriAd-38) çoğaltılarak jel üzerinden kesim işlemi gerçekleştirilmiş ve bantlar birbirinden ayrılarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.2). Saflaştırılan bu iki örneğe CSVd için nested-PCR uygulanmış, CEVd ve HSVd için primerler belirlenerek örnekler RT-PCR çalışmasına alınmıştır.

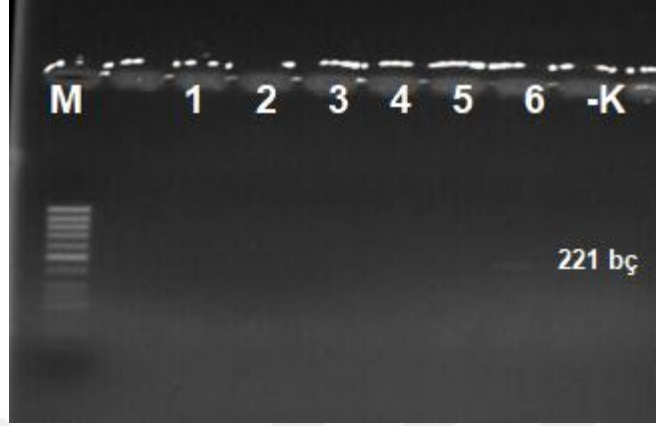
CSVd'ni belirlemek için primer çiftleri CSVd1R-CSVd1F ve CSVd2R-CSVd2F devreye sokularak nested-PCR çalışmasına gidilmiştir. Yapılan ilk aşama RT-PCR ürünlerinin jel üzerinde 253 bç seviyesinde CSVd'ye ait bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.8). Nested-PCR'in 2. PCR aşamasında ise sadece bir örnekte bant görülmüştür. Diğer örneklerde herhangi bir bant gözlemlenmemiştir. CSVd için toplam 2 adet izolattan pozitif sonuç alınmıştır. Bu sayı etmen açısından oldukça düşük bir rakam olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada incelenen krizantem bitkilerinin CSVd açısından oldukça düşük bir bulaşıklık oranına sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. CSVd-1H5-1R primerlerinin kullanıldığı %1.5 Agar jel görüntüsü.1, 3 ve 7 numaralı örnekler 3'lü viroid bant, 2, 4 ve 6 numaralı örnekler ise 2'li viroid bantı oluşturmuştur. M Marker.100 bç. (sırası ile örnekler 1:KriAd-5, 2:KriTa-4, 3:KriAd-38, 4:KriTa-11, 5:KriAd-24, 6:KriAd-12, 7:KriAd-27, -K:- kontrol)



Şekil 4.8. Nested-PCR çalışmalarının ilk aşamasında CSVd etmenini tanıyan CSVd1F ve CSVd1R primerlerinin kullanılarak pozitif olarak belirlenen örneklerin agar jelde 253 bç uzunluğundaki görüntüsü. 1; KriAd-5, 2;KriAn-1, 3;KriAd-27 ve 4;KriAd-38, 5;KriTa-5 M;markör (50bç).



Şekil 4.9. Nested-PCR çalışmalarının ikinci aşamasında CSVd etmenini tanıyan CSVd2F ve CSVd2R primerlerinin kullanılarak pozitif olarak belirlenen örneğin agar jelde 221 bç uzunluğundaki görüntüsü. 6'da KriAd-27 örneğine ait bant görülmektedir. 50 bç'lik markör kullanılmıştır

Çalışmanın ilerleyen döneminde düşük konsantrasyonlardaki viroid RNA'sını arttırmak ve CSVd etmenini tanılamak için nested PCR tercih edilmiştir. 1. PCR aşamalarında CSVd F ve CSVd R primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri %2 lik agar jelde yürütülmüş ve agar jel üzerinde KriAda-38 ve KriAd-27 örneklerinde 253 bç uzunluğunda bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.8) Çalışmanın 2. aşamasında yapılan PCR çalışmasında ise CSVd 2F ve CSVd 2R primerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda KriAd-27 örneğinde CSVd etmeninin 221 bç uzunluğundaki bant görüntüsü agar jel üzerinde elde edilmiştir (Şekil4.9). Elde edilen bu ürün sekans çalışmasına gönderilmek amacıyla aynı koşullarda tekrar çoğaltılmıştır. Çoğaltma sonunda ürünler tekrardan agar jele yüklenmiş ve etidyum bromidile boyanmıştır. UV transilatör altında bakılan jelde 221 bç uzunluğunda band görüntüleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. CSVd'nin nested-PCR ürününün çoğaltılması

Dünya'da CSVd'nin yaygınlık durumuna baktığımızda etmen ilk kez virüs olarak ABD'de 1945 yılında bildirilmiştir (Dimock, 1947). Daha sonra Kanada 'da 1950 yılında bildirilerek buradan dünyanın her tarafına dağıldığı belirtilmiştir (Lawson, 1987). Etmen tüm Avrupa ülkelerinde karantina etmeni olması nedeniyle bu ülkelerde yaygınlığı konusunda fazla bilgi olmamakla birlikte etmenin İtalya'da simptom göstermeyen krizantem bitkilerinde bulunduğu buna ek olarak *Argyranthemum frutescens* bitkilerinde de simptom oluşturduğu bildirilmiştir (Torchetti et al, 2012).

Etmenin moleküler olarak tanısı Monsion ve arkadaşları (1980) tarafından PAGE yöntemiyle saptanmış daha sonra RT-PCR yöntemiyle Kusunoki ve arkadaşları (1993) tarafından etmenin *Pospiviroidae* familyası içinde yer aldığını ve yapısı ortaya koymuşlardır.

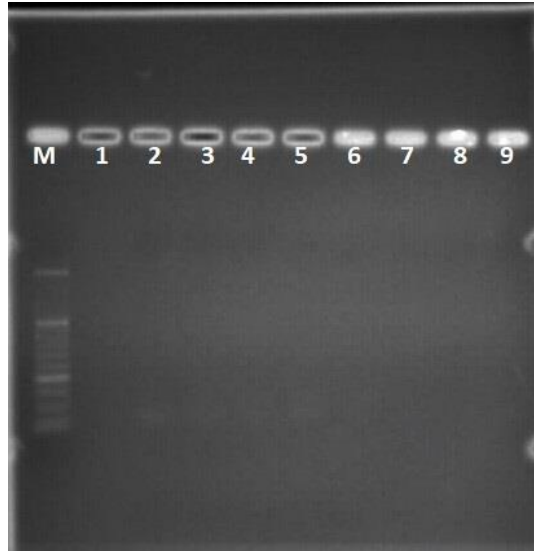
Mısır'da CSVd'nin varlığına ait bulgulara baktığımızda El-DougDoug ve ark. (2012) *Pospiviroidae* familyasının 199 baz uzunluğundaki korunmuş bölgelerini tanımlayan primerleri kullanarak krizantem bitkilerinde CSVd etmenini izole etmiş ve tanılamışlardır.

Etmen Hindistan'da %28,3 (Adkar-Purushothama ve ark., 2017) ve Brezilya'da %58 (Gobatto ve ark., 2014) oranlarında oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Çinli araştırmacıların yapmış olduğu çalışmada ise etmenin yine

Avrupa lkelerinde olduğu gibi çok yaygın bulunmadığı CSVd'nin %2,9 oranında bulunduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2015).

lkemizde krizantem bitkilerinde CSVd etmenini ilk kez Bostan ve ark. (2004) bildirmişlerdir. Yapılan alışmada *Pospiviroidae* familyası üyelerinin korunmuş bölgelerinin tanılanmasında kullanılan primer çifti kullanılmış ve 154 krizantem bitkisinin 2 sinde CSVd etmenin agar jel üzerindeki 199 baz uzunluğundaki bant görüntüsünü tespit etmişlerdir (Bostan ve ark., 2010). Bu çalışmada da benzer şekilde CSVd'nin bulunma oranını oldukça düşük oranda bulunmuştur. Etmen lkemizde yaygın olarak bulunmadığı bu çalışma ile de ortaya konmuştur.

Krizantem bitkilerinde bulunan ve lkemizde karantina etmeni olarak EPPO'nun A2 listesinde yer alan CChMVd etmenini araştırdığımız çalışmada CChMVd-2R ve CChMVd-2F primerleri kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarının sonucunda incelenen tüm izolatlarda agar jelde herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir (şekil 4.10.).



