

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**FARKLI TURUNÇGİL TÜRLERİNİN CITRUS CHLOROTIC
DWARF ASSOCIATED VIRUS (CCDaV)'ÜNE DAYANIKLILIK
DURUMLARININ BELİRLENMESİ VE BAZI R
DAYANIKLILIK GENLERİNİN EKSPRESYON ANALİZLERİ**

Bengi TOPKAYA

**Danışman
Prof. Dr. Bayram ÇEVİK**

ISPARTA - 2020



© 2020 [Bengi TOPKAYA]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

14/12/2020

Bengi TOPKAYA



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Turunçgil Yetiştiriciliği ve Önemi	3
2.2. Citrus Chlorotic Dwarf Associated Virus (CCDaV).....	3
2.3. R Dayanıklılık Genleri	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1. CCDaV'nin Tespiti ve Karakterizasyonu	10
3.1.1. Virüs izolatu	10
3.1.2. Total nükleik asit izolasyonu	10
3.1.3. Oligonükleotit primerlerin hazırlanması	11
3.1.4. Virüsün tespiti	11
3.1.5. Moleküler karakterizasyon çalışmaları	12
3.2. Turunçgil Türlerinin CCDaV'ye Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi.....	12
3.2.1. Standart oluşturma ve testleme	12
3.2.2. Bitki materyali ve yetiştirilmesi	13
3.2.3. Virüs inokulasyonu	14
3.2.4. Turunçgil türlerinde CCDaV'nin tespiti	14
3.2.5. Primer ve prob tasarımı	15
3.2.6. Total nükleik asit izolasyonu	15
3.2.7. Turunçgil türlerinde CCDaV yoğunluğunun belirlenmesi.....	15
3.3. CCDaV'ye Dayanıklı ve Duyarlı Turunçgil Türlerinde R Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	16
3.3.1. Bitki yetiştirilmesi ve inokulasyon.....	16
3.3.2. Gen seçimi ve primer tasarımı	17
3.3.3. RNA izolasyonu ve saflaştırılması.....	19
3.3.4. cDNA sentezi	20
3.3.5. Gen ekspresyon analizi	21
4. BULGULAR	22
4.1. CCDaV'nin Tespiti ve Karakterizasyonu	22
4.2. Farklı Turunçgil Türlerinin CCDaV'ye Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi	27
4.2.1. Standartların testlenmesi	27
4.2.2. Virüs inokulasyonu yapılan bitkilerde CCDaV testlemesi	29
4.2.3. Farklı turunçgil türlerinde CCDaV yoğunluğunun belirlenmesi	30
4.3. CCDaV'ye Dayanıklı ve Duyarlı Turunçgil Türlerinde R Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	42
4.3.1. Bitki yetiştirilmesi ve inokulasyon.....	42
4.3.2. Gen seçimi ve primer tasarımı	43
4.3.3. RNA izolasyonu ve saflaştırılması.....	45
4.3.4. cDNA sentezi	45

4.3.5. R dayanıklılık genlerinin ekspresyon analizleri.....	46
4.3.5.1. CN geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	46
4.3.5.2. CNL geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	48
4.3.5.3. MLO-Like geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	51
4.3.5.4. N Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	53
4.3.5.5. NL-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi...	56
4.3.5.6. NL-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi...	58
4.3.5.7. T-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	61
4.3.5.8. T-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	64
4.3.5.9. TNL Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi....	66
4.3.5.10. RLK-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	69
4.3.5.11. RLK-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	71
4.3.5.12. RLP-3 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	74
4.3.5.13. RLP-5 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	76
4.3.5.14. Unknown 2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	79
4.3.5.15. Unknown 6 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi.....	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	85
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	103

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI TURUNÇGİL TÜRLERİNİN CITRUS CHLOROTIC DWARF ASSOCIATED VIRUS (CCDaV)'ÜNE DAYANIKLILIK DURUMLARININ BELİRLENMESİ VE BAZI R DAYANIKLILIK GENLERİNİN EKSPRESYON ANALİZLERİ

Bengi TOPKAYA

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Turunçgil klorotik cüceleşmeyle ilişkili virüs (Citrus chlorotic dwarf associated virus, CCDaV) turunçgil üretiminde verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen virüs hastalıklarından biridir. Hastalık ilk kez 1980'li yılların sonlarında ülkemizde ortaya çıkmış ve kısa süre içerisinde Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil üretim alanlarına yayılmıştır. Hastalık Defne beyazsineği *Parabemisia myricae* (Homoptera: Aleyrodidae) ile taşınmakta olup, virüs daha sonra Çin'de de bulunmuştur. Bu tez çalışması kapsamında öncelikle CCDaV-BATEM-M izolatının tespiti, biyolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. İzolatın CP geninin nükleotit ve aminoasit düzeyinde yapılan çoklu dizi analizleri sonucunda hem ülkemizdeki hem dünyadaki diğer izolatlar ile % 99-100 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen turunçgil türlerinin CCDaV'ye dayanıklılık ve duyarlılık durumları ortaya konulmuştur. Bu amaçla altı farklı turunçgil türüne CCDaV inokülasyonu yapılmış ve aşılama 3, 6, 9 ve 12 ay sonra virüs yoğunluğu real-time PCR yoluyla mutlak kantitasyon yapılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak turunçgil türlerindeki CCDaV dayanıklılık düzeyleri belirlenmiş ve limonun en duyarlı, üç yapraklı portakalın ise en dayanıklı tür olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında CCDaV'ye dayanıklı ve duyarlı bulunan türlerde, bazı R genlerinin ekspresyon analizleri yapılarak dayanıklılıkta etkili R genleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak portakal bitkisinin genomunda kodlanan R genlerinden 15 tanesi seçilerek bu genlere spesifik primerler tasarlanmıştır. Daha sonra limon ve üçyapraklı portakal bitkilerine aşılama yoluyla CCDaV inokülasyonu yapılmış ve inokülasyondan 3, 6 ve 9 ay sonra alınan yaprak örneklerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Seçilen 15 adet R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol bitkilerinde ekspresyonu real-time RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Bu genlerin altı tanesinin ekspresyonu CCDaV dayanıklı bitkide artarken, diğer genlerde değişmediği belirlenmiştir. Yapılan ekspresyon analizleri ile CCDaV inokülasyonu sırasında dayanıklı üçyapraklı ve duyarlı limonda farklı ekspresyon gösteren R genleri ortaya konulmuştur. Sonuçlar, test edilen R genlerinden yedi tanesinin CCDaV'ye dayanıklılıkta etkili olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, R genleri, Real-Time RT-PCR, CCDaV

2020, 104 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY OF IMPORTANT CITRUS SPECIES TO CITRUS CHLOROTIC DWARF ASSOCIATED VIRUS (CCDaV) AND EXPRESSION ANALYSES OF SOME R GENES

Bengi TOPKAYA

**Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Plant Protection**

Supervisor: Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) is one of the virus diseases adversely effecting yield and quality in citrus production. The disease emerged first in Turkey in the late 1980s and spread to citrus producing areas of the Eastern Mediterranean Region of Turkey. The disease is transmitted by *Parabemisia myricae* (Homoptera: Aleyrodidae) and virus was also reported in China. In this thesis study CCDaV-BATEM-M isolate was identified, biological and molecular characteristics of this isolate was determined. The result of the multiple sequence comparison of the CP gene at amino acid and nucleotide level revealed that the isolates share 99-100 % similarity with other isolates from Turkey and other countries in the world. Then, resistance status of commonly grown citrus species in Turkey to CCDaV were determined. In this respect, six different citrus species were inoculated with CCDaV and virus load at 3, 6, 9 and 12 months after inoculation was determined by absolute quantitation using real-time PCR. By comparing results obtained, resistance levels of these citrus species to CCDaV were determined and it was shown that lemon was the most sensitive and trifoliolate orange the most resistant species against CCDaV. In addition, expression of some R genes were analyzed in the most resistant and susceptible citrus species to determine R genes associated with CCDaV resistance. For this aim, first 15 R genes encoded in genome of sweet orange were selected and gene specific primers were designed for each R gene. Then lemon and trifoliolate orange plants were inoculated with CCDaV by grafting and total RNA was isolated from leaf samples collected from the infected and control plants 3, 6 and 9 months after inoculation. The expressions of the fifteen selected R genes in the infected and control plants were determined by real-time RT-PCR method. As a result, while the expression of six R genes increased in response to CCDaV infection in resistant plants, the expression of the others did not change. The expression analyses revealed some R genes were differentially expressed in resistant trifoliolate orange and susceptible lemon in response to CCDaV infection. The results showed that seven differentially expressed R genes identified in this study may be important for CCDaV resistance.

Key Words: Gene expression, R genes, Real-time RT-PCR, CCDaV

2020, 104 pages

TEŞEKKÜR

Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimlerim süresince bir danışman hocadan daha fazlası olarak bana destek veren, beni yönlendiren, karşılaştığım tüm zorluklarda bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tüm tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak katkıda bulunan değerli tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof. Dr. Savaş KORKMAZ ve Prof. Dr. Gürsel KARACA'ya teşekkürü borç bilirim. Yüksek lisans eğitimimden bu yana sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesini benimle paylaşan, zor günlerimde yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Mehtap ŞAHİN-ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jüri üyeleri sayın hocalarım Prof. Dr. Nüket ÖNELGE ve Doç Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY'a verdikleri destek için çok teşekkür ederim. Çalışmamdaki analizlerin birçoğunu gerçekleştirdiğim danışman hocamın laboratuvarında çalışan değerli lisansüstü öğrencileri Fatma SARIKAYA, Deniz ERKAN, Merve GÜNEY ve Betül GÖNÜLKIRMAZ'a bana gösterdikleri tüm yardımlar için ayrı ayrı teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın en başından sonuna kadar bana her konuda destek olan sayın BATEM Müdürü Dr. Abdullah ÜNLÜ'ye ve BATEM idari kadrosuna çok teşekkür ederim. Sadece tezimde değil hayatımın birçok alanında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan arkadaşım Dr. Ertuğrul TURGUTOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince manevi desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Zir. Yük. Müh. Nejla ÇELİK'e teşekkür ederim. Tezimin moleküler karakterizasyon çalışmaları kısmındaki yardımları için Dr. Ali KARANFİL'e, abstract yazımındaki yardımları için de Zir. Yük. Müh. Gülsüm UYSAL'a çok teşekkür ederim.

Tezimin yürütülmesi için 218 O 133 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bugüne kadar aldığım her kararda beni destekleyen değerli aile bireylerim babam Prof. Dr. Bülent TOPKAYA, annem Deniz TOPKAYA ve ablam Burcu TOPKAYA'ya bu uzun süreçte bana göstermiş oldukları anlayış, özveri ve destekten ötürü sonsuz teşekkür ederim. Doktora çalışmamın tam ortasında hayatıma girerek, bu tezi bitirebilmek için gerekli olan sabrı ve azmi bana öğrettiği için canım kızım Benay KÜTÜK'e sevgilerimi sunarım.

Bengi TOPKAYA
ISPARTA, 2020

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Farklı turunçgil türlerine T göz ve kabuk aşısı yöntemiyle CCDaV inokulasyonu	14
Şekil 3.2. R gen ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla CCDaV duyarlı kara limon ve dayanıklı üç yapraklı bitkilerine CCDaV inokulasyonu.....	17
Şekil 4.1. Antalya ili Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kayaburnu yerleşkesindeki serada bulunan CCDaV ile enfekteli mandarin bitkisinde görülen belirtiler.....	22
Şekil 4.2. CCDaV enfekteli olduğu düşünülen mandarin bitkilerinde yapılan PCR sonucunda CP geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı (M: 100 bç marker, 1-4 CCDaV ile enfekteli bitkiler, 5: Negatif kontrol).....	23
Şekil 4.3. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatının Türkiye ve Dünya izolatlarının kılıf protein genleriyle nükleotit düzeyinde gösterdiği benzerlik oranları	24
Şekil 4.4. Citrus chlorotic dwarf associated virus izolatlarının BATEM-M Türkiye ve Dünya izolatlarının kılıf protein genleriyle aminoasit düzeyinde gösterdiği benzerlik oranları	25
Şekil 4.5. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatlarıyla ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç kılıf protein geninin nükleotid dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemiyle oluşturulmuş ve 1000 tekerrürlü bootstrap analizine tabi tutulmuştur. MMDaV out group olarak kullanılmıştır. Dallanma noktalarındaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir	26
Şekil 4.6. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatlarıyla ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç kılıf protein geninin amino asit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemiyle oluşturulmuş ve 1000 tekerrürlü bootstrap analizine tabi tutulmuştur. MMDaV out group olarak kullanılmıştır. Dallanma noktalarındaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir	27
Şekil 4.7. Örneklerde bulunan CCDaV miktarını belirlemek için geliştirilen standartların qPCR ile çoğaltım eğrileri (A), standart eğri analizleri (B)..	28
Şekil 4.8. CCDaV inokulasyonu yapılan bitkilerden elde edilen bazı TNA'ların agaroz jel elektroforez analiz sonucu.....	29
Şekil 4.9. İnokulasyon yapılan bitkilerin CCDaV enfeksiyonu açısından PCR ile testlenmesine ait agaroz jel elektroforez analiz sonucu	30
Şekil 4.10. İnokulasyondan üç ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi.	33
Şekil 4.11. İnokulasyondan altı ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi.	35
Şekil 4.12. İnokulasyondan dokuz ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonunun ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi.	38
Şekil 4.13. İnokulasyondan on iki ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi.	41
Şekil 4.14. Limon ve üç yapraklı bitkilerinde CCDaV inokulasyonundan 3 ve 6 ay sonra oluşan virüs belirtileri	43
Şekil 4.15. CCDaV enfeksiyonu sırasında limon ve üç yapraklı bitkilerinde <i>Actin</i> , 18S rRNA ve <i>Ubiquitin</i> referans genlerinin çoğaltım eğrileri	44

Şekil 4.16. CCDaV enfeksiyonu sırasında limon ve üç yapraklı bitkilerinde <i>Actin</i> , 18S rRNA ve <i>Ubiquitin</i> referans genlerinin ekspresyon analizleri.....	44
Şekil 4.17. CN R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	47
Şekil 4.18. CN R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	48
Şekil 4.19. CNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	50
Şekil 4.20. CNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	50
Şekil 4.21. MLO-Like R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	52
Şekil 4.22. MLO-Like R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	53
Şekil 4.23. N R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	55
Şekil 4.24. N R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	55
Şekil 4.25. NL-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	57
Şekil 4.26. NL-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	58
Şekil 4.27. NL-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	60
Şekil 4.28. Limon ve üç yapraklı portakalda NL-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol bitkilerindeki ekspresyon analizi	60
Şekil 4.29. T-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	63
Şekil 4.30. T-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	63
Şekil 4.31. T-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	65
Şekil 4.32. T-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	66
Şekil 4.33. TNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	68
Şekil 4.34. TNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	68
Şekil 4.35. RLK-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	70
Şekil 4.36. RLK-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	71
Şekil 4.37. RLK-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	73
Şekil 4.38. RLK-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	73
Şekil 4.39. RLP-3 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	75
Şekil 4.40. RLP-3 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	76

Şekil 4.41. RLP-5 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	78
Şekil 4.42. RLP-5 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	78
Şekil 4.43. Unknown 2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	80
Şekil 4.44. Unknown 2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	81
Şekil 4.45. Unknown 6 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri.....	83
Şekil 4.46. Unknown 6 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi.....	83



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri ve prob	15
Çizelge 3.2. Turunçgillerde CCDaV enfeksiyonu sırasında ekspresyon analizi yapılmak üzere seçilen R genleri için tasarlanan primerler ve genel özellikleri	18
Çizelge 4.1. CCDaV inokülasyonundan üç ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğunun eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi	32
Çizelge 4.2. CCDaV inokülasyonundan altı ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi	34
Çizelge 4.3. CCDaV inokülasyonundan dokuz ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi	37
Çizelge 4.4. CCDaV inokülasyonundan on iki ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi	40
Çizelge 4.5. CCDaV ile enfekteli tüm çeşitlerin 1 yıllık eşik döngü değerleri.....	42
Çizelge 4.6. CCDaV enfekteli tüm çeşitler 1 yıllık virüs yoğunluğu değerleri	42
Çizelge 4.7. Total RNA izolasyonu sonrası üç yapraklı ve limon bitkilerinden elde edilen ortalama total RNA konsantrasyon ve kalite değerleri	45
Çizelge 4.8. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CN geninin ekspresyon analizi	48
Çizelge 4.9. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL geninin ekspresyon analizi.....	51
Çizelge 4.10. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde MLO-Like geninin ekspresyon analizi	53
Çizelge 4.11. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde N geninin ekspresyon analizi	56
Çizelge 4.12. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-1 geninin ekspresyon analizi	58
Çizelge 4.13. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-2 geninin ekspresyon analizi	61
Çizelge 4.14. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-1 geninin ekspresyon analizi	64
Çizelge 4.15. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-2 geninin ekspresyon analizi	66
Çizelge 4.16. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde TNL geninin ekspresyon analizi	69
Çizelge 4.17. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-1 geninin ekspresyon analizi.....	71
Çizelge 4.18. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-2 geninin ekspresyon analizi.....	74
Çizelge 4.19. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-3 geninin ekspresyon analizi	76
Çizelge 4.20. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-5 geninin ekspresyon analizi	79

Çizelge 4.21. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 2 geninin ekspresyon analizi	81
Çizelge 4.22. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 6 geninin ekspresyon analizi	84



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
ark.	Arkadaşları
Avr	Avirülens
bç	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCDaV	Citrus chlorotic dwarf associated virus
CCDD	Citrus Chlorotic Dwarf Disease
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CEVd	Citrus exocortis pospiviroid
CIVV	Citrus infectious variegation virus
CN	Coiled coil nucleotid binding site
CNL	Central nucleotid binding
CP	Coat protein
CPsV	Citrus psorosis virus
Cq	Quantitation cycle
CTAB	Cetyl trimethyl amonium bromide
CTLV	Crinkly leaf type virus
CTV	Citrus tristeza virus
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	Elitendiamin tetraasetik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gram
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GLM	General Linear Model
HR	Hypersensitive response
KCL	Potasyum klorür
LSD	Least Significant Difference
mg	Miligram
Mlo-like	Mildew resistance lokus O
mM	Milimolar
MMDaV	Mulberry mosaic dwarf associated virus
N	Nucleotid binding site
NaCl	Sodyum klorür
NBS-LLR	Nucleotid binding site leucine-rich repeat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
NJ	Neighbour joining
nt	Nükleotid
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
pmol	Picomol
qPCR	Real time polymerase chain reaction
qRT-PCR	Real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
R	Resistance
RLK	Receptor-like kinases
RLP	Receptor-like proteins
RNA	Ribonükleik asit

rpm	Revolutions Per Minute
RPW8-NL	Powdery mildew resistance protein binding site
sa	Saat
SAS	Statistical Analysis Software
SDV	Satsuma dwarf nepovirus
sn	Saniye
T	Tool
TİM	Türkiye İhracatçılar Meclisi
TMV	Tobacco mosaic virus
TN	Tool nucleotid binding site
TNA	Total nükleik asit
TNL	Tool nucleotid binding site leucine-rich repeat
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tris-HCL	Tris Hydrochloride
Triton X-100	Polyoxyethylene octyl phenyl ether
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
V	Volt
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ

Kökeni Güneydoğu Asya'ya dayanan turunçgillerin 19. yüzyılda Amerika'da başlayan üretimi, zaman içerisinde dünyanın diğer ülkelerine de yayılmıştır. Turunçgiller portakal, limon, mandarin ve greylort gibi "Citrus" cinsine dahil olan türleri içermektedir. Sahip oldukları zengin C vitamini içerikleri ile insan beslenmesindeki öneminin yanında, kendine has koku ve renk sayesinde kozmetik sanayi hammaddesi arasında yer almış ve hem yetiştiricilik hem de tüketim açısından geniş bir arz-talep dengesi oluşmuştur (Karahocagil vd., 2003).

Dünya'da turunçgil üretiminin en çok yapıldığı ülkeler Çin, Brezilya ve Hindistan'dır. Ülkemiz ise 2017 yılı verilerine göre 4.7 milyon ton üretimi ile dünya turunçgil üretiminin % 3.25'ini yapmaktadır. Türkiye turunçgil üretiminin % 40.88'ini portakal, % 32.51'ni mandarin, % 21.12'sini limon, % 5.45'ini altıntop ve % 0.04'ünü ise diğer turunçgil meyveleri oluşturmaktadır. Ülkemizin sahip olduğu iklimsel ve ekolojik koşullar turunçgil üretimine çok elverişli olmasından dolayı, bu rakamlar her yıl artış göstermektedir (FAO, 2017).

Turunçgillerde verim ve kaliteyi etkileyen birçok virüs, viroid, bakteri ve fungal hastalık bulunmaktadır. Bu hastalıklar gövde, kök, yaprak, çiçek ve meyve gibi bitkinin tüm organlarını etkileyebilmektedir. Hastalıklar bitkilerin verimini ve ürünlerin kalitesini düşürerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Turunçgillerin çok yıllık bitkiler olmasından ve genel olarak hastalık gelişimine uygun ortamlarda yetiştirilmelerinden dolayı hastalıklarla mücadele oldukça zor olmaktadır. Turunçgillerde üretim genellikle aşılama yoluyla yapıldığından aşıyla taşınan virüs ve virüs benzeri etmenler en önemli hastalıkları oluşturmaktadır. Virüs hastalıklarının mücadelesine yönelik herhangi bir tarım ilacı bulunmaması ve bir kez enfekte olan bir ağacın tüm yaşamı boyunca bu hastalığı taşıması turunçgil üretiminde virüs hastalıklarının önemini artırmaktadır.

Tüm dünyada turunçgil yetiştirilen alanlarda 80'e yakın virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmektedir. Bunlardan bir kısmı bulaştıkları ağaçlara hafif zarar verirken, büyük bir kısmı ise neden oldukları verim ve kalite kayıpları ile turunçgil tarımını önemli ölçüde engellemektedir. Bu hastalıklardan en önemlilerine citrus tristeza virus

(CTV), citrus psorosis virus (CPsV), satsuma dwarf nepovirus (SDV), citrus exocortis pospiviroid (CEVd) örnek olarak verilebilir (Roistacher, 1991; Ganesh vd., 2018).

Günümüzde bitkilerde bakterilere, funguslara, virüslere ve nematodlara karşı dayanıklılık sağlayan 60'tan fazla dayanıklılık geni belirlenmiştir. Bu genlerin her biri farklı hastalık etmenlerine karşı dayanıklılık sağlasa da genlerin moleküler yapıları ve fonksiyonları birbirlerine benzemekte ve bitkilerde aynı veya benzer savunma mekanizmalarını uyarmaktadırlar. Son yıllarda bitkilerin tüm genom dizilimlerinin tamamlanması sonucu her bir bitki genomunda yüzlerce R geninin bulunduğu belirlenmiş ve bu genlerin bitkilerdeki etmen spesifik savunma mekanizmalarının temelini oluşturduğu ortaya konmuştur.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile turunçgillerde göreceli olarak yeni ortaya çıkan ve ülkemizde farklı turunçgil türlerinde hastalığa yol açarak ülkemiz ve dünya turunçgil üretimi açısından potansiyel bir tehlike oluşturan CCDaV etmeninin etkilerini azaltmaya yönelik olarak, farklı turunçgil türlerinin virüse karşı dayanıklılık durumları ortaya konulmuş ve dayanıklılıkta etkili olabilecek R genleri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Turunçgil Yetiştiriciliği ve Önemi

Ülkemizde turunçgil üretiminin % 95'i Akdeniz ve Ege kıyılarında yapılmaktadır ve farklı bölgelerde farklı turunçgil türlerinin yetiştiriciliği ön plana çıkmaktadır. Mersin, Adana ve Hatay illerini içeren Doğu Akdeniz Bölgesi'nde toplam turunçgil üretiminin yaklaşık % 70'inden fazlası yapılmaktadır. Bu bölgede üretimi yapılan turunçgil türleri ise % 94 greyfurt, % 87 limon, % 82 mandarin ve % 53 oranında portakaldır. Ülkemizin ikinci büyük turunçgil üretim bölgesi ise Antalya İli ve çevresini içeren Batı Akdeniz Bölgesi'dir. Turunçgil üretiminin yaklaşık % 14'ü bu bölgeden sağlanmaktadır ve en çok üretimi yapılan tür ise portakaldır. Üçüncü bölge ise İzmir ve çevresini içeren Ege Bölgesi olup, toplam turunçgil üretiminin % 8-10'u bu bölgeden elde edilmektedir. Ege Bölgesi'nde en çok üretilen turunçgil türü ise mandarindir. Ülkemizde turunçgil yetiştiriciliği yapılan başka bir bölge de Doğu Karadeniz'dir. Rize ilinde yoğunlaşan üretimde ağırlıklı olarak mandarin yetiştirilmektedir (TÜİK, 2017).