şekil 4.11. CChMVd'nin negatif çıkan jel fotoğrafı(M: 50 bç'lik Markır, 1: Negatif kontrol)

CChMVd'nin varlığı Danimarka, Fransa, Hindistan, Kore, Çin, Japonya ve Hollanda gibi önemli krizantem üreticisi olan ölkelerde bildirilmiştir (Singh ve ark., 1978; Paludan, 1980; Monsion ve ark., 1980; Yamamoto ve Sano, 2006; Chung v ark., 2006; Zhang ve ark., 2011). Etmenin simptomlarına baktığımızda yapraklarda renk açılmaları, klorotik beneklenme belirtilerini geliştirdiği bildirilmektedir (Dimock ve ark., 1971; Navarro ve Flores, 1997). Toplanan 56 izolattan 20 tanesi yaprak klorotik lekeleri sergileyen izolatlardır. Ancak toplanan bu izolatlardan yapılan RT-PCR sonucunda agar jel üzerinde hastalık etmenine ait herhangi bir bant gelişimi gözlenmemiştir (Şekil.4.11). Çalışmada moleküler bazda herhangi bir bulguya rastlanılmaması bu etmenin toplanan örneklerde var olmadığını ortaya koymaktadır. Ancak simptomolojik açıdan benzer simptomların besin elementi noksanlığından veya krizantemde bulunabilecek diğeri viral hastalıkların neden olabileceği düşünülmektedir. Nitekim krizantemde bulunan *Tomato spotted wild virüs* etmeninin yapraklarda klorotik beneklenmelere neden olabilecek ortak simptomlar olduğu belirtilmektedir (Dal Bo ve ark., 1995).

4.3.1.1.(1). CSVd'nin krizantem tohumlarında varlığı ile ilgili bulgular ve tartışma

Ticari olarak satılan krizantem tohumlarının CSVd etmenini açısından testlenmek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılan bu çalışmada 10 farklı markaya ait olan krizantem tohum örneklerinin TNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra random primer ile cDNA sentezleri yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarında CSVd etmenini tanıyabilen CSVd-2H1 ve CSVd-1R primer çifti kullanılmıştır. Ancak agar jelde yapılan yürütme sonucunda CSVd'ye ait herhangi bir band oluşunu gözlenmemiştir. Bu nedenle tüm tohum örneklerinin bu etmen açısından negatif olduğu ve tohumların temiz olduğu düşünülmektedir.

Diğeri ölkelerde yapılan CSVd'nin tohumla taşınma çalışmalarına baktığımızda Monsion ve ark. (1973) Fransa'da % 11 oranında taşındığını bildirirken İngiltere'de Hollings ve Stone (1973) tohumla herhangi bir taşınma

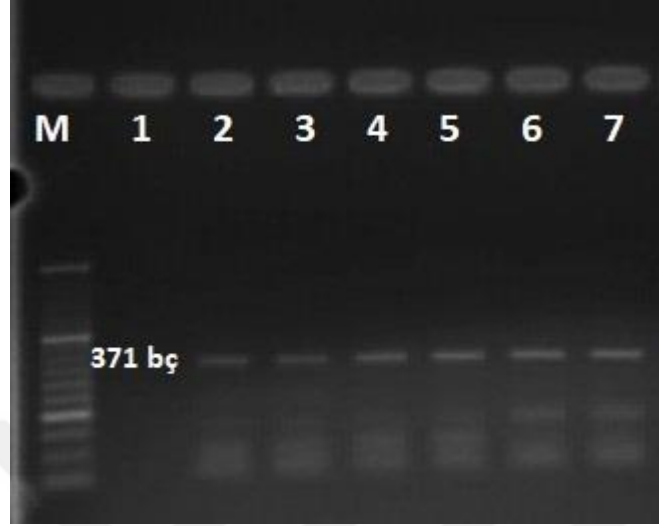
olmadığını belirtmişlerdir. Tohumla taşınım konusunda yapılmış fazla bir çalışma olmamakla birlikte yürütülen bu çalışmada tohumlarda herhangi bir bulaşıklık saptanmamıştır. Araştırmacılar etmenin yaygınlığı konusunda mekanik bulaşmayı daha ön planda tutmakta ve esas yayılım krizantem bitkilerinin kesim işlemleri sırasında gerçekleştiğini belirtmektedirler (Bouven ve van Zaayen, 2003).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise Chung ve Pak, (2008) Kore’de mayıs aylarında melezleme çalışmaları yapılırken enfekteli baba ile oluşturulan tohumların %6,7 oranında enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Ana bitkilerinin çaprazlaması sırasında tohumla taşınım oranının %46,9 ile %75,7 arasında değiştiğini, her iki ebeveynin enfekteli olduğunda tohumların taşınım oranının ise %94,4 ve %96 arasında olduğunu bildirilmişlerdir. Bu çalışmayla araştırmacılar daha önce yapılanların aksine CSVd’nin tohumla yüksek oranlarla taşınabileceğini rapor etmişlerdir.

4.3.1.2. CEVd ve HSVd İle İlgili Bulgular Ve Tartışma

İncelenen 56 adet krizantem örneğinde CSVd etmenini tanılaması yapılırken jelde oluşan çoklu bantlar sebebi ile çalışmaya HSVd ve CEVd etmenlerine ait primerlerde dahil edilmiştir. Yapılan RT-PCR sonucunda %1,5’luk agar jelde bu iki etmene ait bant oluşumları tespit edilmiştir.

Krizantem bitkilerinde bulunan CEVd’ni araştırmak için CEVd-1F (GTGCTCACCT-GACCCTGCAGG) ile CEVd-2R (ACCACAGGAACCTCAAGAAAG) primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler Önelge (1997) tarafından turunçgil bitkilerinde kullanılan ve CEVd’i tanılamada farklı bitki guruplarında kullanılabilen genel bir primer çiftidir. Yürütülen RT-PCR çalışmalarında incelenen 15 adetten, çoklu bant oluşturan 5 izolat 371 bç seviyesinde bant oluşturarak CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.12’de agaroz jelde 371 bç uzunluğundaki bant oluşumları görülmektedir. CEVd etmeninin tespit edildiği KriAd-5, KriAd-27, KriAd-38, KriTa-4, KriTa-9 izolatlarıdır.



Şekil 4.12. CEVd1F ve CEVd2R primerlerinin kullanıldığı PCR çalışması. Örnekler Sırası ile 1;negatif kontrol 2; pozitif kontrol, 3;KriAd-5, 4;KriAd-27, 5;KriAd-38, 6;KriTa-4 ve 7;KriTa-9 izolatlarına ait 371 bç uzunluğundaki bandların görüntüleri

Araştırmacılar CEVd mekanik olarak bitki özsuyu, bulaşık aşı bıçağı, makas ve budama aletleri ile yaygın olarak taşınmakta olduğunu bildirmişlerdir (Garnsey ve Jones, 1967). CEVd etmeninin neden olduğu hastalık ilk kez 1948 yılında üç yapraklı turunçgil anacında kabuk kavlamaları şeklinde bildirilmiştir (Fawcett ve Klotz, 1948). Bu hastalığın daha sonra aşı materyali ile taşındığı ve Avusturalya'da (Benton ve ark., 1949) üçyapraklı bitkilerde 'kabuk kavlamasına' neden olan etmenle Brezilya'da (Moreira, 1965) Rangpur limelerinde bulunan etmenin aynı olduğu bildirilmiştir. CEVd'in mekanik olarak kolayca taşınması turunçgil yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerdeki tanılama çalışmaları sonucunda dünyada turunçgil yetiştiriciliği yapılan ülkelerin hepsinde tespit edilmiştir (Duran-Vila ve Semancik, 2003).

CEVd'nin turunçgiller dışında belirti oluşturmadan doğal enfekteli olarak tespit edilmiş konukçuları bildirilmiştir. Bunlar *Verbena sp.*, *Petunia*, *Solanum jasminoides*, domates, *Brassica napus*, *Dacus corata*, patlıcan, bakla ve asma bitkileri olarak bildirilmiştir (Fagoaga ve Duranvila, 1996; Mishra ve ark., 1991;

Flores ve ark., 1985; Singh ve ark., 2006; Verhoeven ve ark., 2008a,b; Brunschot ve ark., 2014).

Duran-Vila ve Semancik (2003) isimli araştırmacılar tarafından CEVd etmeninin 371 bç uzunluğuna sahip olduğu fakat farklı varyantları içerdiği ve polimorfizm potansiyelinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir.

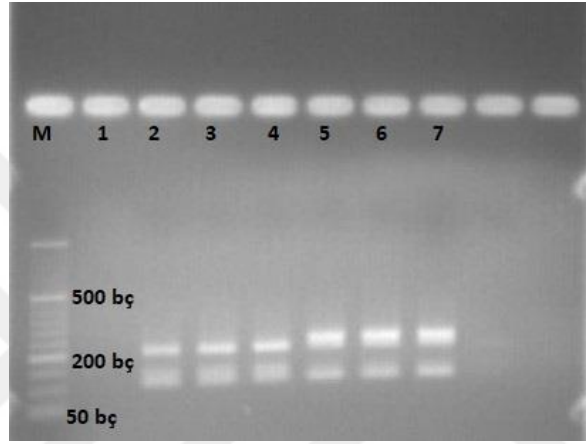
Ölkemizde CEVd etmeni ile yapılan moleküler çalışmaları incelediğimizde turunçgil bitkilerinden elde edilen izolatların 371 bç uzunluğunda olduğu bildirilirken (Önelge, 1997), bağlardan elde edilen CEVd-g varyantının 369 bç uzunluğunda olduğu ortaya koyulmuştur (Gazel ve Önelge, 2002).

Bu çalışmada krizantem bitkilerinde CEVd'nin araştırıldığı ilk çalışma olup incelenen 15 bitki örneğinin 5 tanesinde görölmesi bu viroidin bu bitki gurubunda da yaygın bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bunun nedenlerinden en önemlisinin etmenin mekanik olarak taşınabilmesi ve ölkemizde bu bitki grubunun yetiştirilmesinde makas ve bıçak gibi budama aletlerinin sterilizasyonunda yeterli özen gösterilmemesi olabileceği dűřünölmektedir. Zira ölkemizde turunçgil yetiştiriciliğinde de en yaygın bulunan etmenlerden bir tanesi CEVd'dir (Önelge, 1994).

Çoklu bantların araştırılması amacıyla ele aldığımız ikinci viroid HSVd'dir. HSVd ilk kez şerbetçi otu bitkilerinde varlığı bildirilmiş (Sasaki ve Shikata, 1977) olup *Citrus*, *Rosaceae*, *Moraceae* ve *Vitis* bitki gruplarında varlığı belirtilmiştir (Sano ve ark., 1989). Etmenin, şerbetçi otunda cücelik hastalığı, turunçgillerde gözenekleşme hastalığı, sert çekirdekli bitki gurubunda beneklenme hastalığına ve hıyar bitkilerinde Cucumber pale fruit hastalığını oluşturmaktadır (Ohno ve ark., 1983; Yamamoto ve ark., 1973). Bir çok bitki gurubunda yaygın olarak bulunduğu bildirilen etmen badem, kiraz, elma, armut, incir, dut, antep fıstığı ve nar gibi bitki türlerinde simptom oluşturmadan bulunduğu bildirilmiştir (Kaponi ve ark., 2012; Astruc ve ark., 1996; Sano ve ark., 1989).

Bu çalışmada örneğ olarak alınan krizantem bitkilerinde spesifik bir simptom oluşumu gözlenmemekle birlikte örneğlerin HSVd etmeni açısından

tanılamak için Reanwarakorn ve Semancik (1998) adlı araştırmacıların geliştirdiği CVd.IIc ve CVd.IIh primer çifti kullanılmıştır. RT-PCR işleminden sonra oluşan ürünler agar jelde yürütülerek ethidyum bromid ile boyanmış ve UV ışığında 299-302 bç uzunluğunda baz dizilimi gözlenmiştir (şekil 4.13). Bu çalışma ile lkemizde krizantem bitkilerinde ilk kez HSVd etmeninin tanılanması yapılmıştır.



şekil 4.13. Krizantemlerde HSVd'nin %1.5'luk agar jel üzerinde oluşturduğu bant görünümleri M Markr, 2,3,4 KriAd-38 ve 5,6,7 KriTa-4 izolatları.

4.3.2. Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analizler İle İlgili Bulgular ve Tartışma

PCR işlemi sonucunda pozitif olarak belirlenen örneklerden aynı koşullarda PCR işlemi uygulanarak, 200 µl hacminde çoğaltılmış ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana İlinde bulunan Molgentek firmasına gönderilmiştir. Bu firmadan alınan nükleotid dizilimleri FASTA formatında aşağıda verilmektedir.

>KriAd-27 CSVd MW013136

CGGGACTTACTTGTGGTTCCTGTGGTGCACCTCCTGACCCTGCTGCTTTG
AAGAAAAGAAATGAGGCGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGGGAA
ACCTGGAGGAAGTCCGACGAGATCGCGGCTGGAGCTTAGGACCCCACT
CCTGCGAGACAGGAGTAATCCTAAACAGGGTTTTTCACCCTTCCTTTAGT
TTCCTTCTCTCCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCCGGTCTTCGAAGGT
CCTTTGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACGCCTTTTTT
TCCAATCTTCTTTAGGACCGGGCTAGGGAGTAAGCCCGTGGAACCTTT
GTTTGTTCCT

> KriTa-4 CEVd MW013137

TGCCTCGGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGATACAGGAGC
TCGACTCCTTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCC
TGCGCGCCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATAC
AACTGAAGCTTCAACCCCGTACCGCTTTTCTTGATTCTCAGCTGCTCTCC
GGGCGAGGGTGAAAGCCCTCGGAACCCTAGAGTGGGTCCCTCGGGATC
TTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGTAAAAGA
AAAAAGAGGCGGGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGGAAA

> KriAd-38 CEVd MW013138

GCAGGAACTTGCTGATATCCGATCGGACTACTCTAGGGCCCCAAGGGG
TTTGCCCCCTCCCGGAAATTCCTCGAGGTTTCCAAAAGCGGTACGGG
GTTGAAGCTTCAGTTGTATCCACCGGGTAGTAGCCAGAGAGAAGCTCC
GGGCGAGGGGCGCGCAGGCCTCAGCGACGATCGGATGTGGAGCCAGC
AGCGAAAGGAAGGAGTCGAGCTCCTGTTTCTCCGCTGGACGCCAGTGA
TCCGCGGGCACCAGGCGCAGTGCTCCCCCGACCTCGACTTCTCCAG
GTTTCCCAAAC

HSVd >KriAd-38 MW013139

AAACCGGAGCGTGGAAAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCT
GCCTTGCGAATACAGATCGATGGTCACTTCTTCTTTACCTTCTTCTGGCT
CATCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTTCGTCCCAACC
TGCTTTTTGTCTATCTGAGCCTCTACCGCGGATCCCGAGTCGGGACCCT
CTCTTGAGCCCCTCTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATCAGGCTTGCAA
AGAAAAACAAGGACGGGAGGTACGTTAACCTGAGAAAAGAGCACGC
CGGGGCAA

HSVd- >KriTa-4 MW013140

CTGTGCTTGCCCTATGCGGCATCTCTGTGAATTCCCCAGAGGGGCTCAC
CAGAGGGTCTGACTCTGTTCCCCGGGCGAGCTCTACTCCAGAACACC
GCGGCCCTCTCTCCACCCCTCTCGCTGGATTCTGAAAAGAGTTGCCCCG
GGCGG

Elde edilen baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak bu bankada kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz çalışmasında ise DNA dizileri Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ‘‘Likelihood Tree’’ metodu ile sınıflandırılmıştır

Genom dizileri belirlenen KriAd-27 izolatının uzunluğu 244 nt olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatın BLAST analizi sonucunda CSVd’i NCBI gen bankasında kayıtlı olan viroidlerle %96-%98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14). NCBI gen bankası kayıtlarında yer alan Hindistan izolatı Adana ilinden toplanan krizantem izolatı ile %99.4 benzerlik gösterirken Avusturya izolatı ile %98, Çin izolatı ile %98 oranında benzerlik göstermiştir.

Sequences producing significant alignments							Download	Manage columns	Show	100	
select all 100 sequences selected							GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid .complete sequence .isolate 10/0160/V1	643	643	100%	2e-180	99.44%	HG739080.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid .complete genome	632	632	100%	4e-177	98.87%	DQ406591.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid R RNA genome (CSVd R)	627	627	100%	2e-175	98.59%	X16408.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid VC5-1 genomic RNA .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	LC523683.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate RCS-1 .complete sequence	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN103226.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid Kochi1 genomic RNA .complete sequence	621	621	100%	8e-174	98.31%	LC433632.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate 2222-BR .complete sequence	621	621	100%	8e-174	98.31%	MF359692.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate CS22-1 .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN718674.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate CS21-1 .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN718673.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate CS20 .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN718672.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate CS18-1 .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN718671.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Chrysanthemum stunt viroid isolate CS17-1 .complete genome	621	621	100%	8e-174	98.31%	MN718670.1				

Şekil 4.14. KriAd-27 izolatının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer CSVd izolatlarıyla karşılaştırılması.

CSVd nin Türkiye'den bildirilen ve NCBI gen bankasında kayıtlı bir izolatı bulunmamaktadır. Krizantemin ana vatanının Uzakdoğu Asya olduğu bilinmektedir. Bu nedenle viroidin Hindistan izolatıyla benzer olması etmenin yayılımıyla benzer bir sonuç olarak görülmektedir. Ayrıca Avusturya izolatı ile Hindistan izolatı birbirleriyle %98 oranında benzer olduğu BLAST analizinde ortaya konmaktadır. Bu nedenle CSVd'nin bitki ile birlikte Doğu Asya'dan yayıldığı düşünülmektedir.

Mega X programı kullanılarak Şekil 4.15'de oluşturulan filogenetik ağaçta bu çalışmada elde ettiğimiz Adana izolatının KriAd-27 Hindistan (KP262537) ve Avusturya (JF414238) izolatlarıyla benzer olduğunu Çin izolatının (FJ031232) ise bunlara yakın alt bir kümede yer aldığını görülmektedir (Şekil 4.15).