Ülkemiz dünya turunçgil üretimi içerisinde oldukça önemli bir potansiyele sahip olup, her geçen yıl önemli bir artış görülmektedir. Dünya turunçgil üretim miktarında son 10 yılda % 18 oranında bir artış gerçekleşirken, Türkiye'de bu artış % 30 oranında olmuştur. Türkiye, turunçgil ürünlerinin dış ticaretinde net ihracatçı durumunda yer almakta ve ihracat değeri bakımından mandarinde dünyada 3, limonda 4, portakal ve altıntopta ise 5. sırada yer almaktadır. Yaş meyve sebze ihracatı içerisinde turunçgillerin payı yaklaşık % 44 düzeyindedir (TİM, 2017).

2.2. Citrus Chlorotic Dwarf Associated Virus (CCDaV)

Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki turunçgil üretim alanlarında 1980'li yılların sonunda yürütülen bir sörvey çalışmasında özellikle İçel ve Tarsus yöresinde virüs benzeri bir hastalığın yaygınlığı tespit edilmiştir. Simptomatolojik olarak yapılan ilk gözlemlerde Turunçgil yaprak kıvrıcıklık virüs (Citrus crinkly leaf virus) ile çok benzer olmasından dolayı hastalık ilk başlarda bu isim altında adlandırılmıştır.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Adana ve İçel illerindeki turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda başta Kütdiken limon olmak üzere, Minneola tangelo, Freemont ve Satsuma mandarini, Yafa ve Washington portakal çeşitlerinin yapraklarında kırışıklık ve buruşukluk belirtileri gözlenmiştir (Önelge ve Çınar, 1992).

Çınar vd. (1993), Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki turunçgil üretim alanlarında yaptıkları sörvey çalışmalarında, özellikle limon bitkilerde Crinkly leaf type virus (CLTV) belirtilerine çok fazla rastlamışlardır. Belirtilerin bu kadar hızlı yayılmış olmasından dolayı, etmenin bir vektörü olabileceğini düşünmüşlerdir.

Korkmaz vd. (1995), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaptıkları arazi çalışmalarında bitkilerdeki belirtilerin citrus infectious variegation virus (CIVV)'a ait olabileceğinden şüphelenmişlerdir. Ancak laboratuarda CIVV'e özgü antiserumlar ile yapılan ELISA analizlerinde pozitif sonuç elde edilememiş ve etmenin farklı bir virüs olduğu düşünülmüştür. Etmenin tanımlanması için hastalık ile ilgili birçok saflaştırma çalışmaları yapılmış, fakat bir sonuç alınamamıştır. Araştırmacılar hastalığı Citrus chlorotic dwarf disease (CCDD) olarak adlandırmışlardır.

Korkmaz vd. (1996), CCDD'nin taşınması ve epidemiyolojisi üzerinde yaptıkları çalışmada, hastalığın Japon defne beyazsineği *Parabemysia myricae* (Kuwana) (Hom.: Aleyrodidae) ile taşındığını göstermiştir. Yapılan çalışmada etmenin 24 saatlik beslenme süresinden sonra taşınma oranının % 18 olduğu, 48 saatlik beslenmeden sonra % 46'ya ulaştığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, etmenin gövdeye kesik atma yöntemi ile de % 5 ile % 72 oranında limon bitkisine inoküle edilebildiğini saptamışlardır.

Korkmaz vd. (1997), yaptıkları bir çalışmada CCDD'nin limon, altıntop, mandarin ve tangelolarda hastalık oluşturduğu, bunun yanında portakal ve bazı mandarin çeşitlerinin (Marisol, Hernandina, Robinson) diğer çeşitlere oranla hastalığa biraz daha tolerant olduğu gözlemsel olarak saptanmıştır.

Hastalığın ilk olarak ülkemizde ortaya çıkması ve beyazsinek ile taşınıyor olması, turunçgil üretimi yapan diğer ülkelerin de dikkatini çekmiştir. 2008 yılında Fransa'da CCDD'nin ülkeye girişini engellemek için bir rapor yayınlanmıştır (Baker vd., 2008).

2000’li yıllardan günümüze kadar hastalık güncelliğini korumasına ve turunçgil üretimini tehdit etmesine rağmen ülkemizde otsu bitkilere taşıma denemeleri dışında (Gök, 2010) başka bir çalışma yapılmamıştır. Araştırmacı aralarında fasulye, börülce, susam, tütün, patlıcan, domates, hıyar, kabak ve kazayağının bulunduğu 9 farklı otsu konukçu türü seçerek inokulasyonlar yapmış, fakat hiçbirinde belirti gözlemlenmemiştir.

Loconsole vd. (2012a), 1990’lı yıllarda ülkemizdeki turunçgil alanlarında CCDD belirtisi gösteren hastalıklı örnekleri alarak İtalya’ya götürmüşler ve orada yaptıkları metagenomik çalışmalar sonucunda hastalıklı bitki dokusunda 3640 nükleotidlik *Geminiviridae* familyasına ait tek sarmal DNA genomlu, 5 farklı açık okuma bölgesine sahip bir virüsün genom dizilimini elde etmişlerdir. Elde edilen bulgulara dayanarak bu genom dizisinin CCDD hastalık etmeninin Turunçgil klorotik cüceleşme hastalığıyla ilişkili olduğu ve hastalık etmeninin (Citrus chlorotic dwarf associated virus; CCDaV) olarak isimlendirilmesini önermişlerdir.

Etmenin moleküler olarak tanımlanmasının ardından Guo vd. (2015), Çin’de daha önce özellikle limonlarda gözlenen belirtiler üzerine, kendi ülkelerindeki turunçgil üretim alanlarından alınan örnekler üzerinde yaptıkları analizler sonucunda dünyada ilk kez ülkemiz dışında CCDaV’nin varlığını tespit etmişlerdir. Buna ek olarak Türk CCDaV izolatının tüm genom dizisi ile Çin izolatının genomu arasında nükleotit düzeyinde %96 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Zhou vd. (2017), Çin’de CCDaV varlığının tespiti üzerine yaptıkları çalışmalar kapsamında 2014-2016 yılları arasında Çin’in en çok turunçgil üretimi yapılan 11 ilindeki 175 bahçeye sürveyler düzenleyerek toplam 2432 örnek toplamışlardır. Yapılan CCDaV tanılama çalışmaları sonucunda etmenin varlığı 4 limon örneğinde tespit edilmiştir. Araştırmacılar CCDaV ile enfekteli az sayıda bitki bulunmasından dolayı, virüsün Çin’de henüz yaygın olmadığını belirtmişlerdir. Elde edilen CCDaV ile enfekteli örneklerin moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda, izolatların birbirleri ile oldukça düşük sekans heterojenitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Bozan ve Önelge (2018), CCDaV’nin Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki son durumunu belirlemek amacıyla yaptıkları arazi çalışmalarında, limonlarda % 36, mandarinlerde

% 25.3, portakallarda % 17.6 ve altıntoplarda % 17.5 oranında bulaşıklık olduğunu görsel olarak belirlemişlerdir. Virüs belirtisi gösteren 50 bitkiden aldıkları örneklerden yapılan PCR analizleri hastalık belirtisi gösteren bu örneklerin tamamının CCDaV enfekteli olduğu belirlenmiştir.

Karanfil ve Korkmaz (2018), CCDaV'nin Doğu Akdeniz Bölgesi dışında kalan turunçgil üretim bölgelerine yaptıkları arazi çalışmaları ile sonucunda Akdeniz Bölgesi'nden (Antalya) 55, Ege Bölgesi'nden (İzmir) 54, Marmara Bölgesi'nden (Edremit körfezi) 18 ve Karadeniz Bölgesi'nden (Rize) 16 olmak üzere toplam 143 şüpheli örnek toplamışlardır. Toplanan örneklerin testlenmesi sonucu Antalya ilinde bir otel bahçesinden ve İzmir ilinde bir fidanlıktan alınan iki örnekte CCDaV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan tüm genom dizileme ve dizi analizleri sonucunda bulunan izolatlar Çin izolatları ile % 99 oranında benzerlik göstermiştir.

Karanfil ve Korkmaz (2019), yaptıkları bir çalışmada farklı turunçgil türleri ve hibritinden elde edilen 25 CCDaV izolatının CP genine göre genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda CCDaV izolatlarının CP genine göre yüksek seviyede dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Türk CCDaV izolatlarının CP genine göre kendi içlerinde ve Çin izolatları ile nükleotid ve aminoasit düzeyinde gerçekleştirilen çoklu dizi analizleri sonucunda birbirleri ile genel olarak % 98'in üzerinde benzerlikler gösterdiği görülmüştür. Buna ek olarak, izolatların filogenetik ilişkilerinin araştırılması amacı ile gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda ise CCDaV izolatlarının elde edildikleri konukçu türlere göre bir ilişki göstermediği fakat coğrafi orijin olarak Türk ve Çin izolatlarının birbirinden ayrıldığı belirlenmiştir.

Karanfil (2019), CCDaV'nin mevsimsel konsantrasyon değişimlerinin takibi amacı ile gerçekleştirmiş olduğu qPCR çalışmaları sonucunda, CCDaV konsantrasyon seviyesinin özellikle ilkbahar aylarında kuzey yönlerinden alınan örneklerde en yüksek seviyeye ulaştığını belirlemiştir. Etmenin en düşük konsantrasyon seviyesi ise kış aylarında alınan örneklerde tespit edilmiştir. Ayrıca etmenin mevsimsel konsantrasyon seviyesinin yılın herhangi bir zamanında PCR ile tanılama yapılması için yeterli seviyede olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda etmen tanılmasının mevsimsel değişikliklere bağlı olmaksızın yılın herhangi bir zamanında alınan yaprak örneklerinden yapılabileceği belirtilmiştir.

2.3. R Dayanıklılık Genleri

Bir patojenin normal yaşamını devam ettirdiği konukçu bitki hassas, patojen de virulent olarak adlandırılmaktadır. Patojen enfeksiyon yapabilmekte ve bitkide kolayca çoğalıp yüksek yoğunluğa ulaşarak şiddetli hastalık belirtileri oluşturabilmektedir. Buna karşılık patojen bitkide enfeksiyon yapabildiği halde yoğunluğu belirli bir düzeyde kaldığı için yapmış olduğu zararın ekonomik zarar eşliğini geçmediği bitkiler ise tolerant olarak adlandırılmaktadır. Ancak, bitki bu patojenin gelişme ve çoğalmasını tamamen durdurabiliyor ise, bu bitki genel anlamıyla dayanıklı olarak kabul edilmekte ve patojen de avirulent olarak isimlendirilmektedir (Çandar ve Erkan, 2011).

Bitkilerde dayanıklılık yapısal, biyokimyasal ve genetik dayanıklılık olmak üzere üç şekilde ortaya çıkmaktadır. Bunlardan genetik dayanıklılık, dayanıklılık genleri aracılığıyla kontrol edilmekte olup, virüs hastalıklarına karşı yatay ve dikey dayanıklılık olmak üzere iki farklı genetik dayanıklılık bulunmaktadır. Yatay dayanıklılık çok sayıda gen tarafından kontrol edilen ve virüse özel olmayan kantitatif dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır. Dikey dayanıklılık ise tek gen aracılığı ile kontrol edilen ve genellikle tek bir patojen veya virüse karşı gene-karşı-gen ilişkisine dayalı dayanıklılık sağlayan etmen spesifik ve kalıtsal bir dayanıklılıktır. Temel olarak bitkideki dayanıklılık geninin etmendeki avirülens (avr) geni olarak adlandırılan başka bir genle etkileşimine dayanmaktadır. Çoğunlukla patojende avirulenslik, konukçuda da dayanıklılık dominanttır, fakat bunun tersi de görülebilmektedir. Genel olarak, patojenin avr geninde mutasyon gibi bir sebeple meydana gelen değişim nedeniyle bitki patojeni tanımamakta ve enfeksiyon durumu devam etmektedir. Dolayısıyla bu durumda dayanıklılığın tekrar olabilmesi için, bitkideki R geninde de belirgin bir değişikliğin olması gerekmektedir.

Virüslere dayanıklılık sağlayan dominant genler, dayanıklılık R genleri, birçok bitkide tanımlanmıştır. Bitkilerde virüse dayanıklılık sağlayan ilk dominant dayanıklılık geni N geni olup *Nicotiana glutinosa*'da keşfedilmiştir. Tütün bitkisinde Tütün mozaik virüsü (TMV)'ne karşı aşırı duyarlılık (hipersensitif reaksiyon, HR) ile ilişkili dayanıklılığı yöneten bir gendir. N geni, HR sonucunda virüsün yayılmasını nekrotik alanlarla sınırlandırdığı için nekrozun baş harfi N ile adlandırılmıştır. Daha sonra

yapılan çalışmalarda bitkilerde hastalık etmenlerine karşı dayanıklılık sağlayan çok sayıda dominant gen bulunduğu ve bunların yapısal ve fonksiyonel olarak farklı bitkilerde korunmuş olduğu belirlenmiştir. Bu genler dayanıklılık anlamına gelen “resistance” kelimesinin baş harfi R ile isimlendirilmiş geniş bir gen ailesini oluşturmakta olup tüm bitkilerde bulunmaktadır (Çandar ve Erkan, 2011).

Günümüzde bitkilerde bakterilere, funguslara, virüslere ve nematodlara karşı dayanıklılık sağlayan 60’dan fazla R dayanıklılık geni belirlenmiştir. Bu genlerin her biri farklı hastalık etmenine karşı dayanıklılık sağlasa da genlerin moleküler yapıları ve fonksiyonları birbirlerine benzemekte ve bitkilerde aynı veya benzer savunma mekanizmalarını uyarılmaktadırlar. Son yıllarda bitkilerin tüm genom dizilimlerinin tamamlanması sonucu her bir bitki genomunda yüzlerce R geni analogu bulunduğu belirlenmiş ve R genlerinin bitkilerdeki etmen spesifik savunma mekanizmalarının temelini oluşturduğu ortaya konmuştur. R genleri bitki genomlarında önemli bir yer tutmakta olup model bitki *Arabidopsis thaliana* genomunda 1356 R geni bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca genom dizilimi tamamlanan tarımsal üretim açısından önemli bitkilerden çeltik genomunda 102 ve domates genomunda 465 adet R geni bulunmaktadır (Sanseverino vd., 2010). Tarımsal üretim açısından önemli bir odunsu bitki olan asma genomunda 253 ve turunçgillerin model türü olarak tüm genom dizilimi tamamlanan portakal genomunda ise 249 potansiyel R geni belirlenmiştir.

Bitki dayanıklılık genlerinin kodladıkları proteinlerin yapıları incelenip karşılaştırıldığında tüm R dayanıklılık proteinlerinin domain adı verilen korunmuş özel bölgelere sahip olduğu görülmektedir. R proteinleri yapısal olarak daha yakından incelendiğinde korunmuş bu özel bölgelerin farklı biyokimyasal fonksiyonları oldukları belirlenmiştir. R proteinleri taşıdıkları fonksiyonel domainlerin biyokimyasal yapısına bakılarak en az 6 farklı sınıfa ayrılarak gruplandırılmıştır (Gururani vd., 2012). Bu sınıflar içerdikleri fonksiyonel domainlere göre CN, CNL, Kinase, Mlo-like, N, NL, Pto-like, RLK, RLK-GNK2, RLP, RPW8-NL, T, TN, TNL ve diğerleri olarak adlandırılmaktadır (Sanseverino vd., 2010). Bitkilerdeki viral dayanıklılık genlerinin büyük bir çoğunluğu R genlerinin NBS-LLR domaini içeren alt sınıfında bulunmakta ve tek genle dominant dayanıklılık sağlamaktadır. Örneğin, Rice yellow mottle virus’e karşı çeltikte eIF (iso) 4G1 R geni, *Arabidopsis thaliana*’da Cucumber mosaic virus’e karşı RCY1 geni, bu grup içerisinde yer almaktadır (Jones,

2001). Ayrıca patates bitkisinde Potato virus X'e karşı R dayanıklılık genleri Rx-1 ve Rx-2, ve şeftali bitkisinde Şarka virüsü'ne karşı dayanıklılık sağlayan eIF(iso)4E ve Sde3 R genleri de NBS-LLR alt sınıfı içinde yer almaktadır (Decroocq vd., 2005). Bunların yanında tobacco mosaic virus'e karşı ise domateste Tm-1, Tm-2 ve Tm2² genleri, yine domateste tomato spotted wilt virus'e karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 R geni de bu alt sınıf içerisinde bulunmaktadır. Bunların yanında turunçgiller içerisinde üç yapraklı portakalda (*P.trifoliata*) CTV'ye karşı geniş dayanıklılık sağlayabilecek potansiyel CTV R genlerinin bazıları NBS-LRR alt sınıfında bulunmaktadır (Gururani vd., 2012).

Turunçgillerin model türü olarak seçilen portakalın (*Citrus sinensis*) tüm genom dizilimi Xu vd. tarafından 2013 yılında tarafından tamamlanarak yayınlanmıştır. Portakal genomunda kodlanan tüm genler, gen bankası veri tabanlarında mevcut olup genlerin fonksiyonel analiz çalışmaları devam etmektedir. Portakal genomunda kodlanan proteinlerin karşılaştırmalı analizleri sonucunda portakal genomunda 249 adet potansiyel R geni bulunduğu belirlenmiştir.

Turunçgillerin en önemli hastalığı olan tristeza hastalığının etmeni CTV'ye karşı üç yapraklı portakalda dayanıklılık sağlayan dominant bir dayanıklılık geni olan CTV belirlenmiştir. Gen haritalama çalışmaları sonucunda kromozomda bulunduğu belirlenen CTV dayanıklılık genini içeren CTV lokusu belirlenmiştir. Daha sonra yapılan gen klonlama çalışmaları sonucunda lokus 200 000 bp gen bölgesi içerisinde bulunan CTV lokusunda çok sayıda R dayanıklılık geni olduğu saptanmıştır. CTV dayanıklılığını sağlayan R geninin izolasyon çalışmaları hala devam etmektedir.

Bu çalışmada, turunçgillerde göreceli olarak yeni ortaya çıkan ve ülkemizde farklı turunçgil türlerinde hastalığa yol açarak ülkemiz ve dünya turunçgil üretimi açısından tehlike oluşturan citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV)'ünün yol açtığı hastalığın azaltılması ve yayılmasını engellemek amaçlanmıştır. Bu ana amaç doğrultusunda, ticari olarak önemli olan turunçgil türlerinin CCDaV'ye dayanıklılık durumları araştırılarak virüse en dayanıklı ve en duyarlı tür belirlenmiştir. Ayrıca en dayanıklı ve en duyarlı turunçgil türlerinde R genlerinin ekspresyon analizlerinin yapılarak CCDaV'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan R genleri tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma; Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bitki Sağlığı Laboratuvarı ve Meyvecilik Bölümü'ndeki hastalık ve zararlı kontrollü seralar kullanılarak yürütülmüştür. Üç ayrı aşamada gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, her bir aşamada kullanılan yöntemler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

3.1. CCDaV'nin Tespiti ve Karakterizasyonu

3.1.1. Virüs izolatu

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Kayaburnu yerleşkesinde bulunan meyvecilik bölümündeki virüs indeksleme serasında muhafaza edilen kara mandarin bitkisinden alınan CCDaV izolatları kullanılmıştır.

3.1.2. Total nükleik asit izolasyonu

Alınan örnekteki CCDaV varlığını teyit etmek için öncelikle örneklerden toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam nükleik asit izolasyonu Li vd. (2008) belirttiği şekilde CTAB metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak toplanan örneklerden 100 mg alınarak, 1 ml CTAB (% 2 CTAB, 100mM Tris, 1.4 M NaCl, 20 Mm EDTA) ve 2 µl DDT ile steril porselen havanlar kullanılarak bitki örnekleri ezilmiştir. Ezilen bitki örnekleri ve CTAB solüsyonunu içeren karışım steril eppendorf tüplerine alınarak 1 dak. vorteks yapılmış ve ardından -20°C'de 30 dak. bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda donan homogenat çözülünceye kadar tekrar vorteks yapılmıştır. Daha sonra örnekler 65°C'de 15 dak bekletilmiş ve bekleme süresince tüpler her 5 dak. bir alt üst edilmiştir. Sonra tüpler 12 000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpte üstte kalan süpernatant kısımdan 650 µl alınarak yeni steril eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde 24:1 oranında hazırlanan kloroform:izoamilalkol eklenerek tüpler alt üst edilmiş ve 14 000 rpm'de 10 dak. santrifüj yapılmıştır. Oluşan süpernatanttan 350 µl alınarak yeni eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 150 µl soğuk izopropanol eklenerek pipetle yavaşça karıştırılmıştır. Tüpler 14 000 rpm'de 10 dak. santrifüj yapılmıştır. Tüplerin dibinde

pelet oluşumu gözlenmiş ve bu peletlere zarar vermeden üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Peletler 1000 µl % 70'lik etil alkol ile yıkanarak 12 000 rpm'de 5 dak. santrifüj yapılmıştır. Sonrasında yine peletlere zarar vermeden etil alkol uzaklaştırılmış ve tüpler 5-10 dak. arasında oda sıcaklığında kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Sürenin sonunda pelet 50 µl Tris-HCl (20mM, pH:8) ile çözdürülmüştür. Elde edilen nükleik asitler % 1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiş, konsantrasyonları ve kaliteleri nanodrop spektrofotometre (Thermo, ABD) ile ölçülerek kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.1.3. Oligonükleotit primerlerin hazırlanması

Virüsün CP geni referans alınarak bu bölgenin tamamını çoğaltacak şekilde gen bankasındaki JQ920490 (Loconsole vd., 2012a) erişim numaralı CCDaV izolatu sekans verileri kullanılarak BC227_CCDaV_F ve BC228_CCDaV_R kodlu bir çift primer tasarlanmış (Çizelge 3.1) ve hizmet alımı şeklinde ticari bir firma aracılığı ile sentezletirilmiştir (Iontek, Türkiye).

3.1.4. Virüsün tespiti

Virüsün tespiti Thermo (ABD) firmasından temin edilen PCR kiti ve MJ Mini Personal termal döngü cihazı kullanılarak (Bio-Rad, ABD) PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Örneklerde CCDaV enfeksiyonunun varlığının belirlenmesi amacıyla -80°C'de saklanan TNA'lar, virüs CP genine spesifik primerler ve PCR kiti kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım için 1X PCR karışımı (50 mM KCL, 10 mM Tris HCl 25°C pH: 9.0, % 1 Triton X-100) için 10 mM dNTP, BC227-CPG-F ve BC228-CPG-R primerleri ve 500U Taq polimeraz enziminden 0.25 mM olacak şekilde karıştırılıp steril saf su ile 25 µl' ye tamamlanmıştır. PCR tüpleri etiketlenerek hazırlanan karışımdan her bir tüpe 23 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve üzerine 2 µl örnek DNA'ları eklenmiştir. Hazırlanan PCR karışımı 94°C'de 3 dak 40 defa tekrarlanan 94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn, 72°C'de 45 sn, 72°C'de 5 dak. ve daha sonra da 4°C'de bekleyecek şekilde programlanan termal döngü cihazına konulup CCDaV CP genlerinin çoğaltılması sağlanarak örneklerde CCDaV varlığına bakılmıştır. PCR

ürünleri % 1.5'lük agaroz jelinde elektroforez yöntemi ayrıştırılarak Enduro™ GDS Touch Gel görüntüleme cihazında görüntülenerek analiz edilmiştir.