Distance tree of results MSA viewer

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

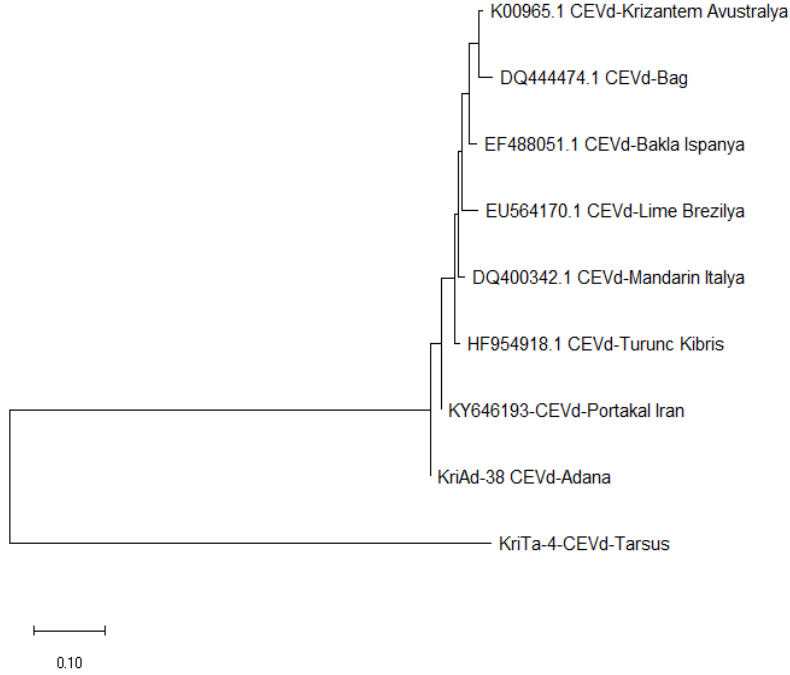
Sequences producing significant alignments Download Manage columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate PTZ57R/T, complete genome	595	595	97%	5e-166	99.39%	KY646193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate Ebi 5, partial genome	592	592	97%	6e-165	99.09%	KY654688.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid clone CEVd-1, complete sequence	579	579	99%	5e-161	97.92%	KJ538554.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate 2CEV-CEVd, partial genome	569	569	95%	3e-158	98.46%	MK911711.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate Hn-G1, complete genome	536	536	99%	3e-148	95.58%	GU592444.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate Severe clone 1, complete genome	534	534	99%	1e-147	95.56%	EU382202.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate CEVd-ZGS-ZK China, complete genome	534	534	99%	1e-147	95.55%	DQ431996.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate CEVd-Italy-BL China, complete genome	525	525	99%	6e-145	94.97%	DQ431994.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate L81, complete genome	520	520	99%	3e-143	94.72%	MT917193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid isolate 159-1, complete genome	518	518	99%	1e-142	94.69%	KF973205.1
<input checked="" type="checkbox"/> Synthetic construct CVD-multiprobe sequence	518	596	99%	1e-142	99.30%	DQ269991.1
<input checked="" type="checkbox"/> Citrus exocortis viroid strain R160510-19, complete genome	516	516	94%	4e-142	95.58%	DQ269991.1

Feedback

Şekil 4.16. KriTa-4 ve KriAd-38 CEVd İzolatlarının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer CEVd izolatlarıyla karşılaştırılması.



Şekil 4.17. KriAd-38 ve KriTa-4 CEVd izolatları ile oluşturulan soy ağacı

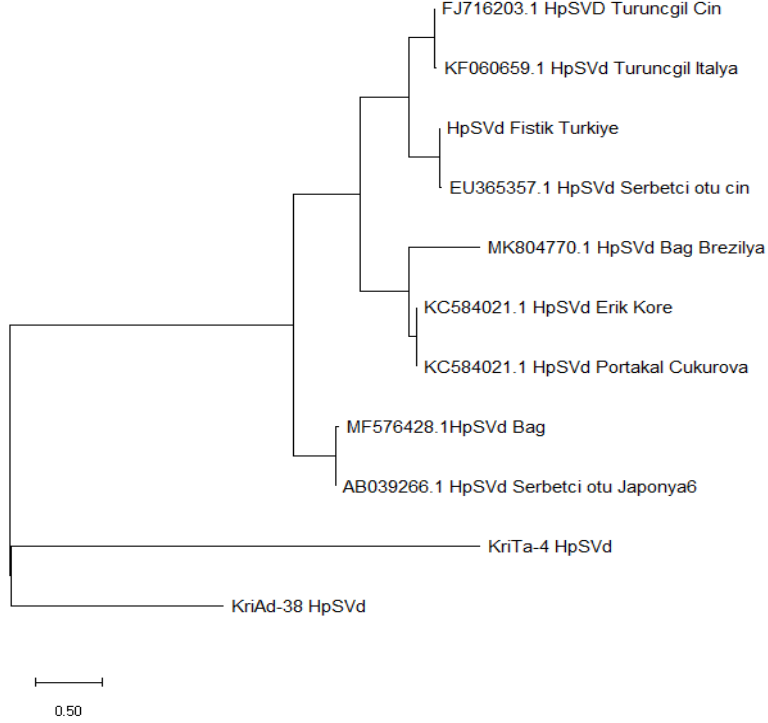
Şekil 4.17’de görüldüğü gibi KriAda-38 izolatı Avustralya’dan bildirilen Krizantem izolatının da içinde bulunduğu grupta yer almıştır. Bu grupta NCBI gen bankasında kayıtlı turunçgil, bağ ve bakla izolatları bulunmaktadır. KriTa-4 izolatı ise ayrı bir kümede yer almakla birlikte KriAd-38 ve KriTa-4 arasında %98 bir benzerlik görülmektedir.

Çalışmada Krizantem bitkilerinden elde edilen HSVd izolatları MOLGENTEK firmasına sekans analizine gönderilmiştir. Elde edilen sekans sonuçları yukarıda fasta formatında verilmiştir. Sekansı elde edilen 2 izolatın KriAd-38 izolatı 301 bç. oluştururken KriTa-4 izolatı 153 bç uzunluğundadır. KriAd-38 izolatı NCBI gen bankası verileriyle karşılaştırıldığında %84.67 ile %94.86 oranında farklı bitki gruplarıyla (turunçgil, bağ, incir, fıstık) benzer olduğu görülmüştür. Diğer bir izolat olan KriTa-4 izolatı ise 153 bç olarak elde edilmiş ve NCBI gen bankasına kayıtlı iki izolat ile %95 oranında turunçgil ve %98 oranında bağ izolatları ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.18).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Hop.stunt.viroid.isolate.7009.HSVd.PN.complete.genome	121	121	44%	1e-23	98.53%	KF007326.1
Hop.stunt.viroid.isolate.Xi-MT.Ver.complete.genome	111	111	46%	8e-21	95.71%	KY508370.1

Şekil 4.18. HSVd İzolatının BLAST analizi sonucu NCBI gen bankasındaki diğer HSVd izolatlarıyla karşılaştırılması.

Krizantemden elde edilen her iki izolat ve NCBI gen bankasından benzer izolatlar ile MEGA X programında oluşturulan (Şekil 4.19) filogenetik ağaç incelendiğinde Krizantem bitkisinden elde edilen her iki izolatın diğer bitki gruplarından elde edilen izolatlardan farklı kümede yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4.19. Krizantem bitkisinden elde edilen KriTa-4 HSVd izolatına ait soyağacı

Krizantemden elde edilen CEVd ve HSVd izolatlarının bağ ve turuncgil izolatlarıyla %98'e varan benzerlik oluşturması mekanik olarak makas ve bıçaklarla kolayca taşınabilen her iki etmen açısından benzerlik göstermektedir. Çalışmanın yürütüldüğü her üç ilimizde de turuncgil ve bağ üretimi yapılmaktadır. Bu nedenle krizantemden elde edilen CEVd ve HSVd izolatların bu bitkilerden elde edilen izolatlarla yakın çıkmasını beklenebilir bir sonuç olmuştur. Bu çalışmada elde edilen izolatlar CEVd ve HSVd'lerinin nükleotid dizilimleri ülkemiz açısından yeni bulgulardır. Daha önce yapılan çalışmalarda turuncgil, bağ, nar, şerbetçi otu ve sert çekirdekli meyve ağaçları gibi bitki guruplarında HSVd'nin varlığı bildirilmiş ancak nükleotid dizilimi belirtilmemiştir (Gazel ve ark., 2006). Bu nedenle krizantem bitkilerinden elde edilen bu dizilimler bildiğimiz kadarıyla ülkemiz için yeni kayıt olarak bu çalışmada ortaya konmuştur.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışma ile Adana, Mersin ve Antalya illerinde krizantem yetiştiricilik ve krizantem bitkisinin peyzaj materyali olarak kullanıldığı alanlarda, krizantem viroid etmenlerinin tanınması yapılmıştır.

1. Adana ve Mersin illerinden toplanan krizantem bitkilerinde bodurluk, yapraklarda klorotik beneklenmeler, çiçek yapısında renk kırılmaları ve küçülmeler gibi krizantem viroid enfeksiyonları için spesifik olabilecek belirtiler gözlemlenmiştir.
2. Toplam 56 adet örnek Adana, Mersin ve Antalya illerini içerecek şekilde toplanmış ve laboratuvarında RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir.
3. Çalışma sonucunda toplanan krizantem izolatlarında CSVd, CEVd ve HSVd etmenlerinin varlığı tespit edilmiştir. Toplamda 2 izolatın CSVd ile, 5 izolatın CEVd ile, 2 izolatın ise HSVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.
4. Yürütülen bu çalışmada literatürde belirtilen ve CSVd için spesifik olan primer çiftlerinin bu etmene karşı özel olmadığı ve *Pospiviroidae* familyasındaki diğer viroidleride bir arada tanılandığı gözlemlenmiştir.
5. Yürütülen nested-PCR aşamasında CSVd 'ine ait 253 ve 221 bp uzunluğunda bantlar agar jel üzerinde belirlenmiştir. Genom analizi sonucunda KriAd-27 izolatı 244 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir.
6. KriAd-27 izolatının NCBI gen bankası sistemine bakıldığında ülkemizde Adana ilinde krizantem bitkilerinde ilk izole edilen ve gen bankasına MW013136 olarak kaydedilen CSVd etmeni izolatı olma özelliği göstermektedir.
7. KriAd-27 izolatının BLAST analizi sonucunda NCBI gen bankasında bulunan Hindistan ve Avustralya izolatlarıyla aynı küme içinde Çin izolatı ile farklı bir kümede yer aldığı görülmüştür.

8. CSVd etmeninin varlığının tespit edildiği KriAd-27 izolatu, indikatör krizantem bitkilerinde sararma, bodurlaşma ve çiçek yapısında küçülme yapraklarda renk açılması belirtileri geliştirmiştir.
9. Tohumlarda CSVd etmeninin tanılanması sonucunda yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda bu etmenin varlığına rastlanılmamıştır.
10. CCHMVd'ini tanılamak için kullanılan RT-PCR sonucunda etmene ait bulgular tespit edilememiştir.
11. Çalışmada CEVd etmenini tanılamak için CEVd-1F ve CEVd-2R primerleri kullanılmış ve 5 izolatta CEVd etmenine ait 371 bç seviyesi gözlemlenmiştir. CEVd etmeninin tespit edildiği izolatlar KriAd-5, KriAd-27, KriAd-38, KriTa-4, KriTa-9 olmuştur.
12. Bu örneklerden KriAd-38 ve KriTa-4 izolatlarının genom dizilimleri ortaya çıkarılmış ve gen bankasına sırası ile MW013138, MW013137 olarak kayıt edilmiştir.
13. Krizantem izolatlarında bulunan HSVd, CVd-IIc ve CVd-IIh primer çiftleri kullanılarak tanılanmış ve izolatları 300 bç seviyesinde agar jelde belirlenmiştir.
14. KriTa-4 ve KriAd-38 izolatlarının nükleotid dizilimleri elde edilmiş olup MW013139 ile MW013140 numaraları ile gen bankasına kayıt edilmiştir.
15. Genom dizilimleri ortaya çıkan KriTa-4 ve KriAd-38 izolatlarının NCBI gen bankasındaki CEVd ve HSVd izolatları ile karşılaştırılması sonucunda pek çok ülkeden bildirilen izolatlarla %93-99 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür.
16. Biyolojik indeksleme çalışmalarında KriTa-4 ve KriAd-38 izolatları mekanik inokulasyon ile etrog citron bitkilerine inokule edilmiştir. İnokulasyon sonucunda etrog bitkilerinde, yapraklarda kıvrıcıklaşma, uç kısımlarında arkaya doğru büküme ve yaprak damarlarında ve uçlarında hafif nekrozlar şeklinde belirtiler gözlemlenmiş ve CEVd ile HSVd'lerinin varlığının doğrulanması gerçekleştirilmiştir.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda yapılacak öneriler aşağıda sıralanmıştır.

Özellikle kesme çiçekçilik alanında krizantem bitkilerinde bu viroidlerin tanılanması oldukça önemlidir. Çünkü kesme çiçekçilikte görsel güzellik en önemli kriterdir. Bu sebeple bitkilerde bodurluk, çiçek yapılarındaki bozulmalar görsellik açısından istenmeyen durumlardandır. Ayrıca bu durum yetiştirilen bitkilerin pazar değerinin yitirilmesine ve ekonomik açıdan önemli kayıpların oluşmasına neden olmaktadır.

Krizantem bitkilerinde viroidlerin taşınması ile ilgili en önemli faktör bulaşık bitki çelikleri ve fidelerinin kullanımudur. Bu konuda üreticilerin yeni üretimine başlayacağı krizantem bitkilerinde bitkilerin doku kültürü ile üretilmiş hastalıktan arı fidelerin kullanılmasının teşvik edilmesi önerilmektedir.

Viroidler bitki öz suyu ile mekanik olarak kolayca bulaşabilmektedir. Krizantem yetiştiriciliğindeki uygulamalardan çelik alma işlemi sırasında kullanılan budama makası, maket bıçağı gibi materyallerin her işlem sonrasında %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile dezenfekte edilmesi oldukça önemlidir. Bir diğer işlem olan pinch alma işlemi (Belli bir büyüklüğe gelmiş olan fidelerdeki uç sürgünlerin kırılması) sırasında ise ellere eldiven takılmalı ve sık sık ellerin dezenfekte edilmesi eldivenlerin değiştirilmesi önerilmektedir. Bu sayede hem bitkilerin kendi aralarında bulaşma hızı azalacak hemde diğer konukçusu olan bitkilere bulaşımını önlemiş olacaklardır.

Günümüzde bitkilerin yurt içi ve yurt dışı geçişleri sırasında testlenmesi ve karantina kurallarına uyulması etmenlerin diğer yerlere taşınımının önlenmesinde oldukça önemlidir. Özellikle karantina etmeni olan CCMVd etmeninin bulaşıklığının önlenmesi açısından testlemelere daha çok ağırlık verilmesi önerilmektedir.

Bu çalışmada da olduğu gibi yapılan teslerin doğruluğunu artırmada farklı primer çiftlerinin kullanımı ve laboratuvar standartizasyonunun sağlanması önemlidir.



KAYNAKLAR

- Adkar-Purushothama, C.R., Chennappa, G., Poornachandra Rao, K., Sreenivasa, M.Y., Maheshwar, P.K., Nagendra Prasad, M.N., Sano, T. 2017. Molecular diversity among viroids infecting chrysanthemum in India. *Virus Genes*, 53, 636–642.
- Amari, K., Canizares, M. C., Myrta, A., Sabanadzovic, S., Srhiri M., Gavriel , I., Çağlayan, K., Varveri, C., Gatt, M., Terlizzi, B.D., Pallas, V., 2000. First report on hop stunt viroid (HSVd) from some Mediterranean countries. *Phytopathology Mediterr.*, 39:271-276.
- Amari, K., G., Myrta, A., Terlizzi, B.D. And Palas, V., 2001. The molecular characterization of 16 new sequence variants of Hop stunt viroid reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *J.Gen.Virol.*, 82:953-962.
- Astruc, N., Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse T., Pallás, V., (1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 837-846.
- Benton, R.J., Bowman, F.T., Fraser, L., Kebby, R.G., 1949. Selection of Citrus budwood to control scaly butt in trifoliata rootstock. *Agr. Gaz. N.S. Wales* 60, 31-34.
- Bostan, H., Gazel, M., Elibüyük, I.O., Çağlayan, K., 2010. Occurrence of pospiviroid in potato, tomato and ornamental plants in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9: 2613-2617.
- Bostan, H.; Nie, X.; Singh, R.P., 2004. An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *J. Virol. Methods*, 116, 189–193.
- Bouven, I., Van Zaayen, A., 2003. In: Hadidi, A., Flores R, Randles JW, Semancik JS (Eds.), *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, pp. 218-223

- Brierley, P., 1950. Some host plants of chrysanthemum stunt virus. *Phytopathology* 40, 869.
- Brierley, P., 1952. Exceptional heat tolerance and some other properties of the chrysanthemum stunt virus. *Plant Dis. Rept.* 36, 243-244.
- Brierley, P., 1953. Some experimental hosts of the chrysanthemum stunt virus. *Plant Dis. Report.*, 37, 343–345.
- Brierley, P., Smith, F.F., 1949. Chrysanthemum stunt. *Phytopathology* 39, 501.
- Brierley, P.; Smith, F.F., 1951. Chrysanthemum stunt. Control measures affective against virus in florists' crops. *Flor. Rev.*, 107, 27–30.
- Brunschot, S.L. Van, Verhoeven, J.Th.J, Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. and Thomas, J.E., 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *Eur. J. Plant Pathol.*, 139:1-7.
- Bussiere, F., Lafontaine, D., Perreault, J.P., 1996. Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 24: 1793- 1798.
- Candresse, T., Macquaire, G., Brault, V., Monsion, M. And Dunez, J., 1990. 32p- and biotin-labelled in vitro transcribed cRNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *Res. In Virol.*, 141:97-107.
- Chung, B. N., Lim , J. H., Choi, S. Y., Kim, J. S., Lee, E. J., 2005. Occurrence of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 21(4), 377-382.
- Chung, B.N., Kim, D.C., Kim, J.S., Cho, J.D., 2006. Occurrence of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *Plant Pathology J.*, 22(4):334-338.
- Chung, B.N., Pak, H. S., 2008. Seed transmission of Chrysanthemum stunt viroid in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *Plant Pathol. J.*, 23, 334–338.