3.1.5. Moleküler karakterizasyon çalışmaları

CCDaV izolatının moleküler karakterizasyonu izolatın tanınmasında kullanılan CP geni temel alınarak yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak izolatın CP geni, gen spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle yukarıda belirtilen protokol kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünü EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (Bio Basic Inc., Kanada) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan CCDaV CP geninin nükleotid dizilimi Sanger dizi analiz yöntemine göre otomatik DNA dizileme cihazında (Refgen Biyoteknoloji, Ankara) çift yönlü olarak doğrudan dizilenecek belirlenmiştir. Elde edilen çift yönlü DNA dizileri CLC Main Workbench programında bulunan Contig Assembly Modülüyle analiz edilip birleştirilerek elimizde bulunan CCDaV izolatının konsensüs CP gen dizilimi oluşturulmuştur. Elde edilen CP gen dizilimi GenBank veritabanında bulunan ülkemize ve diğer ülkelere ait CCDaV izolatlarının CP dizilimleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan çoklu karşılaştırmalarla izolatın CP geninin diğer izolatlarla nükleotid ve amino asit düzeyinde benzerlikleri belirlenmiştir. Daha sonra çoklu dizi karşılaştırmaları yardımıyla, kullanılan CCDaV izolatının ülkemiz ve dünya izolatlarıyla filogenetik analizler için de Clustal W ile elde edilen çoklu dizi karşılaştırma dosyaları kullanılarak Kiamura iki parameter algoritması uygulanan neighbour-joining ve UPGMA yöntemleriyle filogenetik soy ağaçları oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu istatistiki olarak belirlemek amacıyla 1000 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmış ve tesadüfi olarak oluşan küme ve/veya dalları engellemek için en az % 50 bootstrap eşiği uygulanmıştır

3.2. Turunçgil Türlerinin CCDaV'ye Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi

3.2.1. Standart oluşturma ve testleme

Kantitatif PCR'da virüs yoğunluğunun belirlenmesi için farklı yoğunluklarda hedef DNA içeren standartlar oluşturularak kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle CCDaV'nin kılıf protein (CP) geni PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan CP geni PCR saflaştırma kitiyle saflaştırıldıktan sonra ürününün konsantrasyonu NanoDrop

spektrofotometrede (Thermo, ABD) ölçülerek miktarı belirlenerek standart oluşturmada kullanılmıştır. Miktarı ng cinsinden belirlenen saflaştırılmış PCR ürünlerindeki hedef gen kopya sayısı Çizelge 3.1'deki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Kopya Sayısı} &= \frac{\text{Hedef DNA Miktarı (ng)} * \text{Avagado Sayısı}}{\text{Hedef DNA Uzunluğu (bç)} * \text{Dönüştürme}} \\ \text{Faktörü} &\left(\frac{\text{ng}}{\text{g}}\right) * \text{Ortalama Moleküler Ağırlık} \left(\frac{\text{g}}{\text{bç mol}}\right) \\ \text{Kopya Sayısı} &= \frac{\text{Hedef DNA Miktarı (ng)} * 6.022 \times 10^{23}}{\text{Hedef DNA Uzunluğu (bç)} * 1 \times 10^9 * 660} \end{aligned} \quad (3.1)$$

Bu konsantrasyon baz alınarak 4×10^{10} , 4×10^9 , 4×10^8 , 4×10^7 , 4×10^6 , 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 yoğunluklarda kılıf protein içerecek şekilde seri seyreltmeler yapılmış ve CCDaV'nin mutlak kantitasyon için 8 farklı standart oluşturulmuştur. Bu standartlara göre doku örneklerindeki virüs yoğunluğu belirlenmiştir.

3.2.2. Bitki materyali ve yetiştirilmesi

Çalışmanın ana materyalini Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kayaburnu yerleşkesinde bulunan Meyvecilik Birimi'nde yetiştirilen ve muhafaza edilen bir yaşındaki portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), limon (*Citrus lemon*), altıntop (*Citrus paradisi*), turunç (*Citrus autantium*), üç yapraklı (*Poncirus trifoliata*) bitkileri oluşturmaktadır.

Her bir turunçgil türüne ait tohumlar, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Meyvecilik Bölümü'ne ait hastalık ve zararlı kontrollü seralarda, 8×1.5 cm ebatlarında tohum yastığı olarak kullanılan sehpalara ekilmiştir. Bu amaçla tohum yastıklarına 1:1 oranında hazırlanan torf:perlit karışımı 10 cm kalınlıkta olacak şekilde doldurulmuştur. Tohumlar kasım ayında sıra üzeri 2.5 cm, sıra arası ise 4 cm olacak şekilde ve 1 cm derinliğe ekilmiş, üzerleri 1 cm kalınlığında harç ile kapatılmıştır. Bir lata yardımı ile üstteki harç bastırıldıktan sonra süzgeç başlıklı hortumlarla haftada bir kez sulanmıştır. Tohum yastığındaki çöğürler 10-15 cm boya ulaştıktan sonra, içerisinde 1:1 oranında torf:pomza karışımı olan 15×35 cm ebatlarında ve 10 cm körük kısmı bulunan polietilen torbalara şaşırtılmıştır.

3.2.3. Virüs inokulasyonu

Çalışmanın ana bitki materyalini oluşturan; portakal, mandarin, limon, altıntop, turunç, üç yapraklı fidanların her türden dört tanesine CCDaV enfekteli kaynak bitkiden alınan iki adet T göz, bir adet de kabuk dokusu aşılansarak virüs inokulasyonu yapılmıştır. Ayrıca kullanılan her bir turunçgil türünden iki adet bitki negatif kontrol olarak bırakılmıştır (Şekil 3.2). İnokulasyondan üç hafta sonra bitkilerin tepe kısmı kesilerek yeni sürgün oluşumu sağlanmıştır. Virüs inokulasyonu yapılan ve kontrol olarak bırakılan bitkiler Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Kayaburnu mevkiinde bulunan Meyvecilik Bölümü'nde hastalık ve zararlı kontrollü seralarda muhafaza edilmiştir. Virüs inokulasyonundan 3, 6, 9 ve 12 ay sonra tüm bitkilerden yaprak örnekleri alınarak CCDaV inokulasyonu yapılan ve kontrol bitkilerinde virüs varlığı ve yoğunluğu belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Farklı turunçgil türlerine T göz ve kabuk aşısı yöntemiyle CCDaV inokulasyonu

3.2.4. Turunçgil türlerinde CCDaV'nin tespiti

CCDaV inokulasyonu yapılan bitkilerde enfeksiyonunun gerçekleştiğini belirlemek amacıyla 3. ayda inokulasyon yapılan ve kontrol bitkilerinden yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örneklerinden 3.1.2. kısmında açıldığı şekilde TNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen TNA preparatlarında CCDaV varlığı PCR mix (Thermo, ABD) ve CCDaV CP genine spesifik primerler kullanılarak 3.1.4. kısmında açıldığı şekilde MJ Mini Personal termal döngü cihazında (Bio-Rad, ABD) uygulanan PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Her bir turunçgil türünün inokulasyon yapılan ve

yapılmayan kontrol bitkilerinden elde edilen PCR ürünleri % 1.5'luk agaroz jelinde elektroforez yöntemi ile ayrıştırılarak Enduro™ GDS Touch Gel görüntüleme cihazında görüntülenerek analiz edilmiştir.

3.2.5. Primer ve prob tasarımı

Farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğuna göre CCDaV'ye dayanıklılık durumlarının belirlenmesi için öncelikle gen bankasında bulunan virüs izolatlarına ait kılıf protein gen dizileri esas alınarak bir çift qPCR primeri ve bir adet de TaqMan probu tasarlanmıştır. TaqMan probunda raportör olarak FAM, söndürücü olarak ise BHQ1 kullanılmıştır. Primerlere ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan primer çiftleri ve prob

Kod	Dizisi	Yönü	Hedef Geni
BC227-CPG-F	5' ATGGTGAGTACCAGGAGTGG 3'	İleri	CP (812 bç)
BC228-CPG-R	5' CAAATCTTGACCGTCCATTC 3'	Geri	
CCDaV F	5' CAGGGACAGGTTTATTGC 3'	İleri	CP (92 bç)
CCDaV R	5' CTA ACTCATCCAAGTCAAGC 3'	Geri	
TaqMan Prob	5' FAM – TCA CAC TAT GAC GGT AGA CCT GC - BHQ1 3'		

3.2.6. Total nükleik asit izolasyonu

İnokulasyon yapılan ve kontrol bitkilerinden inokulasyondan 3, 6, 9 ve 12 ay sonra alınan yaprak örneklerinden, CTAB total nükleik asit izolasyon yöntemiyle DNA izolasyonu (Li vd., 2008) ve 3.1.2'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen nükleik asitlerin konsantrasyonları ve kaliteleri nanodrop spektrofotometre (Thermo, ABD) ile ölçüldükten sonra son hacimleri 100 ng olacak şekilde steril saf su ile seyreltilerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.7. Turunçgil türlerinde CCDaV yoğunluğunun belirlenmesi

Her bir bitkideki virüs yoğunluğunun partikül sayısı olarak belirlenmesi amacı ile qPCR çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 100 ng TNA, CCDaV kılıf protein genine özgün bir çift primer, bir TaqMan probu, qPCR karışımı (Thermo, ABD) ve CFX96

Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, ABD) kullanılarak çoğaltım ve kantitasyon yapılmıştır.

Testlenen örneklerdeki virüs yoğunluğu miktarı bilinen ve seri olarak seyreltilen standartlara göre hesaplanarak mutlak kantitasyon yapılmıştır. Öncelikle her bir seri seyreltmeden ve CCDaV enfekteli örnekten çoğaltılan DNA miktarı belirlenmiştir. Seri seyreltme yapılan standartların her birinden çoğaltılan DNA miktarı ile başlangıç DNA mikarları arasında standart eğri analizi yapılarak enfekteli örneklerdeki virüs yoğunluğu partikül sayısı olarak BioRad CFX Manager™ programı kullanılarak belirlenmiştir. R² değerinin >0.95 olmasından dolayı çoğaltımın istatistiksel olarak orantılı olduğu ve standartlara göre mutlak kantitasyon yapılabileceği kabul edilmiştir.

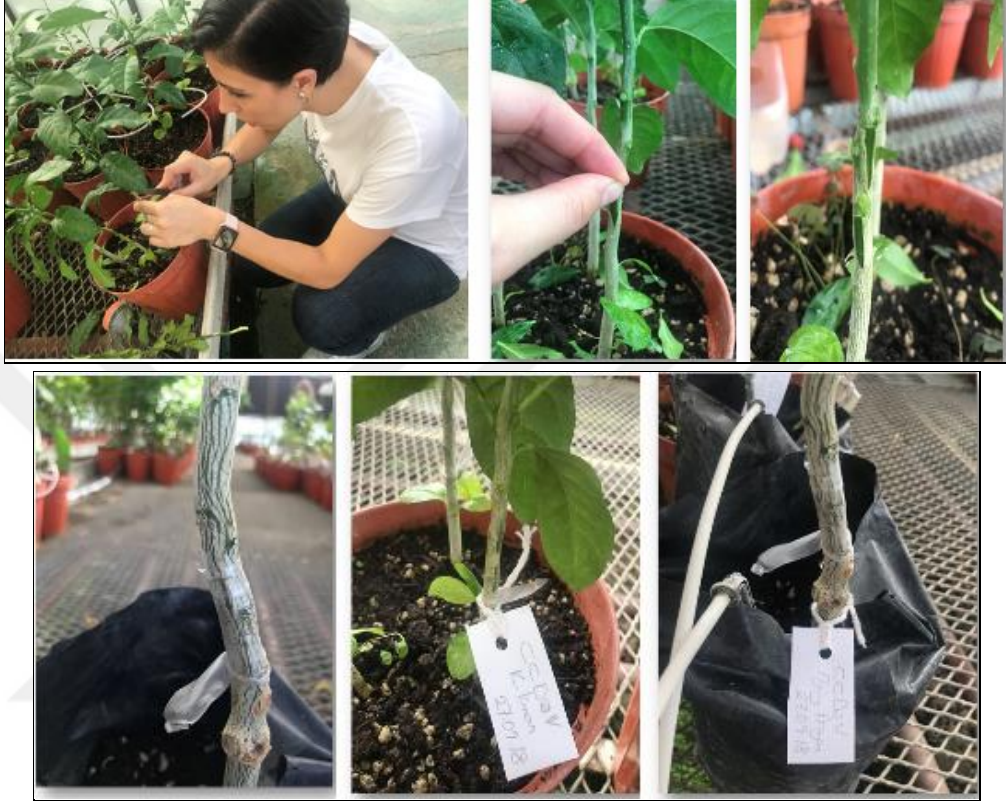
Elde edilen yoğunluğa göre her bir dokuda virüsün ne kadar çoğaldığı daha önce rapor edildiği şekilde hesaplanarak (Kokkinos ve Clark, 2006) her bir dokunun içerdiği virüs konsantrasyonu belirlenmiştir. Analizler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar arasında farklılık olup olmadığı SAS istatistik paket programında (SAS Institute, 2005) analiz edilmiştir. GLM (General Linear Model) kullanılarak yapılan varyans analizi sonuçlarında önemli bulunan varyans unsurlarının düzeyleri arasındaki farkları karşılaştırmak amacıyla LSD (Least Significant Difference) kullanılmıştır.

3.3. CCDaV'ye Dayanıklı ve Duyarlı Turunçgil Türlerinde R Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

3.3.1. Bitki yetiştirilmesi ve inokulasyon

Çalışmanın birinci aşamasında farklı turunçgil türlerinin CCDaV enfeksiyonuna tepkilerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan analizler sonucunda CCDaV'ye en duyarlı turunçgil türü olduğu bulunan limon (*Citrus lemon*) ve en dayanıklı tür olarak belirlenen üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata*) bitkileri seçilerek ikinci aşamada kullanılmıştır. Bu bitkiler daha önce belirtilen şekilde yetiştirilmiş ve istenilen büyüklüğe geldikleri her bir türden altı fidana kaynak bitkiden alınan iki adet göz aşılansarak virüs inokulasyonu yapılmıştır (Şekil 3.2). Her türden altışar bitki de kontrol olarak bırakılmıştır. İnokulasyondan 3 hafta sonra tepe sürgünleri kesilmiş ve aşı

bantları sökülmüştür. Virüs inokulasyonu yapıldıktan 3, 6 ve 9 ay sonra kontrol ve virüs enfekteli bitkilerden yaprak örnekler alınarak sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra RNA izolasyonunda kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.2. R gen ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla CCDaV duyarlı kara limon ve dayanıklı üç yapraklı bitkilerine CCDaV inokulasyonu

3.3.2. Gen seçimi ve primer tasarımı

Tüm genom dizilimi tamamlanmış olan portakal bitkisinin gen bankası veri tabanlarında bulunan yaklaşık 249 adet R geninin bulunduğu belirlenmiştir. ‘Plant Resistance Gene Wiki’ (http://prgdb.org.eu/wiki/Main_Page) veri tabanındaki kayıtlar incelenerek, kayıtlı olan 249 R adet dayanıklılık genlerine ait kodlar alınıp NCBI’deki gen dizisine ulaşılmıştır. Elde edilen R genlerinin her birinin BLAST analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 249 adet R geni içerisinde farklı grupları temsil edecek 15 adet R geni seçilmiştir. Ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere seçilen 15 genin her bir gen için Vector NTI programı aracılığı ile bir çift spesifik qRT-PCR primeri tasarlanmıştır (Çizelge 3.2) ve primerlerin sentezi özel bir firmadan hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Sentegen, Türkiye).

Çizelge 3.2. Turunçgillerde CCDaV enfeksiyonu sırasında ekspresyon analizi yapılmak üzere seçilen R genleri için tasarlanan primerler ve genel özellikleri

Gen	Yönü	Primer dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Ürün boyu (bp)
CN	İleri	AGTTTTCAAGAAGCTGATGCGG	55	129
	Geri	GAGAGCGCGATCATCATTGC		
CNL	İleri	GAACAACAACGACCTCGAACC	53	149
	Geri	TTTTTGGAACAGAGGCCTCC		
MLO-Like	İleri	GGAAAACAGAGTGAGAGTGTGTGC	54	187
	Geri	TCAGCACCCAAAGAAATGGC		
N	İleri	ATGTGCTGGGCATGGATTCTAGC	59	163
	Geri	TTTTCCGAGCTTCCAGCTGTCC		
NL 1	İleri	TTTCAGAGGAGAGGACACCC	50	199
	Geri	GAGACACCATCCTGAAGAAGC		
NL 2	İleri	TATTACTACAGCGCAGAAAGGC	51	127
	Geri	TTCCCTGCCATAAACTTTGG		
T 1	İleri	GTGTCTCATTGGCCATATGATGC	55	166
	Geri	CCTTAAGAAGTCCAGGTGAAATGG		
T 2	İleri	GAAGGAAGGTTTCATAGCATCG	50	194
	Geri	GTAAAGTTGTCTCGGGTGTCC		
TNL	İleri	CAAACTACCCTTGCTGAAGC	51	197
	Geri	CCCTCCCTTTAGTAAATTGTGG		
RLK 1	İleri	TCATACCATTCTTACCTGCTCC	50	148
	Geri	CATGCACAAGTCCATAAGCC		
RLK 2	İleri	GGTTTGCAAATGGAGATAGTCC	51	155
	Geri	GCCTGTATCATTATCAAGCC		
RLP 3	İleri	CCCTCTCAACAACTCTGAAGG	52	122
	Geri	GACATGGAACCAAGTGCAGG		
RLP 5	İleri	CCATGCAAGGCTCAATCTCG	55	141
	Geri	TTGTCTGAGAGCCTTCTCTCGC		
Unknown 2	İleri	GCACACGATAAACCTCATTTCG	52	165
	Geri	CCTTGTGTTCTAGCTGTTATGGC		
Unknown 6	İleri	CATCAACACCATCAGGACTCTAC C	54	165
	Geri	CAATTGCTTTAAGCAGTCCAGG		

3.3.3. RNA izolasyonu ve saflaştırılması

Virüs inokulasyonundan 3, 6 ve 9 ay sonra enfekteli ve kontrol bitkilerinden alınan yaprak örneklerinden TRIzol Reagent (Invitrogen, ABD) solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrasında elde edilen RNA'lara genomik DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla RNase-Free DNase Set (Qiagen, Almanya) ile DNase I uygulaması yapılmıştır. Bitki yaprak örnekleri kullanılarak yapılan toplam RNA izolasyonu ve DNase I uygulaması aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Sıvı azot içerisinde dondurularak -80°C 'de muhafaza edilen yaprak örnekleri dietil pirokarbonat (diethyl pyrocarbonate, DEPC) ve ardından otoklav kullanılarak sterilizasyon yapılan steril havanlar içerisinde sıvı azot kullanılarak un haline gelinceye kadar ezilmiştir. Ezilen yaprak örneklerinden yaklaşık 100 mg kadar alınarak 2 ml'lik santrifüj tüpüne konulmuştur. Örnekler üzerine 1 ml Trizol eklenerek 10 sn vorteks yapılmış ve 5 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 rpm hızda 20 dak. santrifüj edildikten sonra RNA içeren üst sıvı fazı dikkatlice uzaklaştırılarak, yeni bir eppendorf tüp içine aktarılmıştır. Üst sıvı faz üzerine -20°C 'de soğutulmuş 0.2 ml kloroform ilave edilerek 1 dakika vorteks yaptıktan sonra oda sıcaklığında 3 dak. inkübe edilmiştir. Sonra tekrar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12 000 rpm hızda 15 dak. santrifüj edilmiştir. Tüplerde üstte kalan sıvı faz dikkatlice alınarak yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve üstlerine 500 μl soğuk izopropanol eklenmiştir. RNA'yı çöktürmek için karışım 10 dak. süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12 000 rpm hızda 15 dak. yapılan santrifüj yapılarak RNA çöktürülerek topak haline getirilmiştir. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, dipte oluşan RNA çökeltisi 0.5 ml % 75'lik soğuk etanol ile yıkanarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7 500 rpm hızda 15 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan pelletlerden etanol dikkatle çekildikten sonra, tüpler 10 dak. oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak pelletler 95 μl DEPC (dietilpirokarbonat) uygulanmış distile saf su yardımıyla çözdürülmüştür.

Daha sonra saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla öncelikle her bir örnek için ayrı bir eppendorf tüpünde 70 μl RDD tampon üzerine 10 μl DNase I stok solüsyonu eklenerek, örneklere DNase uygulaması amacıyla bir karışım hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu karışım (80µl) doğrudan RNeasy spin kolonun membranı üzerine eklenerek oda sıcaklığında (20-30°C) 15 dak. boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra kolon içerisine 350µl RW1 tampon eklenerek 10 000 rpm'de 15 sn boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası kolon altında kalan sıvı kısım atılmıştır. Bir sonraki aşamada kolonun yıkanması amacıyla kolonun içerisine 500µl RPE tampon eklenmiş ve karışım 10 000 rpm hızda 15 sn boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası kolon altında kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Yıkamanın iyi bir şekilde gerçekleştirilmesi için kolon içerisine tekrar 500 µl RPE tampon eklenerek 10 000 rpm hızda 2 dak. boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası kolon altında kalan sıvı kısım atılmıştır. Kolonun içerisinde olabilecek olan etanolün uzaklaştırılması amacıyla pembe kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve maksimum hızda 1 dak. boyunca santrifüj edilmiştir. Son olarak kolon yeni bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne aktarılarak kolonun membranı üzerine 50 µl RNase'dan arı steril saf su eklenmiş ve 10 000 rpm hızda 1 dak. santrifüj yapılarak RNA'nın suya geçmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası RNA parçalanmasını önlemek için örnekler buz içerisine alınmıştır. Elde edilen toplam RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop (Thermo, ABD) ile ölçülerek bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. cDNA sentezi

Elde edilen toplam RNA'lerden SuperScript® IV (SSIV) First-Strand cDNA sentez kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda cDNA sentezi yapılmıştır. Öncelikle 10 mM random primer, oligo(dT) primeri ve 2000 ng total RNA steril bir PCR tüpü içerisinde karıştırıldıktan sonra karışım 65 °C'de 5 dak. denatürasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda tüpler hemen buz içerisine alıp 2 dak. beletilere denatürasyon sağlanmıştır. Denatürasyonu yapılan RNA ve primer karışımına, 1X SSIV tampon, 100mM DTT'ten 5mM, 40 U/µl RNAase inhibitöründen 2.0 U/ µl ve 200 U/µl SuperScript IV Reverse Transkriptaz enziminden de eklenerek, PCR cihazında 50 °C'de 10 dak. ve ardından 80 °C'de 10 dak. bekleyecek şekilde programlanarak cDNA sentezi tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar gen ekspresyonu analizinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.5. Gen ekspresyon analizi

Öncelikle cDNA sentezi yapılan örneklerde ekspresyonu CCDaV inokulasyonundan etkilenmeyen referans gen seçimi yapılmıştır. Bu amaçla diğer bitkilerde çoğunlukla referans gen olarak kullanılan actin, tubulin, ubiquitin, 18S ribozomal RNA ve gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genleri için var olan primer çiftleri ile CCDaV inokulasyon yapılan ve yapılmayan kontrol bitkilerinden elde edilen RNA örnekleri üzerinde denemeler yapılmıştır. Real-Time PCR uygulaması 2X RealQ Plus SybrGreen Master Mix (Ampliqon, Danimarka) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1X SybrGreen Master Mix, 400 nM referans gen spesifik primer ve 200 ng hedef cDNA eklenerek real-time PCR karışım hazırlanmış ve karışımın hacmi steril saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Real-Time PCR reaksiyonu 96'luk plakalarda CFX96 Touch Real-Time System (Bio-Rad, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Real-Time PCR cihazı ilk denatürasyon aşamasında 95 °C'de 15 dak. olarak ayarlandıktan sonra 40 döngü olacak şekilde, 95 °C'de 10 sn denatürasyon, her bir primer çiftine özgü bağlanma sıcaklığında 10 sn ve 72 C'de 10 sn uzama olarak programlanmıştır. Referans genlerin tamamı iki biyolojik tekrarlı olarak analiz edilmiştir.