- Dal Bo E., Ronco L., Alippi A.M., Fernandez R., 1995. Tomato spotted wilt virus on chrysanthemum in Argentina. *Plant Dis.* 79: 538.
- De la Peña, M., Navarro, B., and Flores, R., 1999. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9960-9965.
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.T.J., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J.W., Sano, T., Vidalakis, G., Owens, R.A., 2014. Current status of viroid taxonomy. *Arch. Virol.*, 159, 3467–3478.
- Diener, T., 1971. Potato spindle tuber ‘virus’ IV. A replicating low-molecular weight RNA, *Virology* 45, 411.
- Diener, T.O., Lawson, R.H., 1973. Chrysanthemum stunt: A viroid disease. *Virology*, 51, 94–101.
- Dimock, A.W., 1947. Chrysanthemum stunt. *NY State Flower Growers Bull.*, 26, 2. NEW YORK STATE FLOWER GROWERS INCORPORATED, BULLETIN # 26.
- Dimock, A.W., Geissinger, C. M., and Horst, R.K., 1971. Chlorotic mottle: A newly recognized disease of chrysanthemum. *Phytopathology* 61, 415-419.
- Dimock, A.W., Geissinger, C.M., 1969. A newly recognized disease of chrysanthemum caused by a graft-transmissible agent. *Phytopathology* 59, 1024.
- Doi, M., Kato, K., 2004. Nucleotide sequence of Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) occurred in Shizuoka Prefecture and symptoms of chrysanthemum cultivar. *Ann. Rep. Kansai Pl. Prot.*, 46, 11–14.
- Duran-Vila N., 2017. Citrus Exocortis viroid. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, pp. 169-179, ISBN 9780128014981.

- Duran-Vila, N. And Semancik, S., 2003. Citrus Viroids, Pages 178-194 In: Viroids. A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S Semancik (Eds.), CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 pp.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballesta, J.F., Juarez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R. And Semancik, J.S., 1988. The citrus exocortis disease: A complex of viroid-RNAs page 152-165 in: Proc. 10 th Intern. Org. Citrus Virologist (IOCV) Conf., Riverside-California, U.S.A.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., and Semancik, J.S., 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. J. Gen. Virol. 69, 3069-3080.
- El-DougDoug, K.A., Rezk, A.A., Rehab, D.A., Sofy, A.R., 2012. Incidence of fruit trees viroid diseases by tissue print hybridization in Egypt. Int. J. Virol. 8, 114-120.
- Fadda, Z., J.A. Daròs, C. Fagoaga, R. Flores and N. Duran-Vila. 2003. Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family Avsunviroidae (hammerhead viroids). J Virol. 77(11):6528-32.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N., 1995. A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): Infectivity and pathogenesis. J. Gen. Virol., 76:2271-2277.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N., 1996. Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetable crops. Plant Pathol., 45:45-53.
- Fawcett, H.S., Klotz, L.J., 1948. Exocortis on trifoliolate orange. Citrus Leaves, 28:8.
- Flores R, Randles JW, Owens RA., BAR-Joseph, Mc and Diener. T.O., 2005. Subviral Agents: Viroids, Pages 1145-1161 In: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature, Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, A.L Ball (Eds.) Elsevier/Academic Press, London, U.K.,XIII+1261 pp.

- Flores R., Randles J.W., Owens R.A., 2003. Classification. In: Hadidi, A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. (Eds.), *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, pp. 71-75 .
- Flores, R., Duran-Vila, N., Pallas, V., Semancik, J.S., 1985. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. *J. Gen. Virol.*, 66:2095-2102.
- Flores, R., Gago, S.Z., Serra P., De la Pena, M., Navarro, B., 2017. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 2017;pp. 199-210, ISBN 9780128014981.
- Garnsey, S.M. And Jones. J.W., 1967. Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. *Plant Dis. Rep.*, 51:410-413.
- Gazel, M. And Onelge, N., 2002. Detection of viroids in grapevine rootstocks by sequential polyacrlamide gel electrophoresis. *J. Turk. Phytopathol.*, 31(3):167-172.
- Gazel, M., Ulubaş-Serçe, C., Caglayan, K. And Faggioli, F., 2008b. Sequence variability of hop stunt viroid isolates from stone fruits in Turkey.*J. Pant Pathol.*, 90(1):23-28.
- Gazel, M., Ulubaş-Serçe, C., Caglayan, K. Luigi, M. and Faggioli, F., 2008c. Incidence and genetic diversity of peach latent mosaic viroid in Turkey. *J. Plant Pathol.*, 90 (3):495-503.
- Gazel,M, Ulubaş-Serce,C. And Caglayan,K., 2006. Detection of hop stunt viroid in by RT-PCR in the East Mediterranean Region Of Turkey. *Abstr. Of XXth Intern. Symp. On Viru and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops and Xith Intern Symp. Of Small Fruit Virus Diseases*, May 22-26,2006, Antalya,Turkey,p.143.
- Gazel,M., Ulubas, C. And Caglayan, K., 2008a. Detection of hop stunt viroid in sweet and sour cherry trees in Turkey. *Proc. Of 5th Intern. Cherry Symp.*, Bursa, Turkey, *Acta Hortic.*, 795:955-958.

- Gobatto, D., Chaves, A.L.R., Harakava, R., Marque, J.M., Daròs, J.A., Eiras, M., 2014. Chrysanthemum stunt viroid in Brazil: Survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. *J. Plant Pathol.*, 96, 111–119.
- Gobatto, D., Oliveira, L.A., Franco, D.A.S., Velasquez, N., Daros, J.A. and Eiras, M. 2019. Surveys in the chrysanthemum production areas of Brasil and Colombia reveal that weeds are potential reservoirs of Chrysanthemum stunt viroid. *Viruses* 11:355 2-17.
- Gross, H.J.; Krupp, G.; Domdey, H.; Raba, M.; Jank, P.; Lossow, C.; Alberty, H.; Ramm, K.; Sanger, H.L., 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and Chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.*, 121, 249–257.
- Gumus, M., Myrta, A., Paylan, I.C. And Rwahnih, M.A., 2008. A preliminary survey for viruses and viroids of the Western Anatolia cherry industry in Turkey. *Proc. Of 5th intern. Cherry Symp., Bursa, Turkey, Acta Horti.*, 795:943-946.
- Gumus, M., Paylan, I.C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H.M. And Erkan, S., 2007. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of prunus species in western Anatolia, Turkey. *J. Plant Path.*, 89(2):265-268.
- Güllü, M., 1989. Doğu akdeniz bölgesinde Nevel grubu portakal ve satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virüs ve virüs benzeri hastalıkların surveyi ve indekslenmesi üzerine çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bil. Ens. Bitki koruma ABD, Adana, Doktora tezi, 266 s.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., 2017. (Eds.) *Viroids and Satellites*; Elsevier: London, UK, ISBN 9780128014981.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S., 2003. (Eds.) *Viroids*. CSIRO Publishing: Collingwood, Australia, ISBN 0643067892.

- Hammond, W.R., Owens, R.A., 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. Doi: 10.1094/APSnet Feature-2006-11068, 8 pp.
- Haseloff, J., Symons, R.H., 1981. Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucl. Acids Res.*, 12, 2741-2752.
- Hataya T., Tsushima T., Sano T., 2017. Hop stunt viroid. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 199-210, ISBN 9780128014981.
- Henkel, J., and Sanger, H.L., 1995. GenBank Accession Z68201.
- Hollings, M., Stone, O.M., 1973. Some properties of chrysanthemum stunt, a virus with the characteristics of an uncoated ribonucleic acid. *Annals of Applied Biology*, 74: 333-348.
- Hooftman, R., Arts, M.J., Shamloul, A.M., Van Zaayen, A. And Hadidi, A., 1996. Detection of chrysanthemum stunt viroid by reverse transcription-polymerase chain reaction and by tissue blot hybridization. *Acta Hort.*, 432:120-128.
- Horst, R.K., 1987. Chrysanthemum chlorotic mottle, Pages 291-295 in: *the viroids*. T. O. Diener, ed. Plenum:New York.
- Hosokawa, M., Ueda, E., Ohishi, K., 2004. Chrysanthemum stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta* 220, 64–70.
- Hosokawa, M., Y. Matsushita, K. Ohishi and S. Yazawa. 2005. Detection of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid-like RNA in Japanese chrysanthemum. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74: 386–391.
- ICTV, 2020. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
- Kaponi, M., Luigi, M., Kyriakopoulou, P.E., 2012. Mixed infection of pome and stone fruit viroids in cultivated and wild trees in Greece. *New Dis. Rep.* 26, 8.