R genlerinin ekspresyon analizleri yukarıda belirtildiği gibi, 20 µl'lik reaksiyon içerisinde 1X RealQ Plus SybrGreen Master Mix (Ampliqon, Danimarka), 400 nM gen spesifik primer ve 100 ng hedef cDNA olacak şekilde yapılmıştır. CFX96 Touch Real-Time Sistemi (Bio-Rad, ABD) denatürasyon aşaması 95 °C'de 10 sn, bağlanma 54 °C'de 10 sn, uzama aşaması ise 72 °C'de 10 sn olarak programlanmıştır. R genlerinin ekspresyon analizlerinde referans gen olarak seçilen 18S rRNA kullanılmıştır. Gen ekspresyonu düzeyindeki değişimler kullanılan referans gene göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak (Livak and Schmittgen, 2001) CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Sistem içerisinde yer alan CFX Manager programı (Bio-Rad, ABD) ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

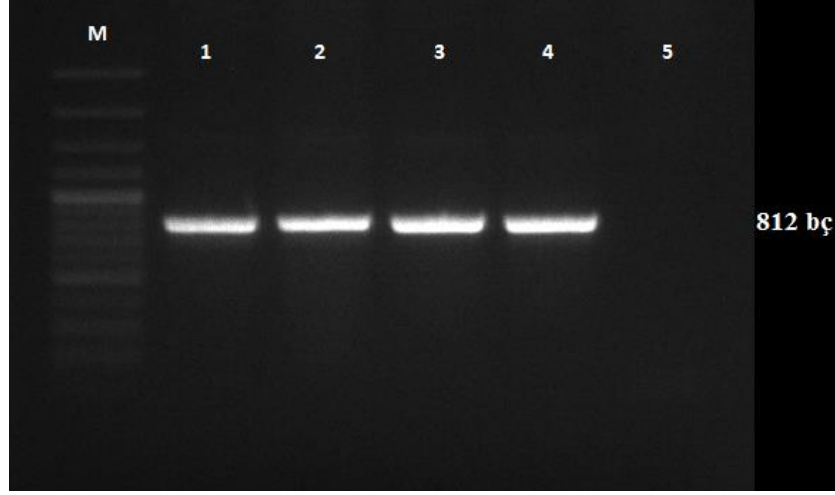
Bu doktora tezinin sonuçları üç kısımda incelenmiştir. İlk kısım virüsün karakterizasyonuna, ikinci kısım farklı turunçgil türlerinin CCDaV enfeksiyonuna tepkilerine, son kısım ise seçilen bazı R genlerinin ikinci kısımda CCDaV'ye karşı en dayanıklı ve en duyarlı olduğu belirlenen turunçgil türlerinde ekspresyon analizlerine ait sonuçları içermektedir.

4.1. CCDaV'nin Tespiti ve Karakterizasyonu

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) Kayaburnu Yerleşkesi'nde bulunan seralarda CCDaV belirtisi gösteren mandarin bitkisinden (Şekil 4.1) alınan dört farklı yaprak örneğinden TNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon yapılan dört adet TNA'nın konsantrasyonları 675 µg/mL ile 381 µg/mL arasında değişmiştir. Bu TNA'lardan BC227-CPG-F ve BC228-CPG-R primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda tüm örneklerden virüse ait 812 bp büyüklüğündeki kılıf protein genine (CP) denk gelen bölge çoğaltılmıştır (Şekil 4.2). Negatif kontrolden herhangi bir çoğaltım olmamıştır. Böylece örneklerdeki CCDaV varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Antalya ili Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kayaburnu yerleşkesindeki serada bulunan CCDaV ile enfekteli mandarin bitkisinde görülen belirtiler



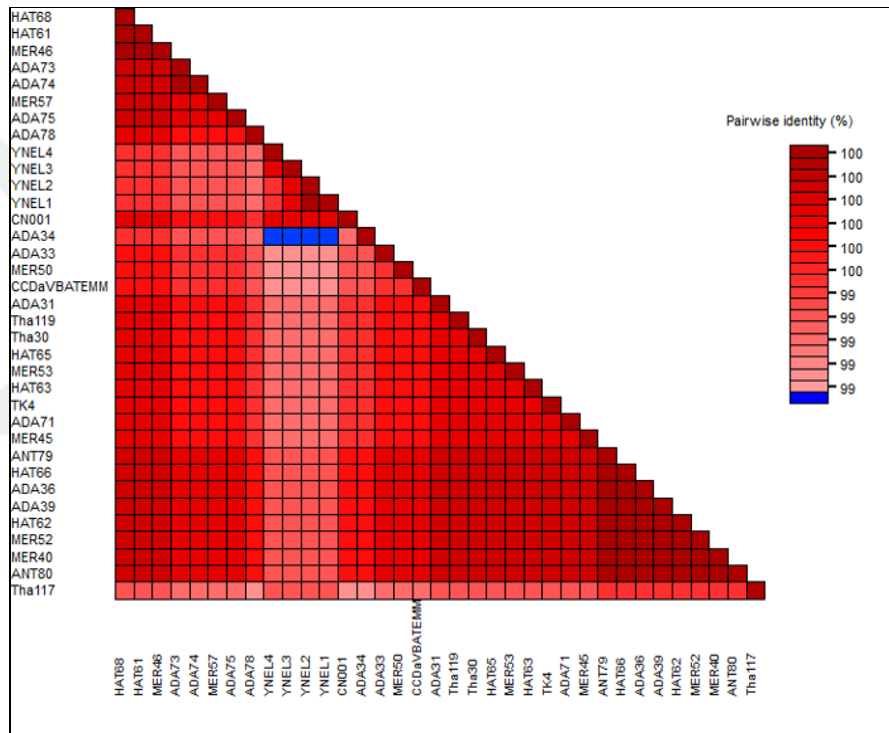
Şekil 4.2. CCDaV enfekteli olduğu düşünölen mandarin bitkilerinde yapılan PCR sonucunda CP geninin çoğaltıldığını gösteren jel fotoğrafı (M: 100 bç marker, 1-4 CCDaV ile enfekteli bitkiler, 5: Negatif kontrol)

Çoğaltımı yapılan DNA bölgesinin CCDaV CP genine ait olduğunu doğrulamak için, CP gen dizilimi yapılmıştır. Elde edilen CP geninin dizilimi GenBank veri tabanında bulunan diğör Türkiye izolatları ve Çin ve Tayland'da rapor edilen Dünya izolatlarının CP gen dizilimleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan çoklu karşılaştırma analizleri sonucunda, GenBank veri tabanında bulunan diğör CCDaV izolatlarının göstermiş oldukları benzerlik oranları incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda tüm izolatların nt ve aa düzeyinde birbirleri ile yüksek oranda sekans homolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların birbirleri ile nt düzeyinde % 99 benzerlik oranı gösterirken aa düzeyinde gösterdiği benzerliğin ise % 98'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

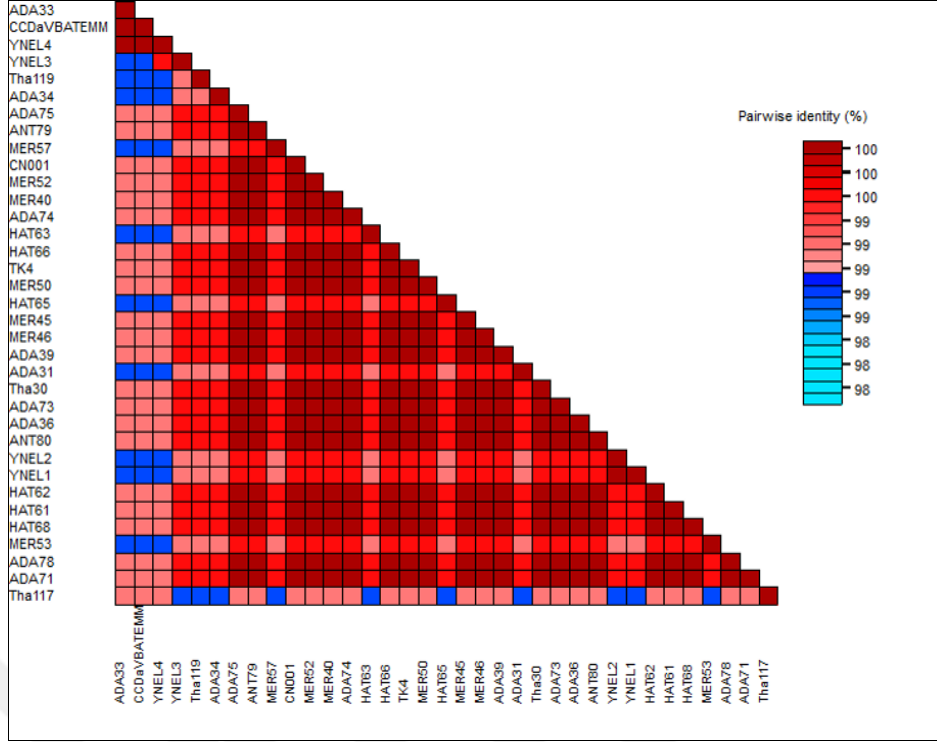
Bu çalışmada elde edilen CCDaV izolatı BATEM-M'nin Türk izolatları arasında en fazla benzerlik % 100'lük benzerlik oranı ile nt düzeyinde MER68, HAT61, MER46, ADA36, ADA39, MER40, MER52, HAT62, HAT66, ANT79 ve ANT80 izolatları arasında olmuştur. Birbirleri ile en az benzerlik gösteren izolatlar ise % 99 benzerlik oranı ile ADA34, ADA78, ADA76 izolatları olmuştur.

BATEM-M izolatının Türk izolatları ile aa düzeyinde kendi içlerinde göstermiş oldukları benzerlik oranları incelendiğinde ADA33 izolatı ile % 100'lük bir benzerlik olduğu gözlenmiştir. En az benzerlik ise % 99 ile ADA34, MER53, ADA31, HAT63 ve MER57 izolatları arasında olmuştur.

Dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu dizi analizleri sonucunda ise genel olarak Türk izolatlarının Çin izolatları ile ortalama olarak % 99,41 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Tayland izolatlarından Tha119 ve Tha30 ile % 100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, elde edilen CCDaV izolatlarının CP geninin Türkiye’deki ve dünyadaki CCDaV izolatları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen izolatın şu ana kadar rapor edilen Türkiye ve dünya izolatlarından önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle tüm bilinen CCDaV izolatlarını temsil edebilen bir izolat olduğuna karar verilerek, tezde yapılan inokulasyon çalışmalarında bu izolat kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatının Türkiye ve Dünya izolatlarının kılıf protein genleriyle nükleotit düzeyinde gösterdiği benzerlik oranları

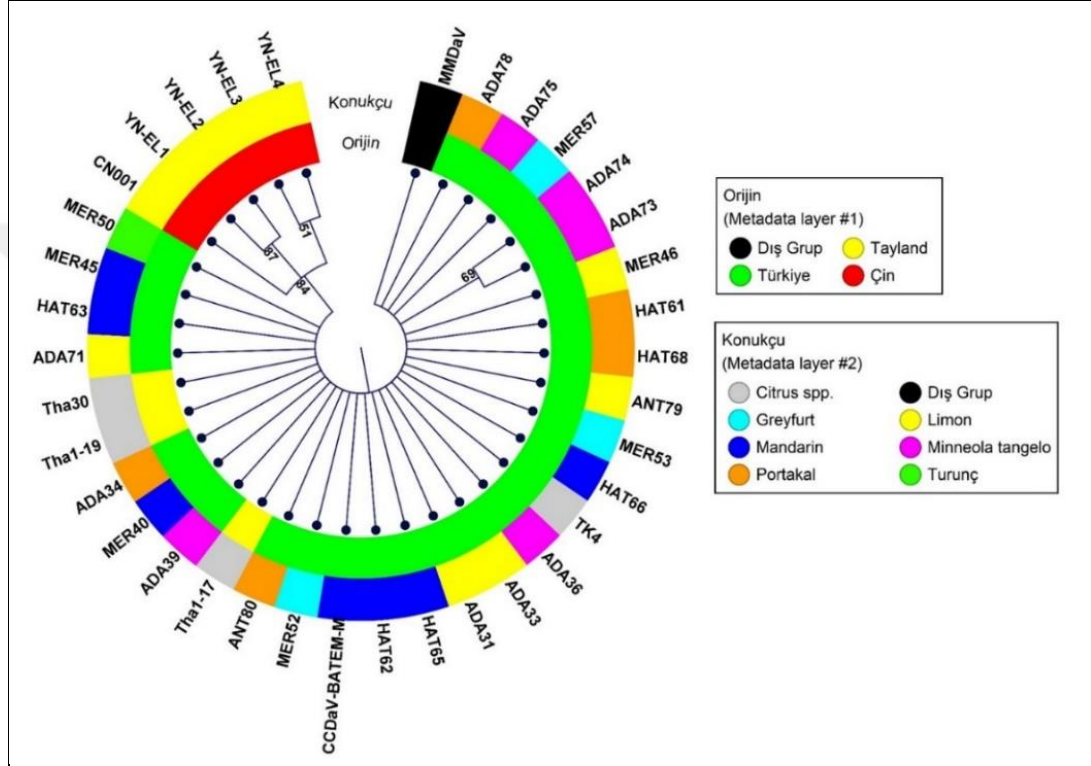


Şekil 4.4. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatının Türkiye ve Dünya izolatlarının kılıf protein genleriyle aminoasit düzeyinde gösterdiği benzerlik oranları

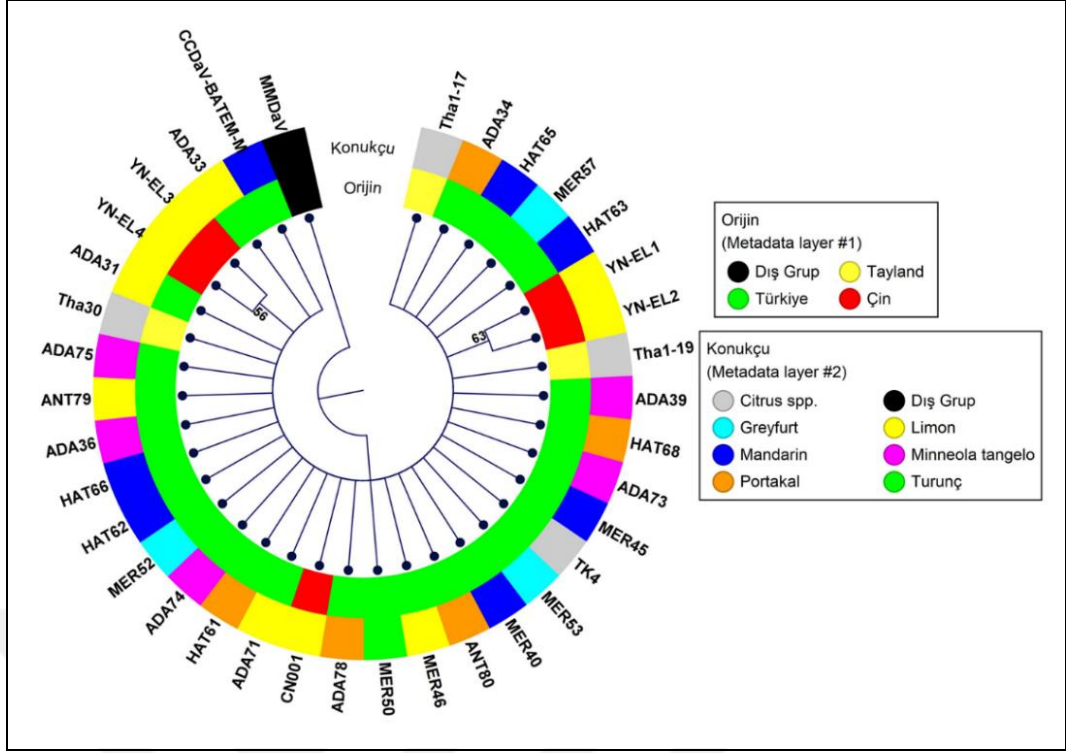
CCDaV izolatlarının nt ve aa dizileri kullanılarak iki farklı yöntemle (NJ ve UPGMA) filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Nükleotit dizileriyle yapılan filogenetik analizler sonucunda NJ ve UPGMA ile oluşturulan filogenetik ağaçların topolojilerinin birbirleri ile büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. CCDaV izolatlarının nt düzeyinde filogenetik ilişkileri incelendiğinde tüm izolatların tek bir filogenetik grup içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Bazı Çin izolatlarının alt gruplarda ikili olarak bir araya geldiği görülse de CCDaV izolatlarının coğrafik orijin veya konukçuya göre ayrı bir küme oluşturmadığı görülmektedir (Şekil 4.6). CCDaV-BATEM-M izolatının CP genini nt dizisine göre oluşan tek filogenetik grubun out gruba yakın bölümünde yer aldığı en yakın filogenetik ilişkiyi biri Adana'dan (ADA33) diğeri Çin'den (YN-EL4) alınan iki limon izolatıyla gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.6).

CCaDV izolatlarının aa dizileriyle yapılan filogenetik analizler sonucunda NJ ve UPGMA ile oluşturulan filogenetik ağaçların topolojilerinin birbirleri ile aynı olduğu görülmüştür. CCDaV izolatlarının nükleotit düzeyinde filogenetik ilişkileri incelendiğinde, Türkiye ve Tayland izolatlarının tek bir filogenetik grup içerisinde yer

aldıkları ancak Çin izolatlarının kendi aralarına farklı bir filogenetik grup oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.6). CCDaV-BATEM-M izolatının CP genini aa dizisine göre Türkiye ve Tayland izolatlarının bulunduğu büyük grup içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. CCDaV-BATEM-M izolatının en yakın filogenetik ilişkiyi Hatay ilinde mandarinden alınan HAT62 ve HAT65 izolatlarıyla gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatlarıyla ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç kılıf protein geninin nükleotid dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemiyle oluşturulmuş ve 1000 tekerrürlü bootstrap analizine tabi tutulmuştur. MMDaV out group olarak kullanılmıştır. Dallanma noktalarındaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir



Şekil 4.6. Citrus chlorotic dwarf associated virus BATEM-M izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatlarıyla ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç kılıf protein geninin amino asit dizilimleri kullanılarak neighbour-joining yöntemiyle oluşturulmuş ve 1000 tekerrürlü bootstrap analizine tabi tutulmuştur. MMDaV out group olarak kullanılmıştır. Dalların noktalarındaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir

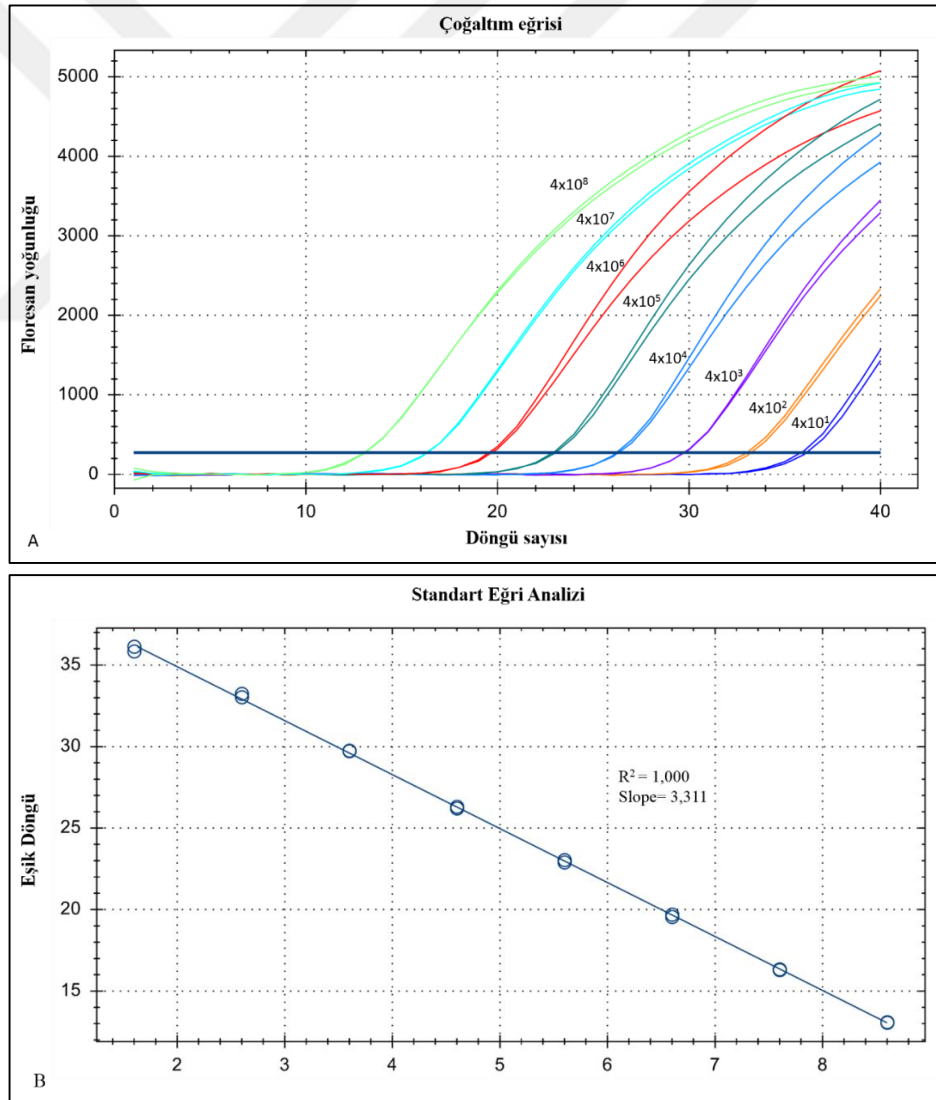
4.2. Farklı Turunçgil Türlerinin CCDaV'ye Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi

4.2.1. Standartların testlenmesi

Virüs yoğunluğunun kopya sayısı olarak belirlenmesi için CCDaV izolatının PCR ile çoğaltılan CP geni saflaştırılarak konsantrasyonunun 36.4 ng/µl olduğu belirlenmiştir. Bu konsantrasyon üzerinden çoğaltılan standart içerisinde bulunan kopya sayısı 4.1×10^{13} olarak belirlenmiştir. Çoğaltılan ve kopya sayısı belirlenen standart seyreltilerek 4×10^1 - 4×10^8 kopya içeren seri seyreltilmiş 8 standart oluşturulmuştur. Yapılan qPCR analizi sonucu CCDaV'nin CP geninin 4×10^1 'den 4×10^8 kopya sayısına kadar olan 8 adet tüm standartların tamamından çoğaltım sağlandığı görülmüştür.

Standartların Ct (threshold cycle) değerlerinin 12 ile 36 arasında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek Ct değerine konsantrasyonu en yüksek olan standart, en düşük

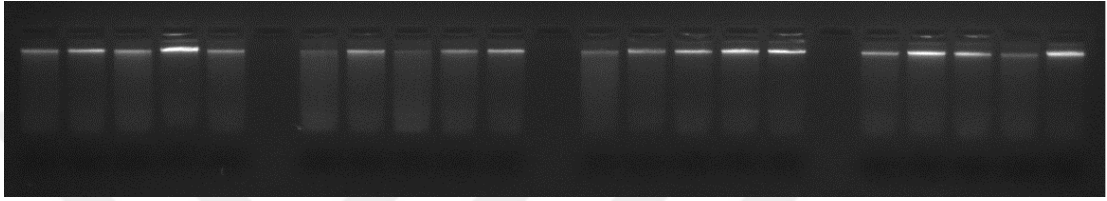
Ct değerine ise konsantrasyonu en az olan standardın sahip olduğu gözlenmiştir. Seyreltmeler arasında kopya sayısı ile orantılı bir artış/azalış olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgularla çoğaltım ve standart eğri grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.7.A ve Şekil 4.7.B). Standartların kopya sayısı ile standartlardan yapılan çoğaltım miktarının ilişkili olup olmadığını belirlemek amacı ile standart eğri analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen R^2 değerinin 1.00 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre qPCR ile çoğaltılan miktar ile standartların başlangıç kopya sayıları arasında % 100 uyum olduğu tespit edilmiştir. Slope değeri ise 3.31 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar oluşturulan standartların örneklerdeki CCDaV yoğunluğunun kopya sayısı şeklinde mutlak olarak belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.7. Örneklerde bulunan CCDaV miktarını belirlemek için geliştirilen standartların qPCR ile çoğaltım eğrileri (A), standart eğri analizleri (B)

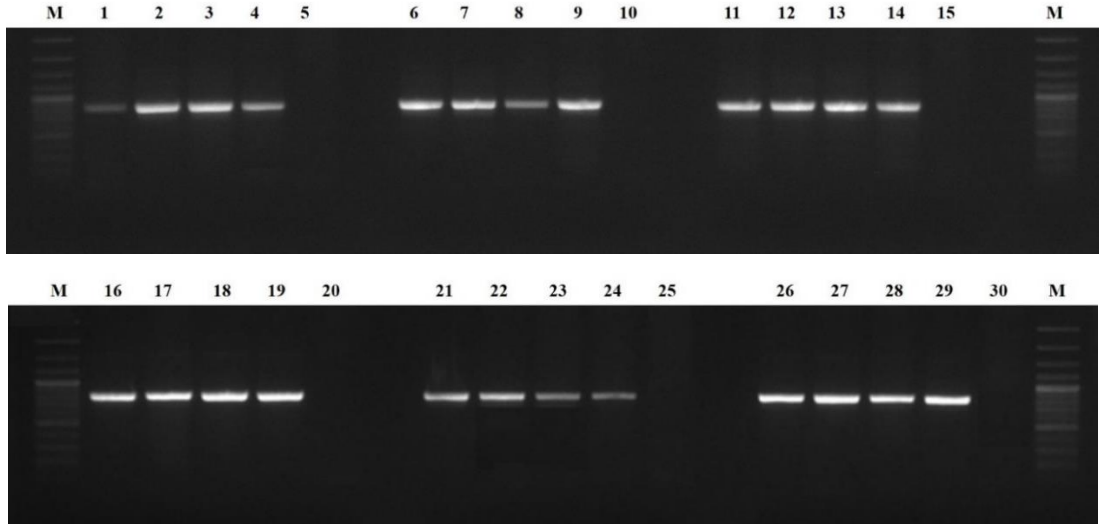
4.2.2. Virüs inokülasyonu yapılan bitkilerde CCDaV testlemesi

İnokülasyon yapılan turunçgil türlerinden 3 ay sonra alınan 35 örnekten TNA izole edilmiştir. Konsantrasyonu ve kalitesi yeterli görülmeyen örnekler için izolasyon işlemi tekrarlanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda izole edilen TNA konsantrasyonlarının 878 µg/mL ile 571 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan bazı örneklerin agaroz jel elektroforez sonuçlarına ait fotoğraf Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. CCDaV inokülasyonu yapılan bitkilerden elde edilen bazı TNA’ların agaroz jel elektroforez analiz sonucu (1-5: limon, 6-10: mandarin, 11-15: üç yapraklı, 16-20: portakal)

İzolasyonu yapılan 35 adet virüs enfekteli 5 adet de kontrol bitkisine ait toplam 40 adet TNA kullanılarak PCR ile testlenmiştir. PCR analizleri sonucunda CCDaV inokülasyonu yapılan 35 adet bitkinin tamamından CCDaV CP genine denk gelen 812 bp büyüklüğünde bir bölge çoğaltılmıştır. Ancak kontrol olarak bırakılan 5 bitkilerin hiç birinden CCDaV CP geni çoğaltılmamıştır. Bazı örneklere ait agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.9’te verilmiştir. Sonuç olarak, yapılan virüs inokülasyonlarının başarılı olduğu tespit edilmiştir. İnokulasyondan 6, 9 ve 12 ay sonrasında da aynı PCR analizi yapılmış ve tüm bitkilerden CCDaV CP geni çoğaltılarak virüs enfeksiyonunun devam ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.9. İnokulasyon yapılan bitkilerin CCDaV enfeksiyonu açısından PCR ile testlenmesine ait agaroz jel elektroforez analiz sonucu (1-4: CCDaV enfekteli limon, 5: limon kontrol, 6-9: CCDaV enfekteli mandarin, 10: mandarin kontrol, 11-14: CCDaV enfekteli üç yapraklı, 15: üç yapraklı kontrol, 16-19: CCDaV enfekteli portakal, 20: portakal kontrol, 21-24: CCDaV enfekteli altıntop, 25: altıntop kontrol, 26-29: CCDaV enfekteli turunç, 30: turunç kontrol, M: 100 bç marker)

4.2.3. Farklı turunçgil türlerinde CCDaV yoğunluğunun belirlenmesi

Farklı turunçgil türlerinde yapılan virüs yoğunluğu ölçümleri virüs inokülasyonundan 3, 6, 9 ve 12 ay sonra kantitatif real-time PCR (qPCR) ile yapılmıştır. Virüs yoğunluğu virüs kopya sayısına (Sq) ve eşik döngü (Cq) değerine göre mutlak olarak iki farklı şekilde belirlenmiştir. Cq değeri virüs yoğunluğuyla ters orantılı olup, her bir örneğin kaçınıcı döngüde kantitasyon yapılan eşiğe geldiğini göstermektedir. Buna karşın Sq değerleri çoğaltılan DNA miktarına göre her bir örnekte qPCR başlangıcındaki virüs yoğunluğunu kopya sayısı olarak bildirmekte ve değerler virüs yoğunluğu ile doğru orantılı olmaktadır. Yapılan qPCR analizinde seri seyreltilmiş standartlar kullanılmış ve her bir standart bilinen başlangıç konsantrasyonlarına uygun ve orantılı şekilde çoğaltılmıştır. Standart eğri analizi sonucunda R^2 değeri saptanmış ve standartların konsantrasyonları ve çoğaltım miktarları arasında bir uyum olduğu istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir. Bu standartlar kullanılarak örneklerde yapılan çoğaltımlarda her turunçgil türünde inokülasyondan sonra farklı aylarda CCDaV yoğunluğu kopya sayısı olarak belirlenmiştir.

İnokülasyondan 3 ay sonra turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu

Virüs inokülasyonundan 3 ay sonra yapılan qPCR analizleri sonucunda tüm turunçgil türlerinin inokülasyon yapılan bitkilerinde CCDaV CP gen bölgesi çoğaltım sağlanırken, kontrol bitkilerinin hiçbirinde çoğaltım gerçekleşmemiştir. Yapılan qPCR analizinde kullanılan seri seyreltilmiş standartların tamamı bilinen başlangıç konsantrasyonlarına uygun ve orantılı şekilde çoğaltılmıştır. Yapılan standart eğri analizi sonucunda R^2 değeri 1.00 olarak belirlenerek, standartların konsantrasyonları ve çoğaltım miktarları arasında bir uyum olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile turunçgil türlerinden alınan örneklerden kantitatif olarak virüs yoğunluğunun doğru bir şekilde belirlenebileceği gösterilmiştir. qPCR sonuçları farklı turunçgil türlerinin Cq ve Sq değerleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde CCDaV enfekteli turunçgil türlerin Cq değerlerinin 16.29 ile 31.18 arasında değiştiği ve ortalama değerinin 21.72 olduğu belirlenmiştir. En yüksek Cq değeri limonda görülürken, en düşük değer üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

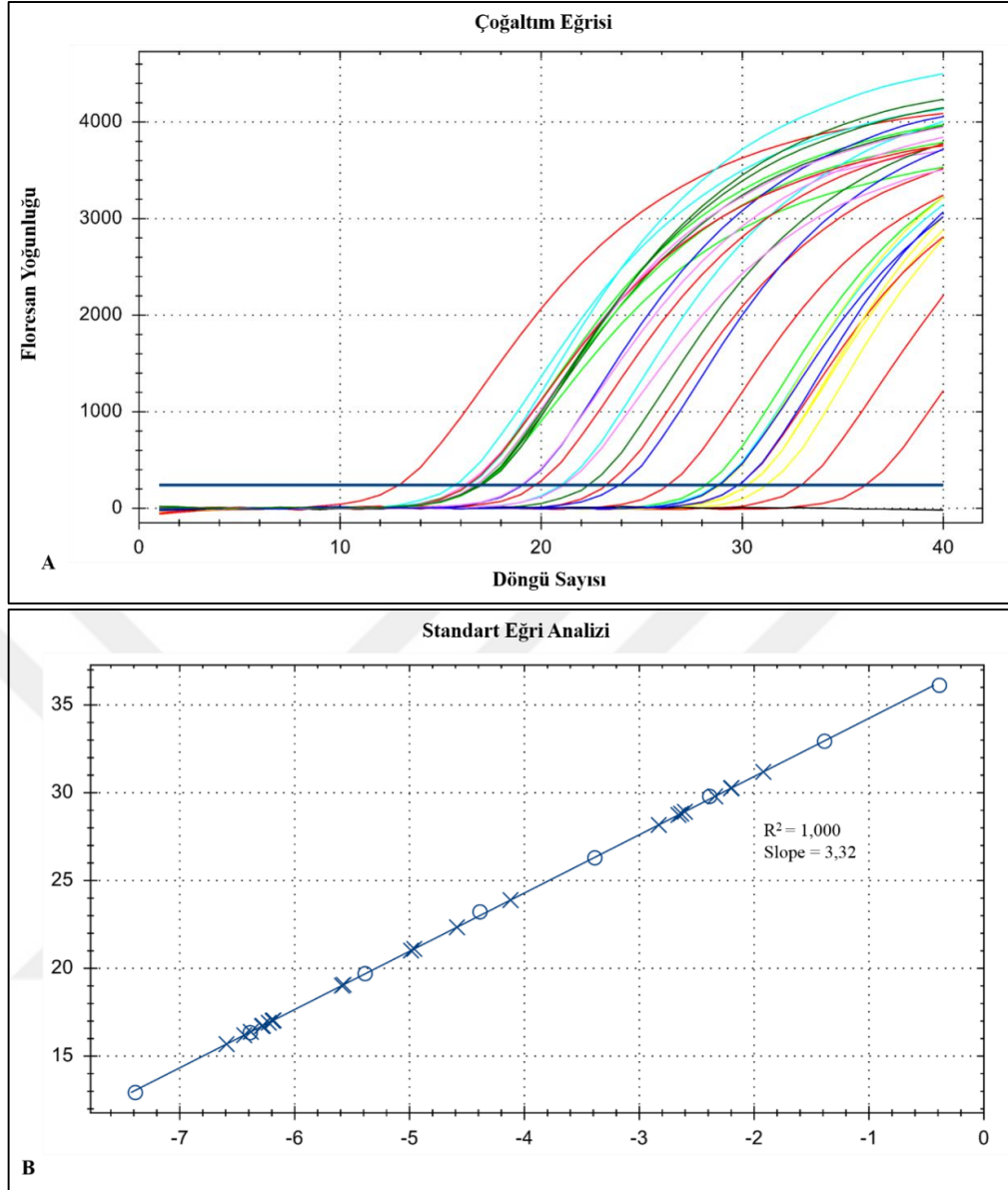
İnokülasyondan 3 ay sonra türlerin Cq değerlerinin karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde en düşük Cq değerlerinin limon ve altıntop türlerinden elde edildiği, virüs yoğunluklarının birbirine benzer ve en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Buna karşın en yüksek Cq değeri ile üç yapraklı portakal CCDaV'nin en az çoğaldığı turunçgil türü olmuştur. Mandarin portakal ve turunçta Cq değerleri ve virüs yoğunluğu birbirine benzer ve orta düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Virüs yoğunluğu Sq değerlerine göre kopya sayısı olarak belirlendiğinde farklı turunçgil türlerden elde edilen değerlerin $6.38E+06$ ile $1.21E+04$ arasında değiştiği ve türler arasında virüs miktarının 10^6 farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Tüm türlerde ortalama Sq değeri ise $2.40E+03$ olmuştur. Sq değerlerine göre en yüksek virüs yoğunluğu limonda elde edilirken, en düşük yoğunluğun ise üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda limon ve altıntop türlerinin virüs yoğunlukları birbirine benzer ve en düşük bulunmuştur. Mandarin, portakal ve turunçta Sq değerleri benzer ve virüs yoğunluğu orta düzeyde bulunmuştur. Buna karşın üç yapraklı portakal en yüksek Sq değeri ile CCDaV'nin en az çoğaldığı tür olmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. CCDaV inokülasyonundan üç ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğunun eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi

Tür	Virüs Yoğunluğu	
	Cq	Sq
Limon	16.29 ± 0.56 e	6.38E+06 ± 1.48E+06
Portakal	21.54 ± 1.02 bc	5.66E+05 ± 2.03E+05
Mandarin	22.74 ± 1.33 b	5.45E+05 ± 1.32E+05
Turunç	20.22 ± 0.92 cd	2.42E+04 ± 6.09E+03
Üç yapraklı	31.18 ± 1.39 a	1.21E+04 ± 1.75E+03
Altıntop	18.35 ± 2.68 de	5.44E+06 ± 1.37E+06
Ortalama	21.72 ± 5.00	2.40E+03 ± 3.33E+03

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Sütunlarda bulunan harfler türler arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). LSD Cq (0.05): 2.1925; LSD Sq (0.05): Ö.D



Şekil 4.10. İnokülasyondan üç ay sonra farklı turuncğil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi. Farklı turuncğil türlerinde çoğaltım eğrileri (A) ve standart eğri analizi (B). (Kırmızı: standart, açık yeşil: limon, mor: turunc, turkuaz: portakal, lacivert: mandarin, sarı: üç yapraklı portakal, koyu yeşil: altıntop, siyah: negatif göstermektedir)

İnokülasyondan 6 ay sonra turuncğil türlerinde virüs yoğunluğu

Virüs inokülasyonundan 6 ay sonra yapılan qPCR analizleri sonucunda tüm turuncğil türlerinin inokülasyon yapılan bitkilerinde CCDaV CP gen bölgesi çoğaltım sağlanırken kontrol bitkilerinin hiçbirinde çoğaltım gerçekleşmemiştir. Yapılan qPCR analizinde kullanılan seri seyreltilmiş standartların tamamı bilinen başlangıç konsantrasyonlarına uygun ve orantılı şekilde çoğaltılmıştır. Yapılan standart eğri analizi sonucunda R² değeri 0.99 olduğu belirlenerek standartların konsantrasyonları

ve çoğaltım miktarları arasında bir uyum olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile turunçgil türlerinden alınan örneklerden kantitatif olarak virüs yoğunluğunun doğru bir şekilde belirlenebileceği gösterilmiştir. qPCR sonuçları farklı turunçgil türlerinin Cq ve Sq değerleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde CCDaV enfekteli turunçgil türlerin Cq değerlerinin 13.43 ile 31.31 arasında değiştiği ve ortalama değerinin 19.75 olduğu belirlenmiştir. En düşük Cq değeri limonda görülürken, en yüksek değer üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu gözlenmiştir. İnokülasyondan 6 ay sonra türlerin Cq değerleri karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde en düşük Cq değerleri limon ve altıntopta elde edilmiş, bu türlerde virüs yoğunlukları birbirine benzer ve en yüksek düzeyde bulunmuştur. Buna karşın en yüksek Cq değeri ile üç yapraklı portakal CCDaV'nin en az çoğaldığı turunçgil türü olmuştur. Mandarin, portakal ve turunç Cq değerleri ve virüs yoğunluğunun 3. ay sonuçları ile paralellik göstererek birbirine benzer ve orta düzeyde olmuştur (Çizelge 4.2).

Virüs yoğunluğu Sq değerlerine göre kopya sayısı olarak belirlendiğinde farklı turunçgil türlerden elde edilen değerlerin $7.45E+06$ ile $1.70E+03$ arasında değiştiği ve türler arasında virüs miktarının 10^6 farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Tüm türlerde ortalama Sq değeri ise $2.44E+03$ olmuştur. Sq değerlerine göre en yüksek virüs yoğunluğu limonda, en düşük yoğunluğun ise üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler 3. ay sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Buna göre limon ve altıntopta virüs yoğunlukları birbirine yakın ve en yüksek bulunurken, mandarin portakal ve turunçta Sq değerleri benzer ve virüs yoğunluğu orta düzeyde bulunmuştur. Ancak üç yapraklı portakal en yüksek Sq değeri ile CCDaV'nin en az çoğaldığı tür olmuştur (Çizelge 4.2).

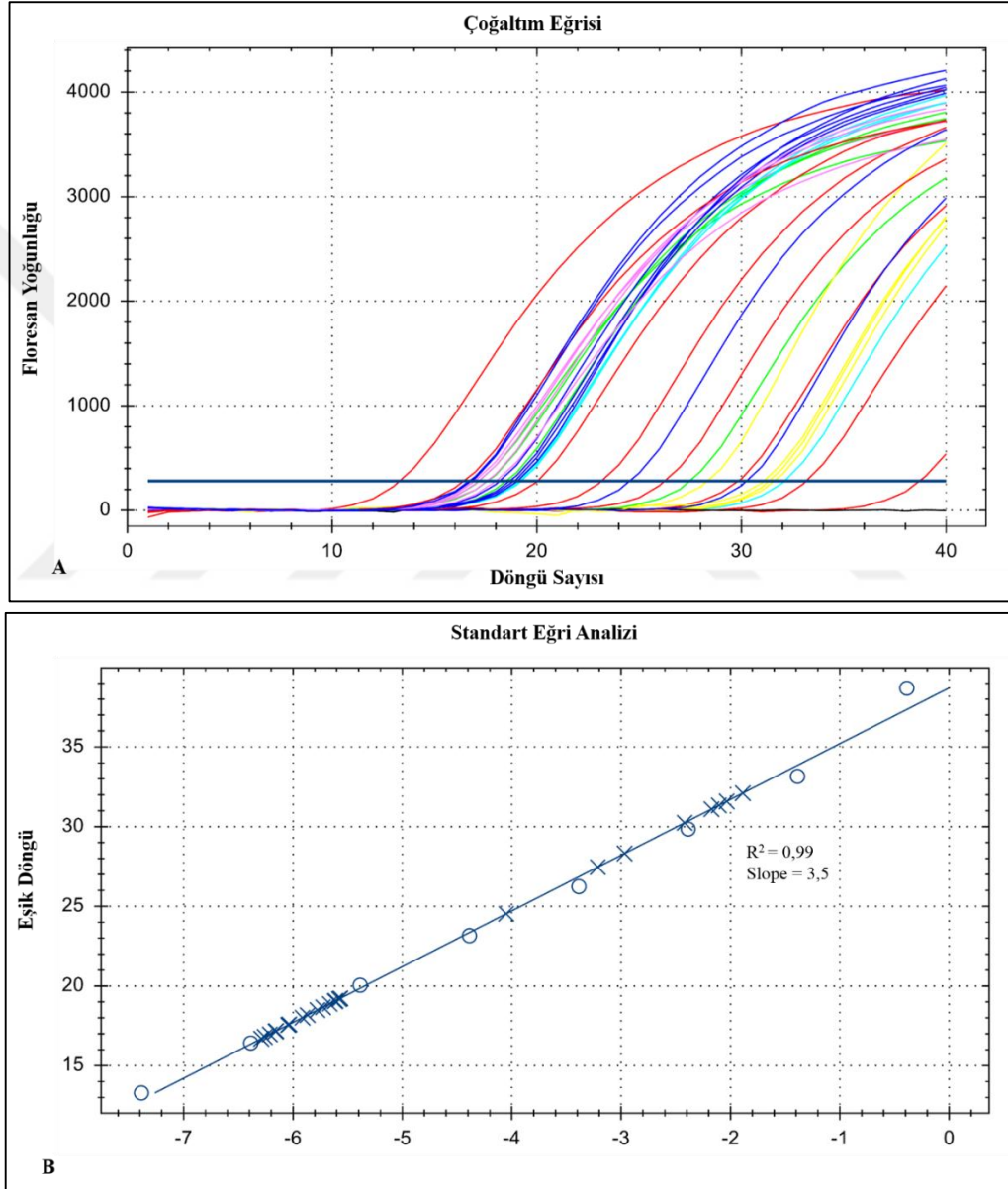
Çizelge 4.2. CCDaV inokülasyonundan altı ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi

Tür	Virüs Yoğunluğu	
	Cq	Sq
Limon	13.43 ± 0.25 e	$7.45E+06 \pm 5.16E+05$
Portakal	19.13 ± 0.05 c	$5.44E+05 \pm 1.38E+05$
Mandarin	20.34 ± 0.52 b	$5.90E+06 \pm 1.38E+06$
Turunç	18.46 ± 1.18 c	$2.92E+04 \pm 4.28E+03$

Çizelge 4.2. CCDaV inokülasyonundan altı ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi (Devam)

Üç yapraklı	31.31 ± 1.38 a	1.70E+03 ± 6.51E+02
Altıntop	15.86 ± 0.50 d	6.34E+06 ± 4.73E+05
Ortalama	19.75 ± 5.81	2.44E+03 ± 3.35E+03

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Sütunlarda bulunan harfler türler arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). LSD Cq (0.05): 1.1969; LSD Sq (0.05): Ö.D.