- Kazaz, S., 2016. Dünya Süs Bitkileri Sektöründe Ürün Deseni, Sosyo Ekonomik Ve Teknoloji Alanında Yaşanan Gelişmeler İle Türkiye'nin Gelecek Vizyonu. 6. Süs Bitkileri Kongresi bildiriler kitabı. Syf:3-13
- Keese, P., Symons R.H., 1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4582–4586
- Keller, J.R., 1953. Investigations on chrysanthemum stunt virus and chrysanthemum virus Q. *Memoir* 324, 3-40. Cornell University, Agricultural Experiment Station, Ithaca, New York.
- Kofalvi, S.A., Marcos, J.F., Canizares, M.C., Pallas, V., Candresse, T., 1997. Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from Prunus species: Evidence for recombination between HSVd isolates. *J. Gen. Virol.*, 78:3177-3186.
- Kryczynski, S., Paduch-Cichal, E. And Skrzeczkowski, L.J., 1988. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopathol.*, 121:51-57.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6):1547–1549.
- Kusunoki, M., Terami, F., Terauchi, H. And Sogou, K., 1993. Detection of chrysanthemum stunt viroid by revers transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Proceedings of the kansai Plant Prot. Soc.*, 35:7-12.
- Lawson, R.H., 1987. Chrysanthemum stunt. Pages 247-259 in: *The viroids*. T.O. Diener, ed. Plenum Press: New York and London.
- Lemmetty, A., Laamanen, J., Soukainen, M., Tegel, J., 2011. Emerging virus and viroid pathogen species identified for the first time in horticultural plants in Finland in 1997-2010. *Agricultural and Food Science*, 20(1):29-41.
- Li, S.F., Onodera, S., Sano, T., Yoshida, K., Wang, G.P. And Shikata, E., 1995. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labelled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 61:381-390.

- Matsushita, Y., Tsukiboshi, T., Ito, Y., Chikuo, Y., 2007. Nucleotide sequences and distribution of Chrysanthemum stunt viroid in Japan. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, 75, 333–337.
- Matsushita, Y., Yanagisawa, H., Khiutti, A., 2019. First report of chrysanthemum stunt viroid isolated from potato (*Solanum tuberosum*) plants in Russia. *J. Gen. Plant Pathol.* 85, 311–313.
- Matsushita, Y.; Penmetcha, K.K.R., 2009. In vitro-transcribed Chrysanthemum stunt viroid RNA is infectious to Chrysanthemum and other plants. *Phytopathology*, 99, 58–66.
- Mehle, N., Seljak, G., Verhoeven, J.Th.L., Jansen C.C.C., Prezelj, N., Ravnikar, M., 2010. Chrysanthemum stunt viroid newly reported in Slovenia. *Plant Pathol.*, 59, 1159–1159.
- Menzel, W., Maiss, E., 2000. Detection of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) in cultivars of *Argyranthemum frutescens* by RT-PCR-ELISA. *J. Plant Dis. Prot.*, 107, 548–552.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R., Diener, T.O., 1991. Indian Bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *J. Gen. Virol.*, 72:1781-1785.
- Monsion, M., Bachelier, J.C., Dunez, J.I., 1973. Quelques propriétés d'un viroïde: le rabougrissement du chrysanthème. *Ann. Phytopathol.*, 5:467-469.
- Monsion, M., Macquaire, G., Bachelier, J.C., Faydi, C. Dunez, J., 1980. Detection of chrysanthemum stunt and chlorotic mottle viroids by slab gel electrophoresis. *Acta. Hort.*, 110:321-328.
- Moreira, S., 1965. Cachexia and Xylophosis: Are they caused by the same virus? Pages 52-56 In: Proc. 3rd intern. Org. Citrus Virologist (IOCV) Conf., Gainesville-Florida, U.S.A.
- Murray M.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* Oct 10; 8 (19) 4321-4325.

- Nakashima, A., Hosokawa, M., Maeda, S., Yazawa, S., 2007. Natural infection of chrysanthemum stunt viroid in dahlia plants. *J. Gen. Plant Pathol.*, 73, 225–227.
- Navarro, B., Flores, R., 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11262–11267.
- Navarro, J.A., Daròs, J.A., Flores, R., 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology*, 253, 77–85.
- Netwong, C., Reanwarakorn, K., Tansuwan, K., 2020. Detection of Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) from naturally infected Chrysanthemum in Wang Nam Khiao District. *Thai Agricultural Research Journal*, 38(1), 23-32.
- Niblett, C.L., Dickson, E., Horst, K.K., Romaine, C.P., 1980. Additional hosts and an efficient purification procedure for four viroids. *Phytopathology* 70, 610-615.
- Norman, P. A., 1963. Report to government of Turkey on virus diseases of citrus. FAO Report No: 1641, 16 pp, Rome.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Okado, Y., 1983. Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11, 6185-6197.
- Olson, C.J., 1949. Intensive program conducted to whip chrysanthemum stunt. *Florist' Rev.* 105(2711):33-34.
- Önelge, N., 1994. Turunçgillerde hastalık oluşturan Viroidlerin Biyolojik ve biyokimyasal tanısı (PAGE) üzerine çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bil. Ens., Bitki koruma ABD, Adana, Doktora tezi, 93 s.
- Önelge, N., 1997. Direct nucleotide sequencing of citrus exocortis viroid (CEV). *Turk. J. Agric. For.*, 21: 419-422.

- Önelge, N., Kersting, U., Guang, Y., Bar-Joseph, M., Bozan, O., 2000. Nucleotide sequence of citrus viroids CVd-IIIa and CVd-IV obtained from dwarfed Meyer lemon trees grafted on sour orange. *J. Plant Dis. and Protection* 107, 387-391.
- Paludan, N., 1980. Chrysanthemum stunt and chlorotic mottle. Establishment of healthy chrysanthemum plants and storage at low temperature of chrysanthemum, carnation, campanula and pelargonium in tubes. *Acta Hortic.* 110, 303-313.
- Palukaitis, P., 2017. Chrysanthemum stunt viroid. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, pp. 181–190, ISBN 9780128014981.
- Palukaitis, P., Symons, R.H., 1980. Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen. Virol.*, 46, 477–489.
- Randles, J.W., 2003. Economic Impact of Viroid Diseases. In: *Viroids*, pp. 3-11. Edited by A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 p.
- Reanwarakorn, K., Semancik, J.S., 1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.*, 79:3163-3171.
- Roistacher, C.N., 1991. Graft transmissible diseases of citrus. *Handbook for detection and diagnosis*, Publ. Div., FAO, Rome, 151 pp.
- Sano, T., Hataya, T., Terai, Y., Shikata, E., 1989. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70, 1311-1319.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Ohno, T., Okata, Y., 1984. Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: homology to hop stunt viroid. *Nucleic Acids Res.*, 12:3427-3434.
- Sasaki, M., Shikata, E., 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, 53:109-112.

- Scoric D., 2017. Viroid Biology. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 2017;pp. 53-61, ISBN 9780128014981.
- Semancik J.S., Duran-Vila, N., 1999. Viroids in plants: Shadows and footprints of primitive RNA. Pages 37-64 In: *Origin and evolution of viruses*. E. Domingo, R. Webster and J. Holland, eds. , Academic Press New York.
- Semancik, J.S., 2003. Host Consideration. Pages 87-88 In: *Viroids*. A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S Semancik (Eds.), CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 pp.
- Semancik, J.S., Weathers, L.G., 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of “infectious” low molecularweight RNA in plants. *Nat. New Biol.*, 237, 242–244.
- Sevik, M.A., 2015. Viroidler ve Türkiye’de Saptanan Viroid Hastalık Etmenleri. *Turk J. Agric. Res.* 2: 63-68.
- Shikata, E., 1990. New viroids from Japan. *Semin. Virology*, 1:107-116.
- Shiwaku, K., Iwai, T., Yamamoto, Y., 1996. Cloning and nucleotide sequence of *Chrysanthemum stunt viroid*. *Hyogo Pre Agric Inst (Agriculture)* 44:1-4.
- Singh, B.P., Gupta, R.P., Abidi, S.M.H., Raizada, R.K., 1978. Chlorotic mottle of *Chrysanthemum morifolium* (Ram) Hemsl. A. new record from India. *Curr Sci* 47:913
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Baranwal, V.K. and Gupta, K.N. 2006. Detection of *Citrus exocortis viroid*, *Iresine viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid* in new ornamental host plants in India. *Plant Dis.*, 90, 1457.
- Sipahioğlu H.M., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S. And Myrta, A., 2002. Survey for detection of peach latent mosaic (PLMVd) and Hop stunt (HSVd) viroids by dot-blot hybridization in stone fruits in Malatya. *Workshop on Detection of stone fruit viruses by molecular techniques*, Ankara, p. 8-13.