Şekil 4.11. İnokülasyondan altı ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi. Farklı turunçgil türlerinde çoğaltım eğrileri (A) ve standart eğri analizi (B). (Kırmızı: standart, açık yeşil: limon, mor: turunç, turkuaz: portakal, lacivert: mandarin, sarı: üç yapraklı portakal, koyu yeşil: altıntop, siyah: negatif göstermektedir)

İnokülasyondan 9 ay sonra turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu

Virüs inokülasyonundan 9 ay sonra yapılan qPCR analizleri sonucunda tüm turunçgil türlerinin inokülasyon yapılan bitkilerinde CCDaV CP gen bölgesi çoğaltım sağlanırken kontrol bitkilerinin hiçbirinde çoğaltım gerçekleşmemiştir. Yapılan qPCR analizinde kullanılan seri seyreltilmiş standartların tamamı bilinen başlangıç konsantrasyonlarına uygun ve orantılı şekilde çoğaltılmıştır. Yapılan standart eğri analizi sonucunda R^2 değeri 1.00 olduğu belirlenerek standartların konsantrasyonları ve çoğaltım miktarları arasında bir uyum olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile turunçgil türlerinden alınan örneklerden kantitatif olarak virüs yoğunluğunun doğru bir şekilde belirlenebileceği gösterilmiştir. qPCR sonuçları farklı turunçgil türlerinin Cq ve Sq değerleri karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde CCDaV enfekteli turunçgil türlerin Cq değerlerinin 13.96 ile 31.83 arasında değiştiği ve ortalama değerinin 20.38 olduğu belirlenmiştir. En düşük Cq değeri limonda görülürken, en yüksek değer üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

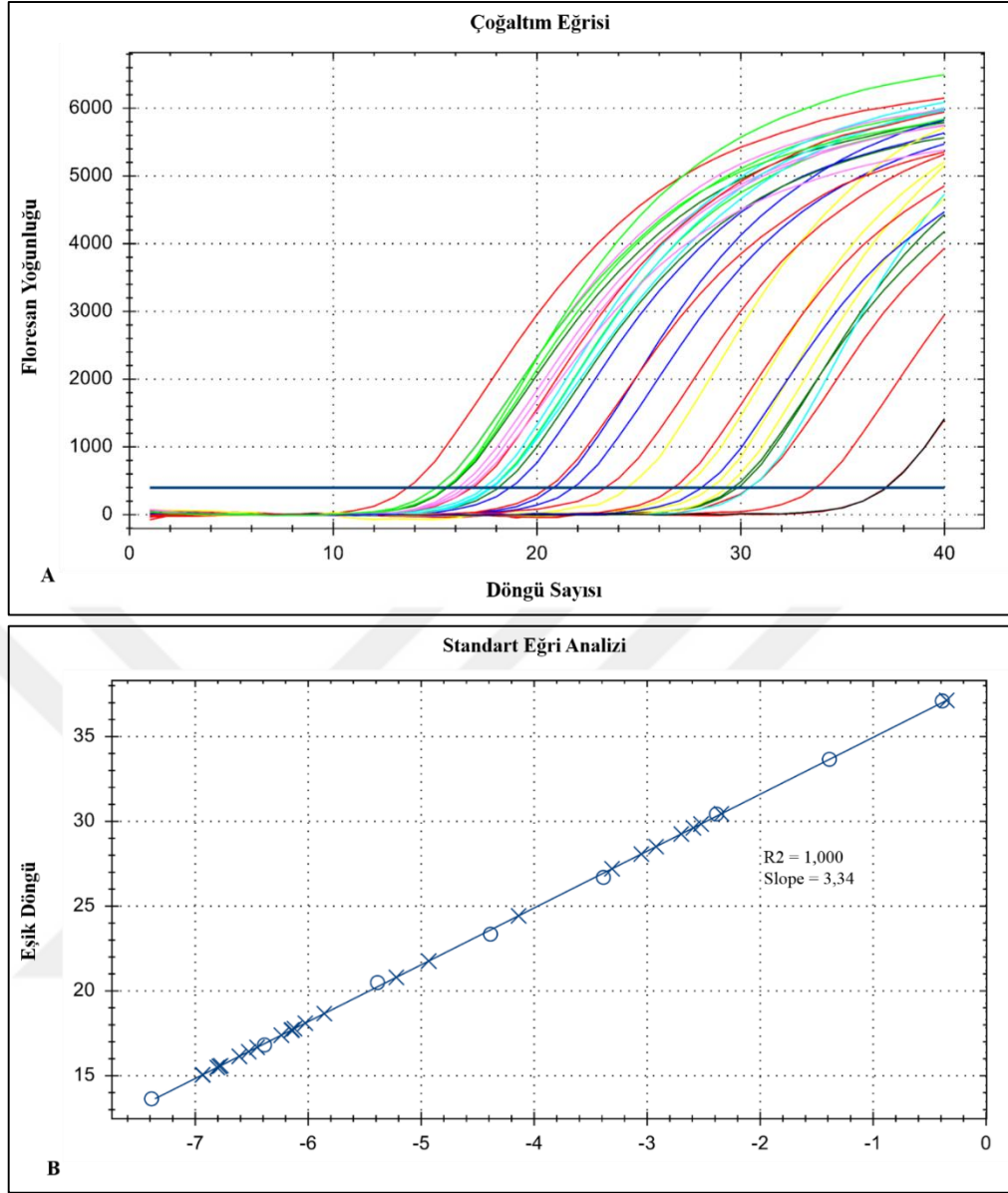
İnokülasyondan 9 ay sonra türlerin Cq değerlerinin karşılaştırıldığı istatistiksel analizler sonucunda limon ve altıntop en düşük Cq değerleri ile en yüksek virüs yoğunluğuna sahip olmuşlardır. Buna karşın en yüksek Cq değeri ile üç yapraklı portakal CCDaV'nin en az çoğaldığı turunçgil türü olmuştur. Mandarin, portakal ve turunç Cq değerleri bir önceki aylarda olduğu gibi birbirine benzer ve virüs yoğunluklarının da orta düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Virüs yoğunluğu Sq değerlerine göre kopya sayısı olarak belirlendiğinde farklı turunçgil türlerden elde edilen değerlerin $6.14E+06$ ile $2.21E+02$ arasında değiştiği ve türler arasında virüs miktarının 10^6 farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Tüm türlerde ortalama Sq değeri ise $2.51E+03$ olmuştur. Sq değerlerine göre en yüksek virüs yoğunluğu limonda elde edilirken, en düşük yoğunluğun ise üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde limon ve altıntop bitkilerindeki virüs yoğunlukları en yüksek ve birbirine benzer değerlerde bulunmuştur. Mandarin, portakal ve turunçta Sq değerleri benzer ve virüs yoğunluğu orta düzeyde bulunmuştur. Üç yapraklı portakal önceki aylarda olduğu gibi yine en yüksek Sq değeri ile CCDaV'nin en az çoğaldığı tür olmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. CCDaV inokülasyonundan dokuz ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi

Tür	Virüs Yoğunluğu	
	Cq	Sq
Limon	13.96 ± 0.45 e	6.14E+06 ± 2.21E+05
Portakal	20.19 ± 0.63 bc	5.30E+05 ± 5.78E+04
Mandarin	20.66 ± 1.01 b	5.71E+06 ± 1.13E+06
Turunç	18.97 ± 1.35 c	3.53E+03 ± 1.02E+03
Üç yapraklı	31.83 ± 1.15 a	2.21E+02 ± 5.37E+01
Altıntop	16.69 ± 0.60 d	6.45E+06 ± 5.37E+01
Ortalama	20.38 ± 5.78	2.51E+03 ± 3.50E+03

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Sütunlarda bulunan harfler türler arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). LSD Cq (0.05): 1.3732; LSD Sq (0.05): Ö.D.



Şekil 4.12. İnokülasyondan dokuz ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonunun ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi. Farklı turunçgil türlerinde çoğaltım eğrileri (A) ve standart eğri analizi (B). (Kırmızı: standart, açık yeşil: limon, mor: turunç, turkuaz: portakal, lacivert: mandarin, sarı: üç yapraklı portakal, koyu yeşil: altıntop, siyah: negatif göstermektedir)

İnokülasyondan 12 ay sonra turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu

Virüs inokülasyonundan 12 ay sonra yapılan qPCR analizleri sonucunda tüm turunçgil türlerinin inokülasyon yapılan bitkilerinde CCDaV CP gen bölgesi çoğaltım sağlanırken kontrol bitkilerinin hiçbirinde çoğaltım gerçekleşmemiştir. Yapılan qPCR analizinde kullanılan seri seyreltilmiş standartların tamamı bilinen başlangıç konsantrasyonlarına uygun ve orantılı şekilde çoğaltılmıştır. Yapılan standart eğri

analizi sonucunda R^2 değeri 0.9 olduğu belirlenmiş ve standartların konsantrasyonları ile çoğaltım miktarları arasında bir uyum olduğu istatistiksel olarak da gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile turunçgil türlerinden alınan örneklerden kantitatif olarak virüs yoğunluğunun doğru bir şekilde belirlenebileceği gösterilmiştir. qPCR sonuçları farklı turunçgil türlerinin Cq ve Sq değerleri karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde CCDaV enfekteli turunçgil türlerin Cq değerlerinin 13.80 ile 33.03 arasında değiştiği ve ortalama değerinin 20.69 olduğu belirlenmiştir. En dşuk Cq değeri limonda görülürken, en yüksek değerin  yapraklı portakal bitkisinde olduğu gözlenmiştir (izelge 4.4).

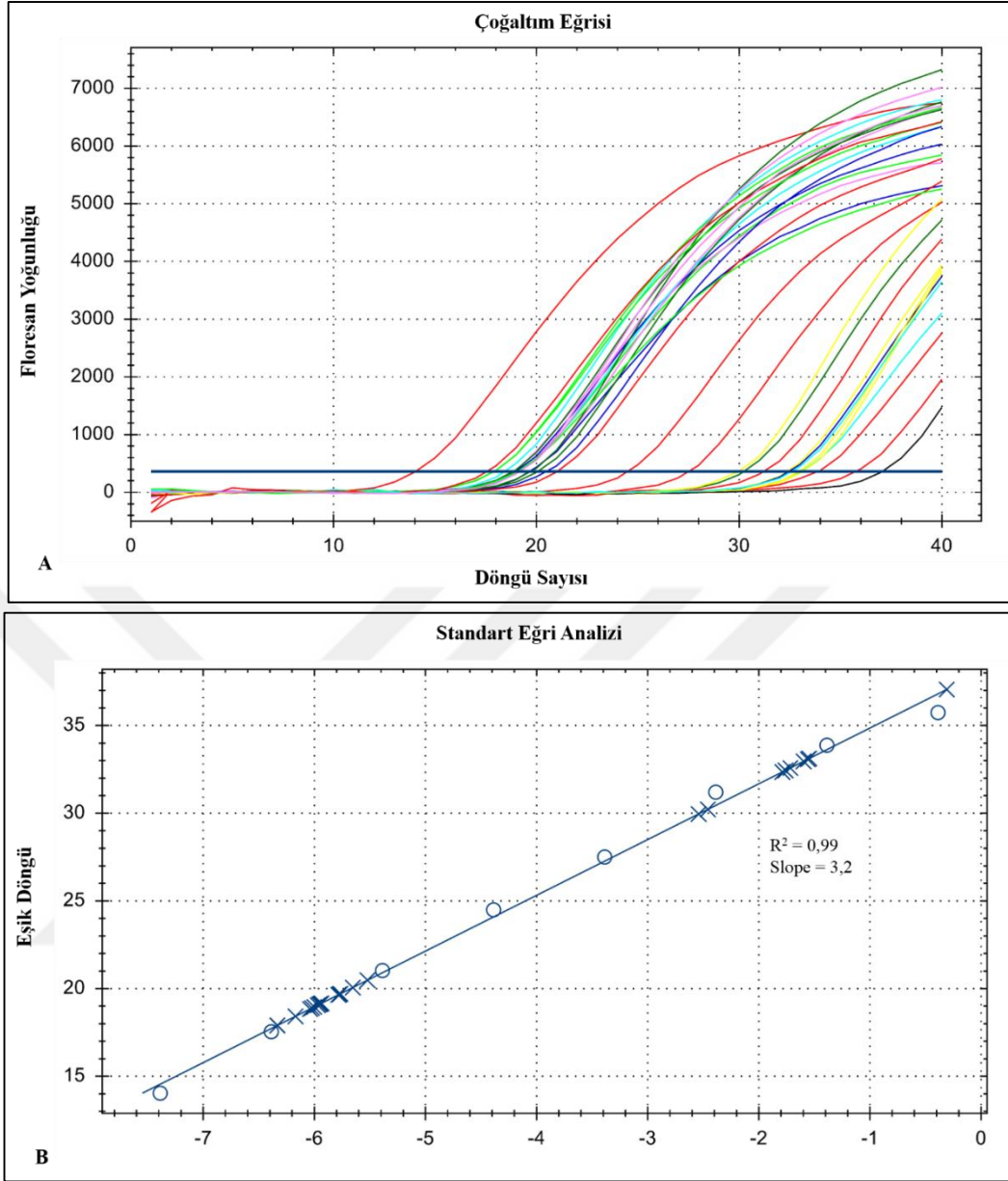
İnokülasyondan 12 ay sonra türlerin Cq değerleri karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde Cq değerlerine limon ve altıntoptan dşuk ve bu türlerde virüs yoğunlukları birbirine benzer ve en yüksek düzeyde bulunmuştur. Buna karşın  yapraklı portakal, en yüksek Cq değeri ile CCDaV'nin en az çoğaldığı turunçgil türü olmuştur. Mandarin, portakal ve turunta Cq değerleri ve virüs yoğunluğunun birbirine benzer ve orta düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Virüs yoğunluğu Sq değerlerine göre kopya sayısı olarak belirlendiğinde farklı turunçgil türlerden elde edilen değerlerin $6.50E+06$ ile $2.13E+02$ arasında değiştiği ve türler arasında virüs miktarının 10^6 farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Tüm türlerde ortalama Sq değeri ise $4.35E+03$ olmuştur. Sq değerlerine göre en yüksek virüs yoğunluğu limonda elde edilirken, en dşuk yoğunluğun ise üç yapraklı portakal bitkisinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda en yüksek virüs yoğunlukları limon ve altıntop türlerinde belirlenmiştir. Mandarin, portakal ve turun Sq değerlerinin ise yine birbirine benzer olduğu gözlenmiştir.  yapraklı portakal türü tüm aylarda olduğu gibi en yüksek Sq değeri ile CCDaV'nin en az çoğaldığı tür olmuştur (izelge 4.4).

Çizelge 4.4. CCDaV inokülasyonundan on iki ay sonra farklı turunçgil türlerinde virüs yoğunluğu eşik döngü (Cq) ve başlangıç kopya sayısı (Sq) olarak belirlenmesi

Tür	Virüs Yoğunluğu	
	Cq	Sq
Limon	13.80 ± 0.53 e	6.50E+06 ± 5.41E+03
Portakal	20.61 ± 0.71 b	4.58E+05 ± 3.70E+04
Mandarin	20.79 ± 0.91 b	5.45E+05 ± 1.55E+03
Turunç	19.02 ± 0.94 c	3.04E+03 ± 5.36E+02
Üç yapraklı	33.03 ± 0.47 a	2.13E+02 ± 1.65E+01
Altıntop	16.89 ± 0.48 d	6.58E+06 ± 1.65E+01
Ortalama	20.69 ± 6.17	4.35E+03 ± 3.51E+04

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Sütunlarda bulunan harfler türler arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.05). LSD Cq (0.05): 1.0403; LSD Sq (0.05): 0.0013.



Şekil 4.13. İnokülasyondan on iki ay sonra farklı turunçgil türlerinde CCDaV enfeksiyonu ve virüs yoğunluğunun qPCR ile belirlenmesi. Farklı turunçgil türlerinde çoğaltım eğrileri (A) ve standart eğri analizi (B). (Kırmızı: standart, açık yeşil: limon, mor: turunç, turkuaz: portakal, lacivert: mandarin, sarı: üç yapraklı portakal, koyu yeşil: altıntop, siyah: negatif göstermektedir)

Çizelge 4.5. CCDaV ile enfekteli tüm çeşitlerin 1 yıllık eşik döngü değerleri

Türler	Cq				Ortalama
	3 ay	6 ay	9 ay	12 ay	
Limon	16.29 ± 0.56 e	13.43 ± 0.25 e	13.96 ± 0.45 e	13.80 ± 0.53 e	14.37 ± 1.23 F
Portakal	21.54 ± 1.02 bc	19.13 ± 0.05 c	20.19 ± 0.63 bc	20.61 ± 0.71 b	20.37 ± 1.09 C
Mandarin	22.74 ± 1.33 b	20.34 ± 0.52 b	20.66 ± 1.01 b	20.79 ± 0.91 b	21.13 ± 1.32 B
Turunç	20.22 ± 0.92 cd	18.46 ± 1.18 c	18.97 ± 1.35 c	19.02 ± 0.94 c	19.16 ± 1.20 D
Üç yapraklı	31.18 ± 1.39 a	31.31 ± 1.38 a	31.83 ± 1.15 a	33.03 ± 0.47 a	31.84 ± 1.28 A
Altıntop	18.35 ± 2.68 de	15.86 ± 0.50 d	16.69 ± 0.60 d	16.89 ± 0.48 d	16.95 ± 1.57 E

* Tabloda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).
LSD Çeşit (0.05): 0.7198, LSD Zaman (0.05): 0.5877, Uygulama x Çeşit (0.05): Ö.D.

Çizelge 4.6. CCDaV enfekteli tüm çeşitler 1 yıllık virüs yoğunluğu değerleri

Türler	Sq				Ortalama
	3 ay	6 ay	9 ay	12 ay	
Limon	4.14E-07 ± 2.56E-09	4.24E-08 ± 6.98E-10	4.38E-08 ± 9.29E-10	4.68E-07 ± 7.39E-09 Bc	1.85E-07 ± 3.01E-09 B
Portakal	4.81E-06 ± 9.77E-08	4.75E-06 ± 9.11E-08	4.86E-06 ± 9.66E-08	4.87E-05 ± 6.62E-07 Bc	1.94E-05 ± 2.83E-07 B
Mandarin	5.19E-06 ± 1.72E-07	5.08E-06 ± 1.58E-07	5.16E-06 ± 1.43E-07	5.16E-05 ± 1.55E-06 Bc	2,06E-05 ± 6.17E-07 B
Turunç	3.52E-06 ± 2.04E-06	2.49E-07 ± 2.36E-07	2.49E-07 ± 2.36E-07	2.52E-06 ± 2.39E-06 Bc	1.01E-06 ± 9.54E-07 B
Üç yapraklı	1.44E-02 ± 2.00E-02	1.46E-02 ± 2.01E-02	1.51E-02 ± 2.10E-02	2.60E-02 ± 2.10E-03 Aa	1.86E-02 ± 1.44E-02 A
Altıntop	4.08E-07 ± 6.47E-09	4.06E-08 ± 4.52E-10	4.11E-08 ± 6.55E-10	4.22E-07 ± 9.69E-07 Bc	1.68E-07 ± 3.23E-07 B

4.3. CCDaV'ye Dayanıklı ve Duyarlı Turunçgil Türlerinde R Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

4.3.1. Bitki yetiştirilmesi ve inokülasyon

Limon ve üç yapraklı turunçgil türlerinin her birinden 6 tanesine 2 göz aşısı olarak virüs inokülasyonu yapılmış ve her bir türden 6 adet bitki de kontrol olarak

bırakılmıştır. İnokulasyondan 3 hafta sonra tepe sürgünleri kesilmiş ve aşı bantları sökülüştür. İlk örnek alımı inokulasyondan 3 ay sonra, ikinci örnek alımı inokulasyondan 6 ay sonra, üçüncü örnek alımı ise inokulasyondan 9 ay sonra olmuştur. Limon bitkilerinde virüse ait en tipik belirtiler olan yapraklarda “V” şeklinde girinti, yapraklarda kloroz, renk açılması, deformasyon ve yaprak ayasında küçülmeler gözlenmiştir. Üç yapraklı bitkilerinde ise hafif şiddette gelişme geriliği ve yapraklarda hafif kıvrılma şeklinde olmuştur (Şekil 4.14).

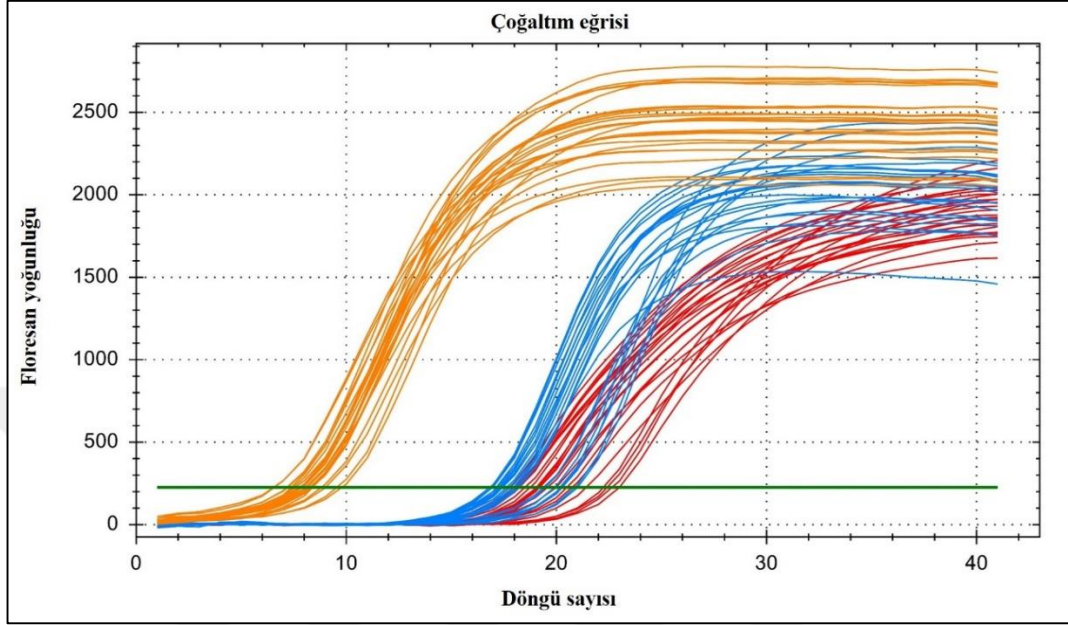


Şekil 4.14. Limon ve üç yapraklı bitkilerinde CCDaV inokulasyonundan 3 ve 6 ay sonra oluşan virüs belirtileri

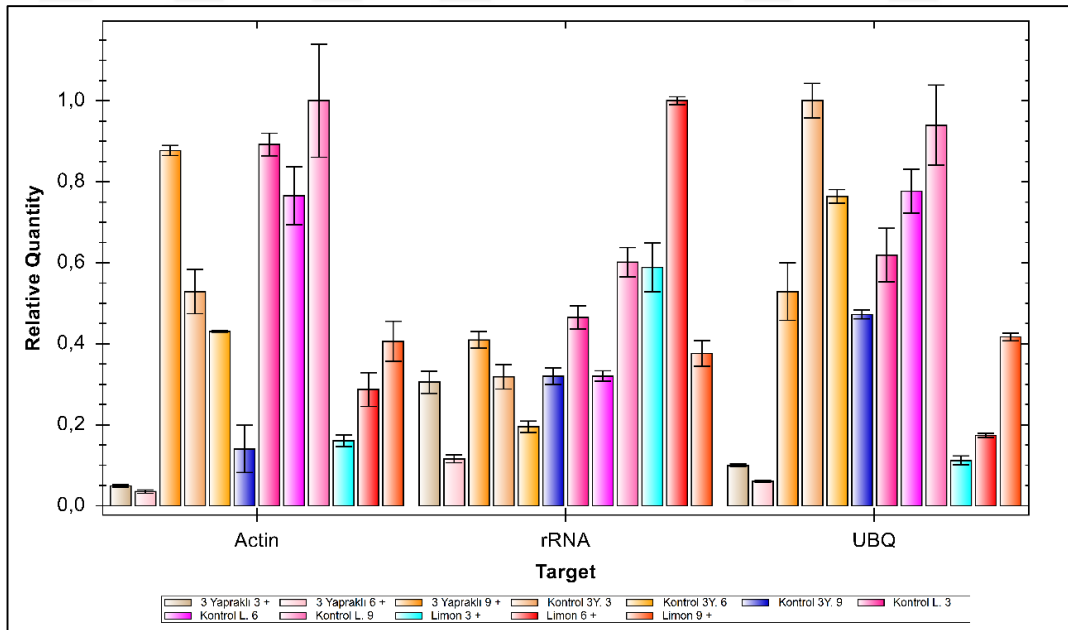
4.3.2. Gen seçimi ve primer tasarımı

Actin (ACT), *Ubiquitin* (UBQ) ve 18S ribozomal RNA (18S rRNA) genlerine spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan qRT-PCR ile CCDaV enfekteli ve kontrol bitkilerinde üç farklı referans genin ekspresyon analizi yapılmıştır. Yapılan qRT-PCR sonucunda analiz edilen tüm örneklerden her üç referans genin çoğaltımı sağlanmıştır. Referans genlerden 18SrRNA çok daha erken döngülerde çoğalarak eşik değere ulaşırken ACT ve UBQ benzer şekilde çoğalarak eşik değere daha geç döngülerde ulaşmıştır (Şekil 4.15). Yapılan ekspresyon analizleri kontrol ve CCDaV enfekteli limon ve üç yapraklı portakal bitkilerde her üç referans genin ekspresyonun düzeyinde değişimler olduğunu göstermiştir. Ancak ekspresyon analizleri yakından incelendiğinde ACT ve UBQ genlerinin ekspresyonlarındaki değişimin limon ve üç yapraklı portakalın enfekteli ve kontrol bitkilerinde önemli ölçüde değiştiği görülmüştür (Şekil 4.16). Buna karşın 18S rRNA referans geninin ekspresyon düzeninde bazı değişiklikler izlenmekle birlikte hem limon hem de üç yapraklı portakalın CCDaV enfekteli ve kontrol bitkilerinde benzer ekspresyon gösterdikleri görülmüştür. Yapılan referans gen ekspresyon denemeleri sonucunda 18S rRNA

referans geninin *ACT* ve *UBQ* referans genlerine göre daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle R genleri için yapılacak olan qRT-PCR çalışmalarında 18S rRNA geninin referans gen olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.15. CCDaV enfeksiyonu sırasında limon ve üç yapraklı bitkilerinde *Actin*, 18S rRNA ve *Ubiquitin* referans genlerinin çoğaltım eğrileri



Şekil 4.16. CCDaV enfeksiyonu sırasında limon ve üç yapraklı bitkilerinde *Actin*, 18S rRNA ve *Ubiquitin* referans genlerinin ekspresyon analizleri

4.3.3. RNA izolasyonu ve saflaştırılması

Total RNA izolasyonunun ardından elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve kaliteleri NanoDrop (Thermo, ABD) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyonları 235.0-520.0 ng/μl arasında değişirken örneklerin 260/280 oranları 1.91-2.14 arasında değişmiştir. Konsantrasyonları ve kaliteleri yeterli görülmeyen örneklerin total RNA izolasyonları tekrar edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalite açısından qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere yeterli miktarda ve kalitede olduklarına karar verilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Total RNA izolasyonu sonrası üç yapraklı ve limon bitkilerinden elde edilen ortalama total RNA konsantrasyon ve kalite değerleri

CCDaV inokülasyon						
Bitki	3. ay		6. ay		9. ay	
	Konsantrasyon ng/μl	Kalite (260/280)	Konsantrasyon ng/μl	Kalite (260/280)	Konsantrasyon ng/μl	Kalite (260/280)
Üç yapraklı enfekteli	520.0	2.14	371.0	1.99	312.4	2.10
Üç yapraklı kontrol	355.1	2.11	235.0	2.14	355.1	2.11
Limon enfekteli	260.3	2.08	450.0	2.14	243.2	1.91
Limon kontrol	387.5	2.06	271.1	2.09	278.0	2.06

4.3.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi sırasında çalışmanın amacına uygun olarak 2 farklı primer kullanılmıştır. Random primerler kullanılarak bir örnekte bulunan tam uzunluktaki ve/veya parçalanmış tüm mRNA'lar ve diğer RNA'ların tamamından cDNA sentezi yapılmıştır. Oligo (dT) primerleri ile poliA kuyruğu olan tüm A ve parçalanmamış

mRNA'ların poliA kuyruğuna bağlanarak cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Random ve oligo (dT) primerlerinin her ikisinin birden kullanılmasıyla sentezlenen cDNA'lar ile yapılan analizlerde 18SrRNA referans geninin ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Böylece R genlerinin ekspresyon çalışmalarında kullanılacak olan cDNA sentezinde random ve oligo (dT) primerlerinin her ikisinin birlikte kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.5. R dayanıklılık genlerinin ekspresyon analizleri

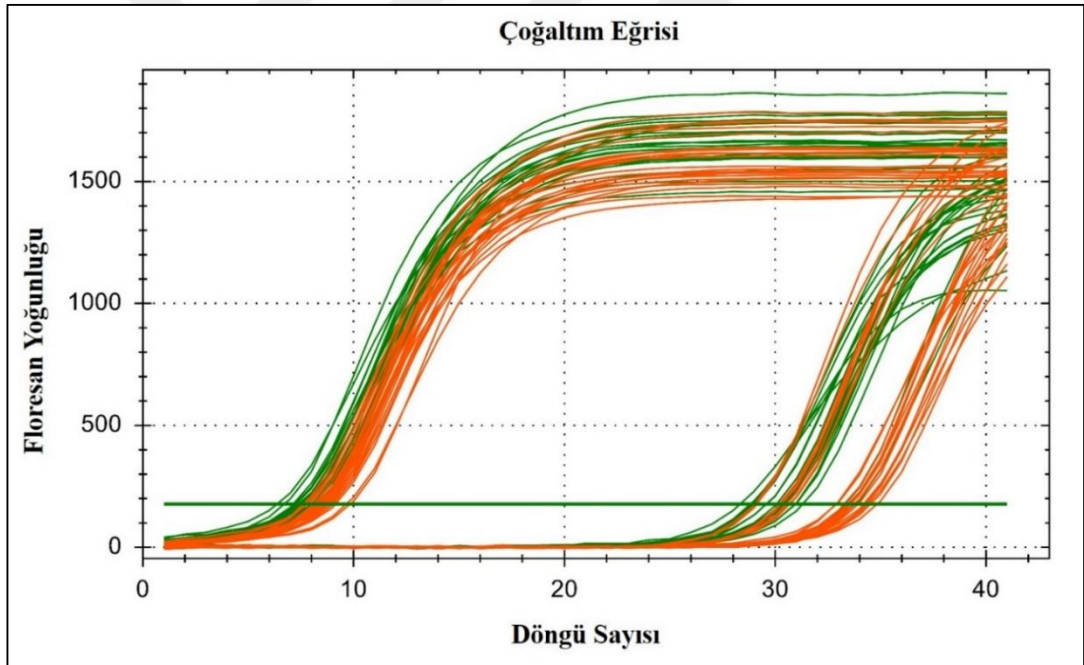
4.3.5.1. CN geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda CN geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında CN R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından CN geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 8-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın CN geni ise 25-35. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.16). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CN R geninin ekspresyonunda farklılıklar olduğunu göstermiştir.

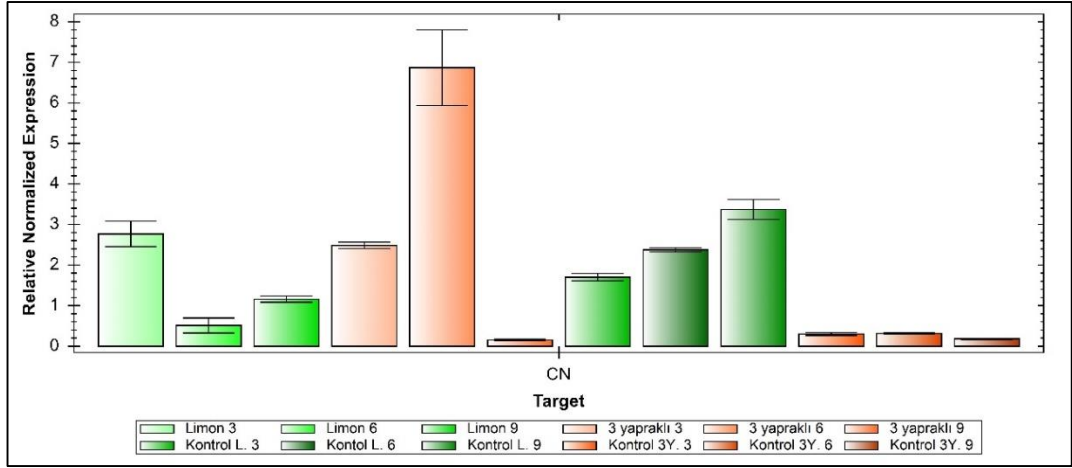
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CN R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ayında CN geninin ekspresyon düzeyinin virüs enfekteli ve kontrol bitkilerinde yaklaşık aynı değerde oldukları belirlenmiştir. Ancak 6. ve 9. aylarda ise CCDaV enfekteli limon bitkilerinde kontrol bitkilerine göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Buna karşın üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde 3, 6 ve 9. ayda CN R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür. Ancak üç yapraklı portakal bitkilerinde CN R geninin ekspresyonunun virüs inokülasyonundan 3 ve 6 ay sonra sırasıyla 2-7 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.17).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde CN R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limonda sadece 3. ayda

CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Buna karşın üç yapraklı portakalda 3. ve 6. aylarda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli olduğu; fakat 9. aydaki farkın önemli olmadığı bulunmuştur. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CN R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonu limonda üç yapraklı portakala göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise CN R geninin ekspresyonunun 3. ayda limonda ve üç yapraklı portakalda aynı düzeyde olurken 6. ayda üç yapraklı portakalda, 9. ayda ise limonda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar CN R geninin limon bitkisindeki ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Buna karşın üç yapraklı portakalda çok düşük düzeyde ekspresyon gösteren CN R geninin ise CCDaV enfeksiyonu ile uyarıldığını ortaya konmuştur (Çizelge 4.8).



Şekil 4.17. CN R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.18. CN R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.8. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CN geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	167.4765 ± 1.1702 A a	0.7536 ± 0.1796 b
	6.ay	0.4092 ± 0.3459 CD	1.0208 ± 0.0200
	9.ay	0.5215 ± 0.1542 CD	1.4589 ± 0.1698
Üç yapraklı	3.ay	1.0731 ± 0.1091 C a *	0.1386 ± 0.0491 b
	6.ay	3.0269 ± 0.6932 B a	0.1332 ± 0.0006 b
	9.ay	0.0677 ± 0.0095 D	0.0773 ± 0.0015

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır.

LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): 0.3669; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 0,863; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): 0.4887; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 2.0006

4.3.5.2. CNL geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

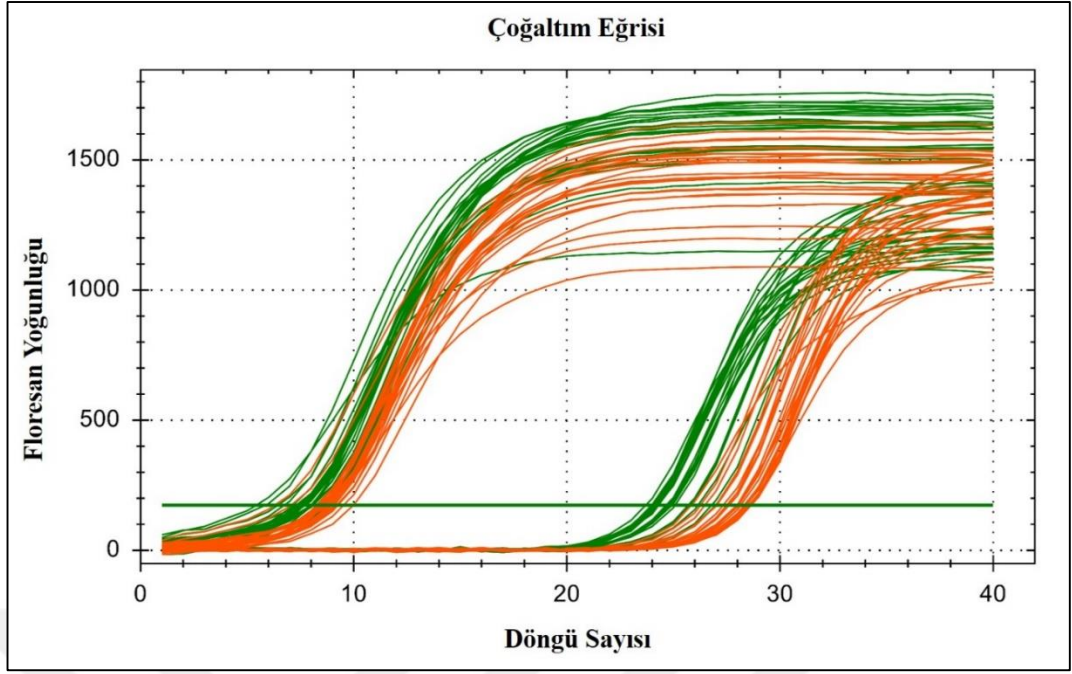
Literatür çalışması sonucunda CNL geninin turuncu bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında CNL R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından CNL geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 8-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın CNL geni ise 23-27. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır

(Şekil 4.19). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL R geninin ekspresyonunda bazı farklılıklar olduğunu göstermiştir.

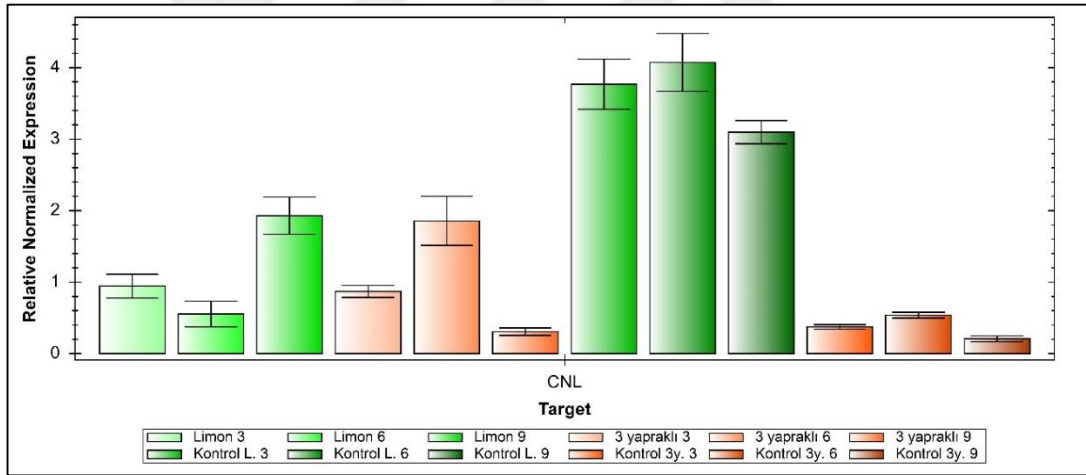
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında CNL geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde, virüs enfekteli bitkilerine göre 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Buna karşın üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde 3, 6 ve 9. ayda CN R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür.

CCDaV enfekteli limon bitkilerinde 3. ve 6. aylarda düşük olan ekspresyonun 9. ayda 2 kat arttığı tespit edilmiştir. Ancak üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL R geninin ekspresyonunun virüs inokülasyonundan 9 ay sonra önemli bir düşüş yaşadığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde CNL R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limon bitkisinde 3. ve 6. aylarda CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Üç yapraklı portakal bitkisinde ise sadece 6. ayda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiş, diğer aylarda farklılık önemli bulunmamıştır. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun limonda üç yapraklı portakala göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise CNL R geninin ekspresyonunun 3. ayda limonda ve üç yapraklı portakalda birbirine yakın değerlerde olurken, 6. ayda üç yapraklı portakalda 9. ayda ise limonda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar CNL R geninin limon bitkisindeki ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Buna karşın üç yapraklı portakalda çok düşük düzeyde ekspresyon gösteren CNL R geninin ise CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını ortaya koymuştur (Çizelge 4.9).



Şekil 4.19. CNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.20. CNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.9. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CNL geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.8208 ± 0.0587 A b	2.3000 ± 0.2094 a
	6.ay	0.3641 ± 0.0063 A b	2.4918 ± 0.2712 a
	9.ay	1.3505 ± 0.6704 A	1.8955 ± 0.1588
Üç yapraklı	3.ay	0.5412 ± 0.1141 A *	0.2281 ± 0.0205
	6.ay	1.1340 ± 0.1121 A a	0.3311 ± 0.0534 b
	9.ay	0.2019 ± 0.0759 A	0.1370 ± 0.0525

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 0.3025; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): 0.3284; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.3708; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): Ö.D.

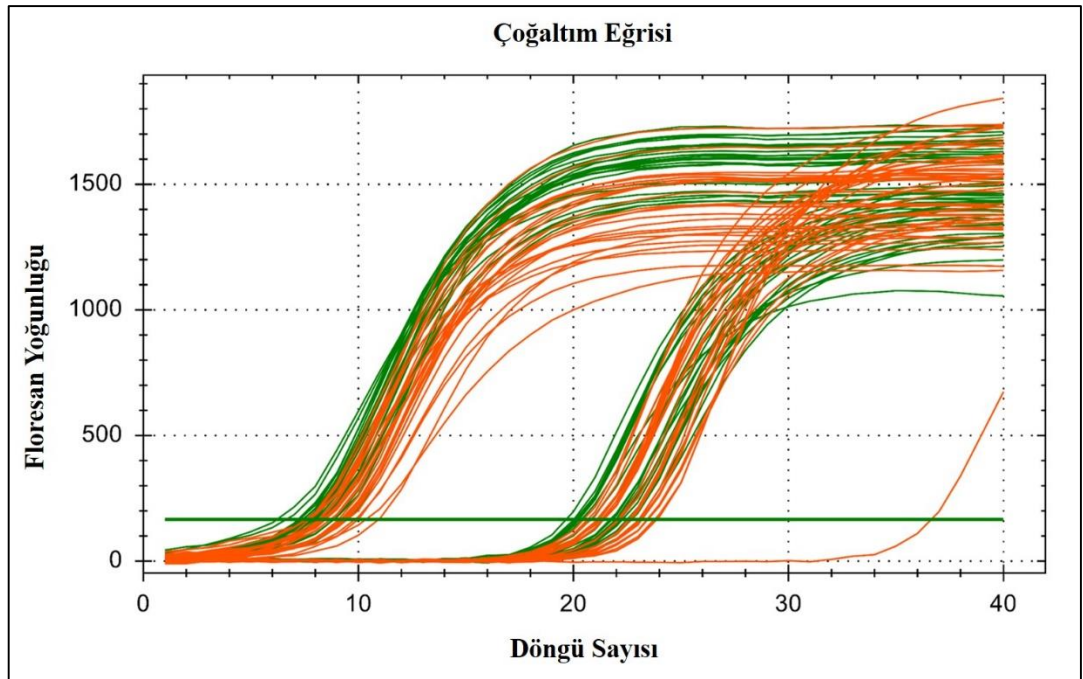
4.3.5.3. MLO-Like geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışması sonucunda MLO-Like geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında MLO-Like R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından MLO-Like geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 8-12. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın MLO-Like geni üç yapraklı kontrol bitkisinin 9. ayda alınan örnek dışındaki örneklerde 18-24. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.21). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde MLO-Like R geninin ekspresyonları arasında az da olsa farklılık olduğunu göstermiştir.

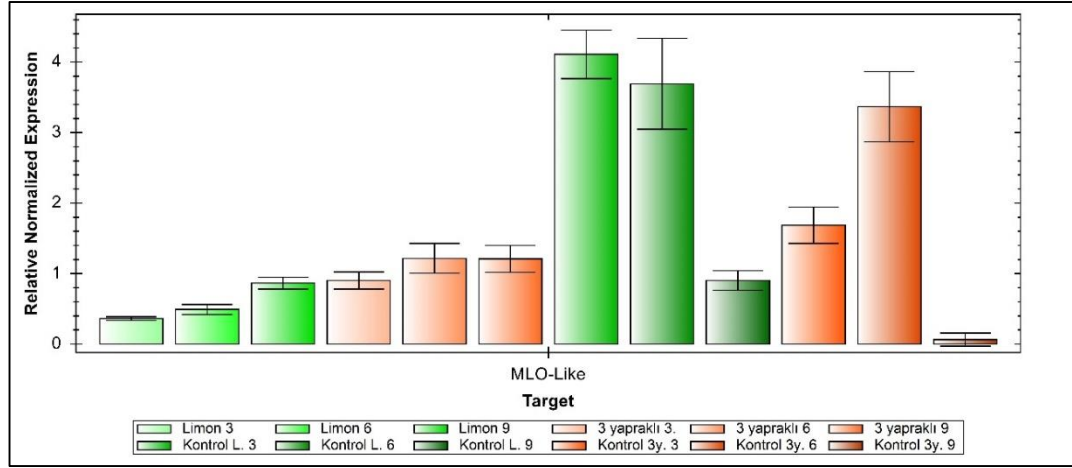
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde MLO-Like R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ve 6. aylarında MLO-Like geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde, virüs enfekteli bitkilerine göre 4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde 6 ayda MLO-Like R geninin ekspresyonunun yüksek olduğu; fakat 9. ayda önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. CCDaV enfekteli limon ve üç yapraklı

bitkilerinin her ikisinde de 3, 6 ve 9. aylarda MLO-Like geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür (Şekil 4.22).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde MLO-Like R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler analizi neticesinde üç yapraklı bitkisinde enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim her üç ayda da istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Limon bitkisinde sadece 3. ayda CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde MLO-Like R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun 3. ve 9. aylarda limonda üç yapraklı portakala göre daha yüksek olduğu, 6. ayda ise birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise MLO-Like R geninin ekspresyonunun tüm aylarda limon bitkisinde üç yapraklı portakala göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar MLO-Like R geninin limon ve üç yapraklı portakal bitkisindeki ekspresyonunun 9. ay dışında yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Buna karşın üç yapraklı portakalda 9. ayda çok düşük düzeyde ekspresyon gösteren MLO-Like R geninin ise CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını ortaya koymuştur. Limon bitkisinde ise 9. ayda genin ekspresyonunun CCDaV enfeksiyonu ile değişmediği gözlenmiştir (Çizelge 4.10).



Şekil 4.21. MLO-Like R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.22. MLO-Like R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.10. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde MLO-Like geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.2725 ± 0.0454 A b	2.9358 ± 0.0925 a
	6.ay	0.3258 ± 0.0157 A	2.7727 ± 0.8623
	9.ay	0.6423 ± 0.1770 A	0.6519 ± 0.0975
Üç yapraklı	3.ay	0.6513 ± 0.1017 A *	1.2129 ± 0.1462
	6.ay	0.8978 ± 0.2312 A	2.5082 ± 0.7164
	9.ay	0.9600 ± 0.4213 A	0.2893 ± 0.2858

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): 0.22095; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): Ö.D

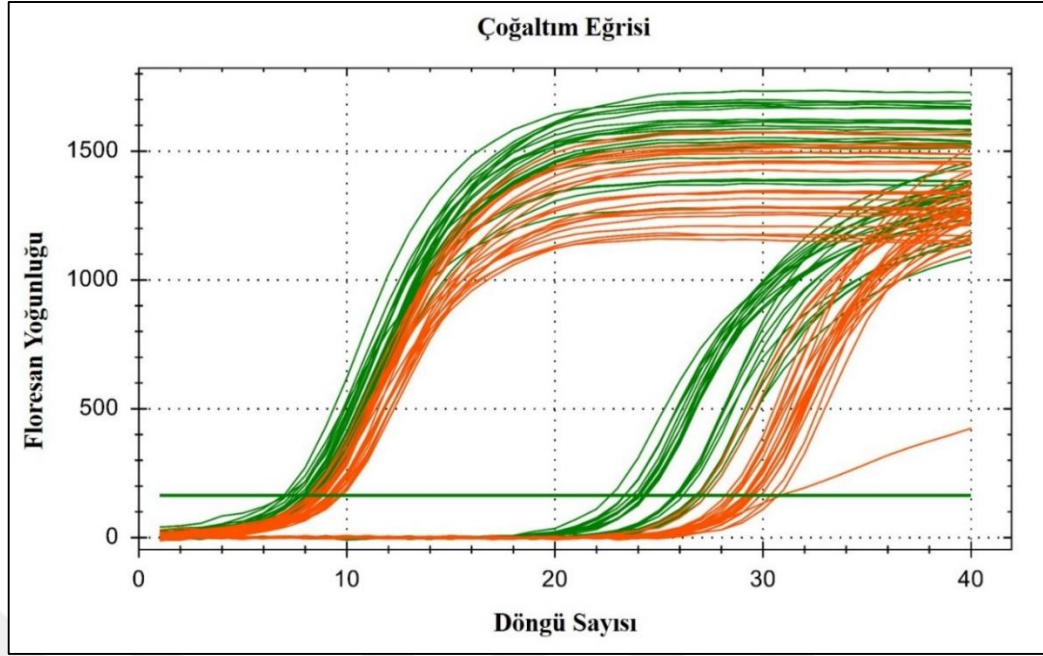
4.3.5.4. N Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışması sonucunda N geninin turunçgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında N R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından N geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 8-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın N geni ise 22-31. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır

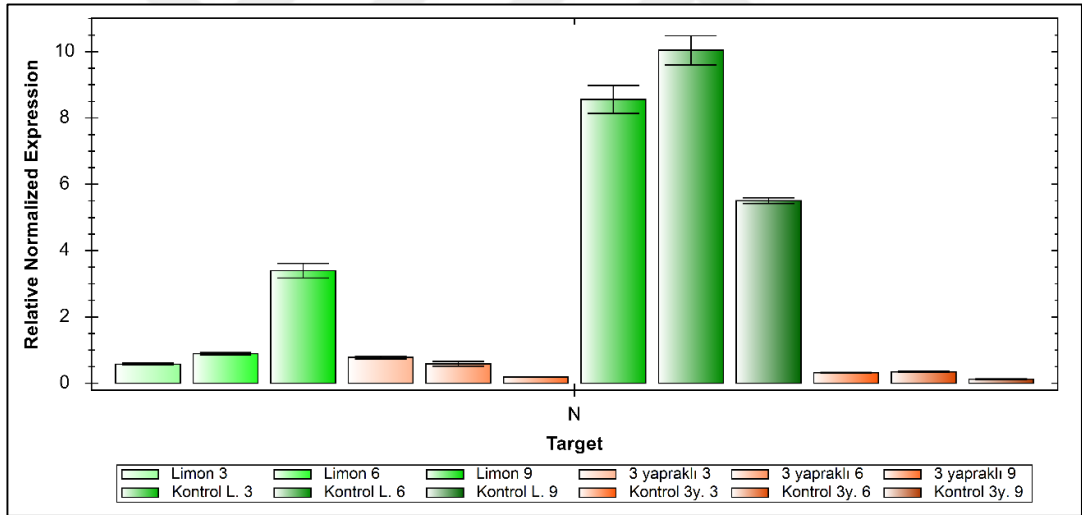
(Şekil 4.23). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde N R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde N R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ve 6. aylarında N geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde, virüs enfekteli bitkilerine göre 4-5 kat daha fazla olduğu; fakat 9. ayda kontrol limon bitkilerinde ekspresyonun azaldığı, buna karşın enfekteli limon bitkilerinde arttığı belirlenmiştir. Üç yapraklı portakalın hem kontrol bitkilerinde hem de CCDaV enfekteli bitkilerinde tüm aylarda N R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür (Şekil 4.24).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde N R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limon bitkisinde sadece 6. ayda CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Üç yapraklı portakal bitkisinde ise enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde N R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun limonda üç yapraklı portakala göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise N R geninin ekspresyonunun 3. ayda üç yapraklı portakalda yüksek değerde bulunmasına rağmen, diğer aylarda limon bitkisinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar N R geninin limon bitkisindeki ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Buna karşın üç yapraklı portakalda düşük düzeyde ekspresyon gösteren N R geninin ise CCDaV enfeksiyonuyla nispeten uyarıldığını ortaya koymuştur (Çizelge 4.11).