- Sipahioğlu HM, Demir S, Myrta A, Al Rwahnih, M, Polat B, Schena L, Usta M, Akkopru A, Selcuk M, Ippolito A, and A Minafra, 2006. Viroid, phytoplasma and fungal diseases of stone fruits in Eastern Anatolia, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34: 1-6.
- Soliman, T., Mourits, M.C.M., Lansink, A.G.J.M.O., Vander Welf, W., 2012. Quantitative economic impact assessment of an invasive plant disease under uncertainty e A case study for potato spindle tuber viroid (PSTVd) invasion into the European Union. *Crop Protection* 40, 28-35.
- Steger, G., Riesner, D., 2003. Molecular Characteristics. Pages 15-29 In: *Viroids*, A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik (Eds.), CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 pp.
- Titiz, S., akiroğlu, N., Birişçi Yıldırım, T., akmak, S., 2000. Ss bitkileri üretim ve ticaretindeki gelişmeler. V. Türkiye Ziraat Mhendisliği Teknik Kongresi, (17-21 Ocak 2000), Cilt II, 709-740, Ankara.
- Torchetti, E.M., Navarro, B., Trisciuzzi, V.N., Nuccitelli, L., Silletti, M.R., Di Serio, F., 2012. First report of *Chrysanthemum stunt viroid* in *Argyranthemum frutescens* in Italy. *J.Plant Pathol.* 94, 451-454.
- Torres, H., Gomez, G., Palas, V., Stamo, B., Shalaby, A., Aouane, B., Gavriel I., Kominek, P., Caglayan, K., Sipahioğlu, M., Michelutti, R., Myrta, A. And Fiore, N., 2004. detection by tissue printing of stone fruit viroids from Europe, the Mediterranean and North and South America. *Acta Hortic.*, 657:379-383.
- TK, 2020. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Verhoeven, J., Arts, M., Owens, R., 1998. Natural infection of petunia by *chrysanthemum stunt viroid*. *European Journal of Plant Pathology* 104, 383–386.
- Verhoeven, J.T.J.; Hammond, R.W.; Stancanelli, G., 2017. Economic significance of viroids in ornamental crops. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 27–38, ISBN 9780128014981.
- Verhoeven, J.Th.J., 2010. Identification and epidemiology of *pospiviroids*. Thesis. Wageningen Universty, Wageningen. The Netherlands. ISBN 978-90-8585-623-8, 136 pp.

- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., 2006. First report of potato virus M and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides*. *Plant dis.* 90, 1359.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., 2008a. First report of pospiviroids infecting ornamentals in The Netherlands: Citrus exocortis viroid in *Verbena* sp., Potato spindle tuber viroid in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*, and tomato apical stunt viroid in *Cestrum* sp. *Plant Pathol.* 57,399.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Roenhorst, J.W., Steyer, S., Schwind, N., 2008b. First report of *Solanum jasminoides* infected by citrus exocortis viroid in Germany and the Netherlands and Tomato apical stunt viroid in Belgium and Germany. *Plant dis.* 92,973.
- Watermeyer, S.R., 1984. Detection of chrysanthemum stunt viroid in South Africa by polyacrylamide gel electrophoresis and bioassay. *Plant Dis.* 68, 485-488.
- Weather, L.G and Calavan E.C., 1961. Additional indicator plants for exocortis and evidence for strain differences in the virus. *Phytopathology*, 51:262-264.
- Yamamoto, H. And Sano, T., 2006. Occurrence of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid in Japan. *J. Gen. Plant Pathology*, 71:156-157.
- Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S. And Kubo, S., 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Rep, Res. Lab. Kirin Brew Co. Ltd.*, 16:49-62.
- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S.M., 1992. Enzymatic cDNA Amplification of Citrus Exocortis and Cachexia Viroids From Infected Citrus Hosts. *Phytopathology* 82: 279-285.
- Yoon, J.Y., Palukaitis, P., 2013. Sequence comparisons of global Chrysanthemum stunt viroid variants: Multiple polymorphic positions scattered through the viroid genome. *Virus Genes*, 46, 97–104.

- Zhang, Z.Z., Pan, S., Li, S.F., 2011. First report of chrysanthemum chlorotic mottle viroid in chrysanthemum in China. *Plant Dis.* 95, 1320.
- Zhao, X., Liu, X., Ge, B., 2015. A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum. *Arch. Virol.* 160, 1145–1152.





ÖZGEÇMİŞ

Gülbahar Arıkan, 1 Mayıs 1995 yılında Mersin'in Tarsus ilçesinde dünyaya geldi. İlkokul ve liseyi Tarsus ilçesinde bitirdi. 2013 yılında lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünde başladı ve 2017 yılında bitirdi. 2017 yılı Eylül ayında aynı üniversitede Bitki Koruma bölümü Fitopatoloji Ana bilim dalında master eğitimine başlamaya hak kazandı.





EKLER



EK-1. TOTAL NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. CTAB Tamponu (Ekstraksiyon Tamponu)

CTAB	: 2,00 gr
PVP-40	: 2,00 gr
100 mM Tris-HCl	: 1,57 gr
20 mM EDTA	: 0,58 gr
1,4 M NaCl	: 8,17 gr

100 ml son hacimde hazır hale getirmek için; yukarıda belirlenen ölçülerde 80 ml steril saf su içinde çözdürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,0 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, ekstraksiyon çalışmaları yürütülürken % 0,1 oranında 2-Mercaptoethanol eklenerek kullanılmıştır.

2. 1X TE Tamponu

10 mM Tris-HCl	: 0,157 gr
1 mM EDTA	: 0,037 gr

100 ml son hacimde hazır hale getirmek için; yukarıda belirtilen miktarlar 80 ml steril saf su içinde çözdürülmüştür. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,0 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3. İzopropanol (2-Propanol)

Değişime uğratılmadan kullanılmış ve daima +4 °C'de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

4. Kloroform : İzooamil Alkol (24 : 1)

Kloroform ve izooamil alkol değişime uğratılmadan kullanılmıştır. 100 ml son hacimde hazır hale getirmek için; 96 ml kloroform ve 4 ml izooamil alkol karışım yapılmıştır. Hazırlanan bu karışım, ağzı kapalı cam bir kap içerisinde oda sıcaklık koşullarında muhafaza edilmiştir.

5. % 70'lik Etil Alkol (Etanol)

100 ml son hacimde hazır hale getirmek için; 73,68 ml % 95 oranındaki etil alkol ve 26,32 ml steril distile su karışım yapılmıştır. Hazırlanan bu karışım, ağzı kapatılabilen cam bir kap içerisinde -20 °C'de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

EK-2. ELEKTROFOREZ ÇALIŞMALARI ESNASINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. 1X TAE Tamponu

10 mM Tris-Base	: 1,211 gr
0,5 mM EDTA	: 0,186 gr
5 mM Sodium acetate	: 0,680 gr

1000 ml son hacimde hazır hale getirmek için; daha önce yukarıda belirlenen miktarlar 800 ml steril saf su içinde çözünmesi gerçekleştirilmiş. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 8,3 olarak ayar yapıldıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım, otoklavda steril edilerek cam bir kap içerisinde +4 °C'de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

2. %2'lik Agaroz Çözeltisi

100 ml 1X TAE tamponu içerisinde, 2 gram agaroz maddesi çözdürme işlemi yapılarak hazırlanmıştır.

3. Etidyum Bromür Çözeltisi

1 ml saf su içerisinde 10 mg etidyum bromür maddesi çözdürme işlemi yapılarak, stok çözeltisi hazır hale getirildikten sonra 100 ml saf suya 30 µl stok çözeltisi eklenerek kullanılmıştır. Hazırlanan bu karışım, koyu renkli bir kap içerisinde karanlık bir ortamda ve oda sıcaklık koşullarında muhafazası gerçekleştirilmiştir.

EK-3. MEKANİK İNOKULASYON ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. 1X TKM Tamponu

10 mM Tris-HCl : 1,211 gr

10 mM KCl : 0,745 gr

1 mM MgCl₂ : 0,203 gr

1000 ml son hacimde hazır hale getirmek için; yukarıda daha önce belirlenen miktarlar 800 ml steril saf su içerisinde çözdürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözeltinin pH değeri 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 7,4 olarak ayar yapıldıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazır hale getirilen bu karışım, otoklavda steril edilerek cam bir kap içerisinde +4 °C'de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

2. %2'lik Hipo Çözeltisi (Sodyum Hipoklorit)

100 ml son hacimde hazır hale getirmek için; 13,3 ml % 15 oranındaki çarşı, pazar, markette vs. satışı gerçekleştirilen çamaşır suyu ve 86,7 ml steril saf su karışımı yapılmıştır. Uygulama yapılan mekanik inokulasyon işlemleri sırasında kullanılan çeşitli ekipmanları steril etmek amacıyla kullanılmıştır.