Şekil 4.23. N R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.24. N R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.11. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde N geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.0789 ± 0.0101 B	1.3418 ± 0.5645
	6.ay	0.1314 ± 0.0332 B b	1.4294 ± 0.0643 a
	9.ay	0.5568 ± 0.2764 A	0.7838 ± 0.0234
Üç yapraklı	3.ay	0.1200 ± 0.0459 B *	0.0454 ± 0.0034
	6.ay	0.0896 ± 0.0327 B	0.0501 ± 0.0076
	9.ay	0.0278 ± 0.0078 B	0.0186 ± 0.0043

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.2299; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.3076

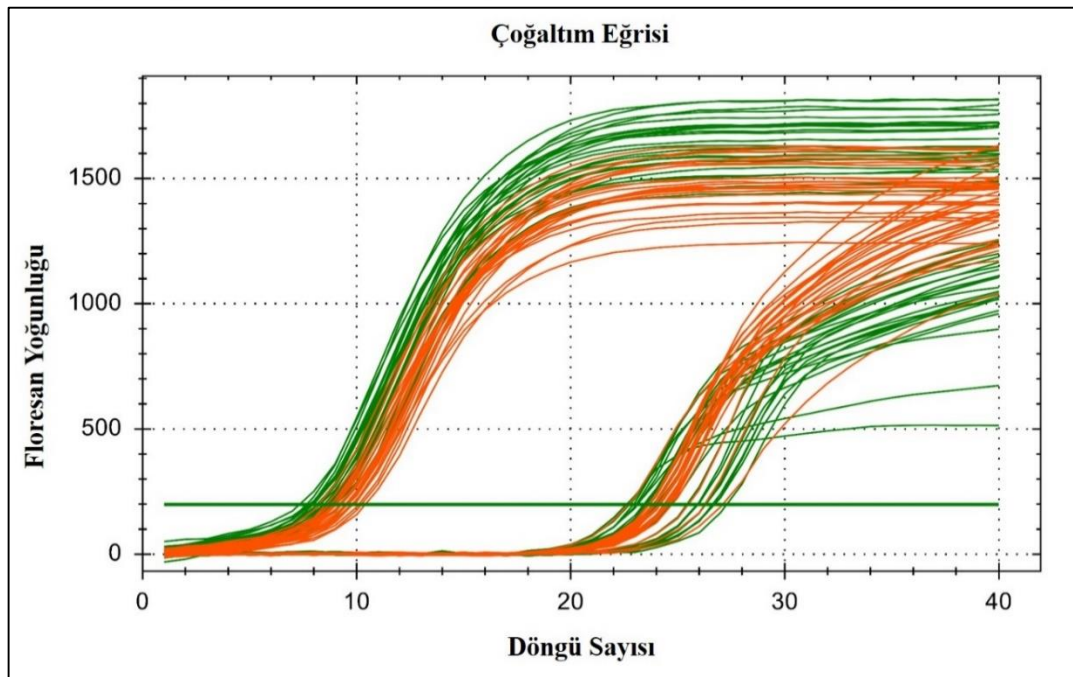
4.3.5.5. NL-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda NL-1 geninin turunçgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında NL-1 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından NL-1 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 7-11. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın NL-1 geni ise 24-26. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.25). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-1 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

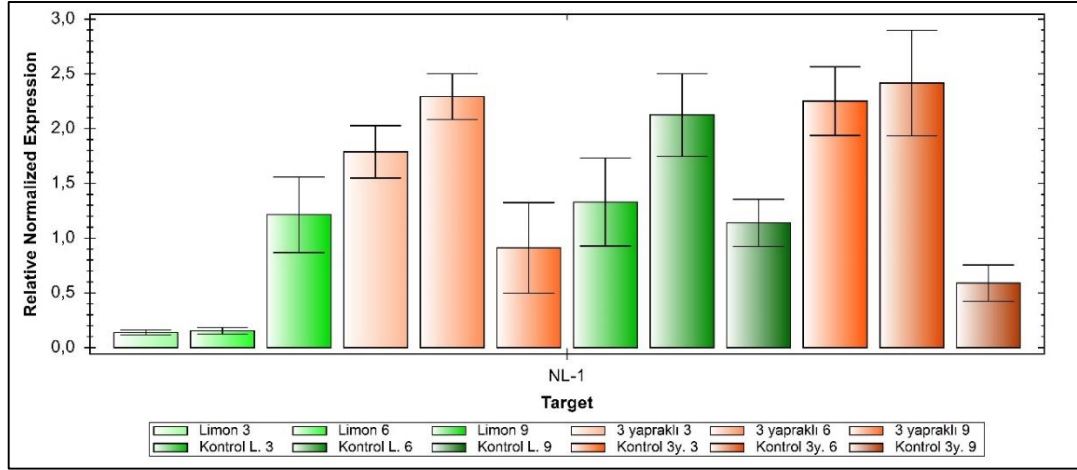
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-1 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ve 6. aylarında NL-1 geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde yüksek olurken, virüs enfekteli limon bitkilerinde ise oldukça düşük oldukları belirlenmiştir. Ancak 9. ayda ise hem CCDaV enfekteli limon bitkilerinde hem de kontrol bitkilerinde NL-1 geninin ekspresyonunun aynı düzeyde olduğu gözlenmiştir. Üç yapraklı portakal bitkilerinde 3. ve 6. aylarda hem kontrol hem de virüs enfekteli bitkilerde gen

ekspresyonu birbirine yakın düzeyde olurken, 9. ay sonrasında tüm üç yapraklı bitkilerinde önemli bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.26).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde NL-1 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limon bitkisinde sadece 6. ayda CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Üç yapraklı portakal bitkisinde ise enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. NL-1 geninin ekspresyonunun hem limon hem de üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde 9. ay dışındaki aylarda daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise gen ekspresyonunun 3. ve 6. ayda üç yapraklı portakalda yüksek değerde bulunmasına rağmen, limon bitkisinde sadece 9. ayda yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar NL-1 geninin hem limon hem de üç yapraklı portakal bitkisindeki ekspresyonun 9. ay haricinde yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Buna rağmen 9. ayda her iki turuncgil bitkisinde de düşük düzeyde ekspresyon gösteren NL-1 R geninin ise CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını ortaya koymuştur (Çizelge 4.12).



Şekil 4.25. NL-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.26. NL-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.12. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-1 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.0795 ± 0.0026 C	1.1367 ± 0.4939
	6.ay	0.1343 ± 0.0167 C b	1.6378 ± 0.0472 a
	9.ay	0.9445 ± 0.1329 AB	0.8855 ± 0.1145
Üç yapraklı	3.ay	1.4050 ± 0.2781 AB *	1.7386 ± 0.1375
	6.ay	1.7700 ± 0.1233 A	1.9771 ± 0.6653
	9.ay	0.8377 ± 0.4576 B	0.4873 ± 0.1775

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.1263; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.4222

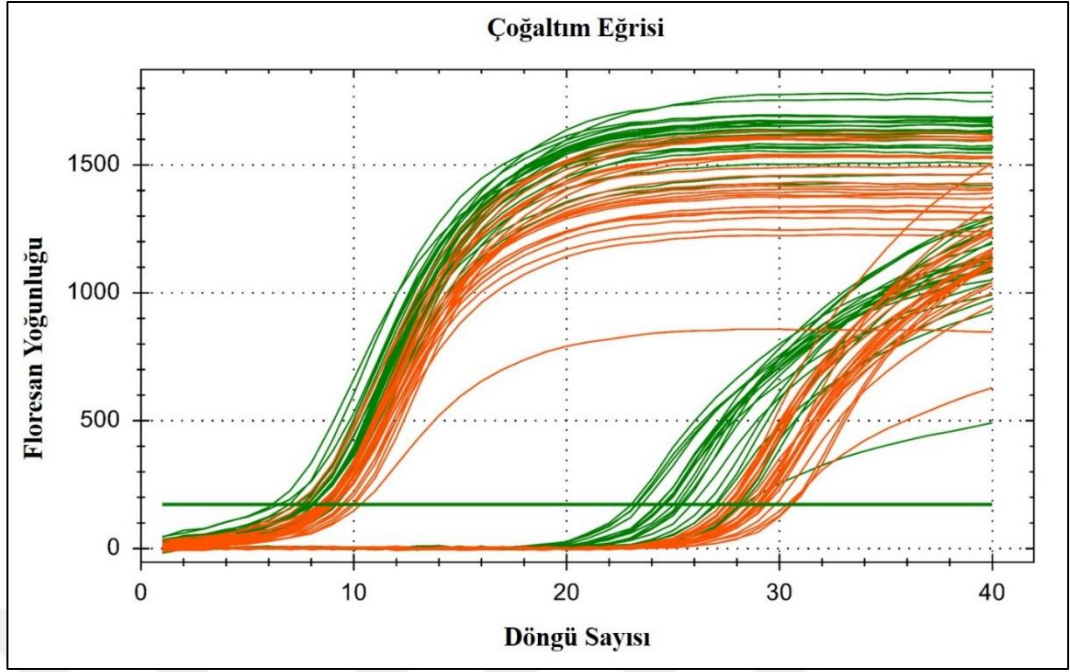
4.3.5.6. NL-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda NL-2 geninin turuncu bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında NL-2 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından NL-2 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 7-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın NL-2 geni ise 23-31. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır

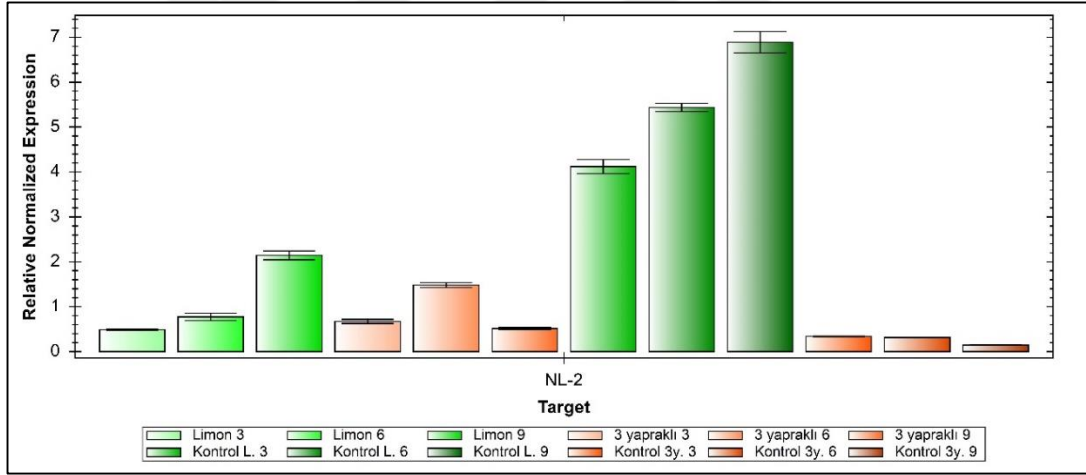
(Şekil 4.27). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-2 R geninin ekspresyonunun belirli noktalarda farklılık olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-2 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında NL-2 geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde yüksek olurken, virüs enfekteli limon bitkilerinde ise 3 kat kadar düşük olduğu belirlenmiştir. Buna karşın CCDaV enfekteli üç yapraklı portakal ve kontrol bitkilerinin tamamında NL-2 geninin ekspresyon seviyesi tüm aylarda oldukça düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.28).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde NL-2 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limon bitkisinde sadece 6. ayda üç yapraklı portakal bitkisinde ise 9. ayda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. NL-2 R geninin ekspresyonunun limon kontrol bitkilerinde üç yapraklı portakala göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise gen ekspresyonunun 3. ve 6. ayda üç yapraklı portakalda yüksek değerde bulunmasına rağmen, 9. ayda limon bitkisinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar NL-2 R geninin limon bitkisinde tüm aylarda CCDaV enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını, buna karşın üç yapraklı portakal bitkisinde ise enfeksiyon ilerledikçe uyarıldığını ortaya koymaktadır (Çizelge 4.13).



Şekil 4.27. NL-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.28. Limon ve üç yapraklı portakalda NL-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol bitkilerindeki ekspresyon analizi

Çizelge 4.13. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde NL-2 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.0839 ± 0.0043	0.8748 ± 0.4341
	6.ay	0.1292 ± 0.0167 b	1.0222 ± 0.2143 a
	9.ay	0.4217 ± 0.1502	1.3026 ± 0.3026
Üç yapraklı	3.ay	0.1294 ± 0.0392	0.0634 ± 0.0082
	6.ay	0.2920 ± 0.1046	0.0577 ± 0.0025
	9.ay	0.0944 ± 0.0072 a *	0.0284 ± 0.0091 b

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Harflendirmeler aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır.

LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): 0.1286;

LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.4692; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): Ö.D.

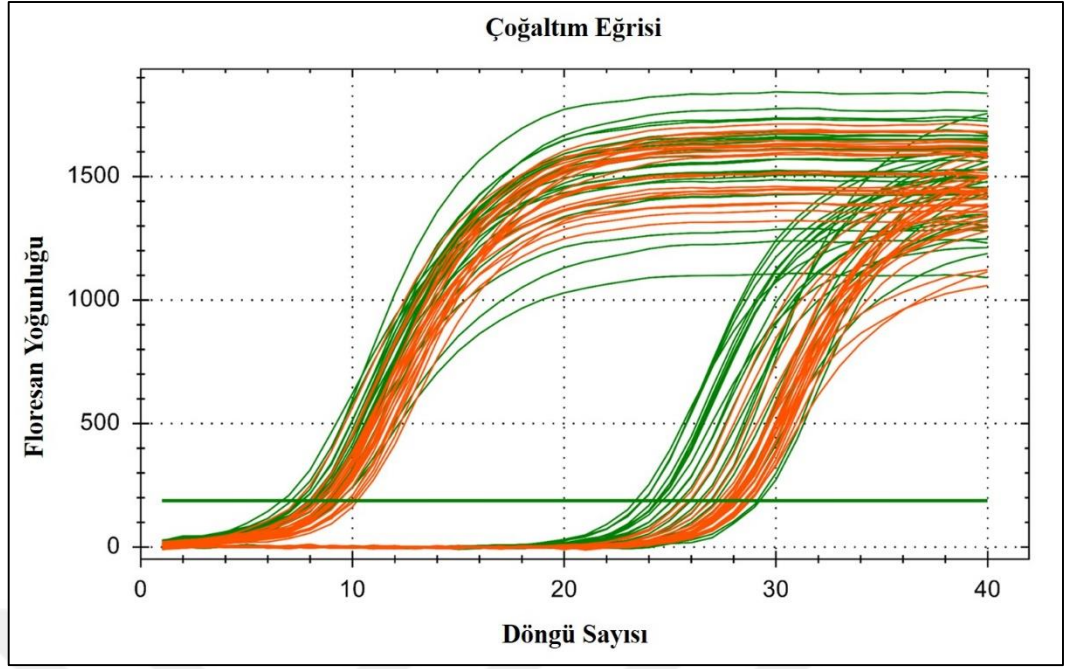
4.3.5.7. T-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasında ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda T-1 geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında T-1 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından T-1 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 8-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın T-1 geni ise 23-39. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.29). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-1 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

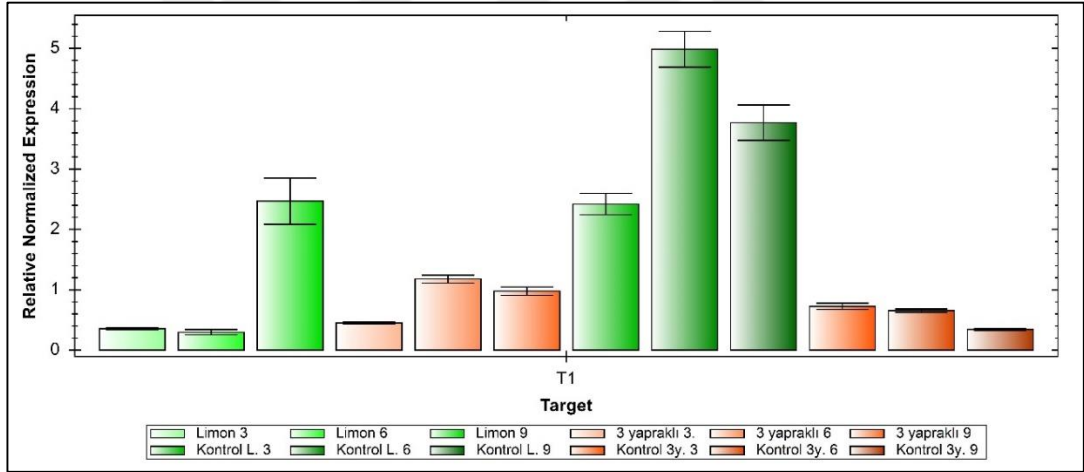
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-1 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 6. ayında T-1 geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde en yüksek değerde olduğu; fakat 3. ve 9. aylarda daha düşük olduğu gözlenmiştir. Virüs enfekteli limon bitkilerinde ise 3. ve 6. aylarda gen ekspresyonu oldukça düşük olurken, 9. ayda 2 kat artış göstermiştir. Hem virüs enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde hem de kontrol

bitkilerinde T-1 R geninin ekspresyonun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görölmüştür (Şekil 4.30).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde T-1 R genlerinin ekspresyonlarında oluşun değişimler istatistiksel olarak analiz edildiğinde limon bitkisinde sadece 6. ayda CCDaV enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş; fakat üç yapraklı portakal bitkisinde enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. T-1 R geninin ekspresyonunun limon kontrol bitkilerinde daha yüksek olduğu görölmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise gen ekspresyonunun 3. ayda hem limon hem de üç yapraklı portakalda birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. T-1 R gen ekspresyonunun 6. ayda virüs enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde, 9. ayda ise enfekteli limon bitkilerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar T-1 R geninin üç yapraklı portakal bitkisindeki ekspresyonun 3. ayında ve limon bitkisinde ise 3. ve 6. aylarda yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakal bitkisindeki T-1 R geninin ekspresyonu 6. ve 9. aylarda düşük düzeyde iken CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını ortaya koymuştur. Limon bitkisinde 9. ayda virüs enfeksiyonu öncesi ve sonrasında birbirine yakın değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.29. T-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.30. T-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.14. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-1 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.0886 ± 0.0024	0.5892 ± 0.2792
	6.ay	0.0615 ± 0.0068 b *	1.0681 ± 0.0557 a
	9.ay	0.8540 ± 0.6710	0.8395 ± 0.2326
Üç yapraklı	3.ay	0.0964 ± 0.0070	0.1568 ± 0.0217
	6.ay	0.2627 ± 0.0739	0.1405 ± 0.0154
	9.ay	0.2301 ± 0.0962	0.0738 ± 0.0008

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Harflendirmeler aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır.

LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.;

LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.1302; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): Ö.D.

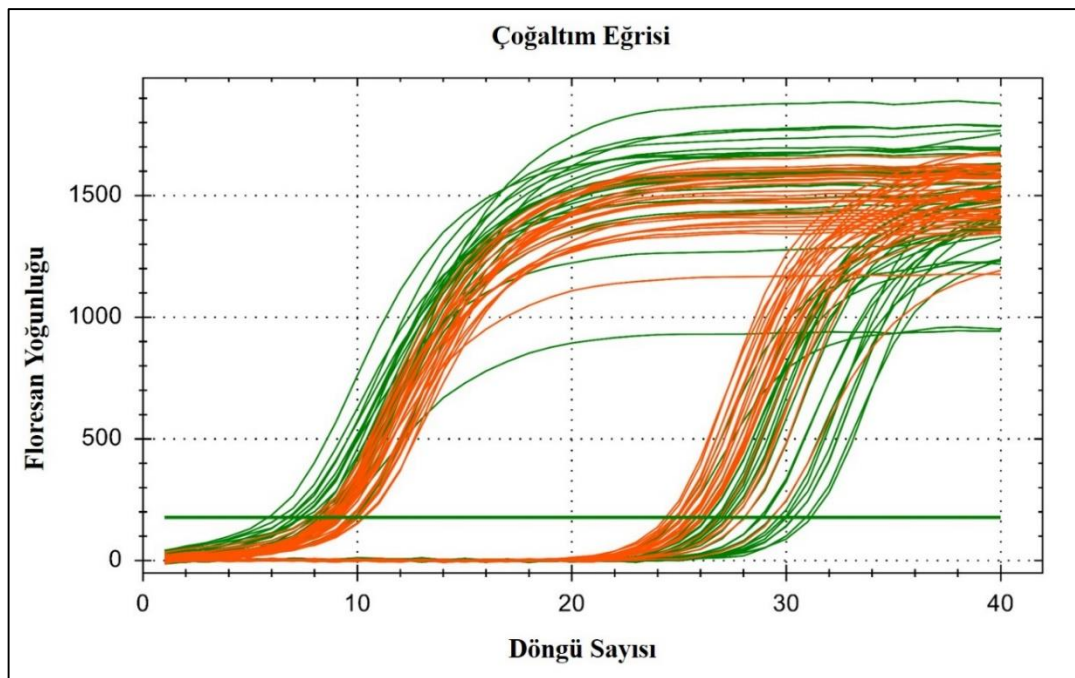
4.3.5.8. T-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasında ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda T-2 geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında T-2 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından T-2 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 6-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın T-2 geni ise 23-28. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.31). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-2 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

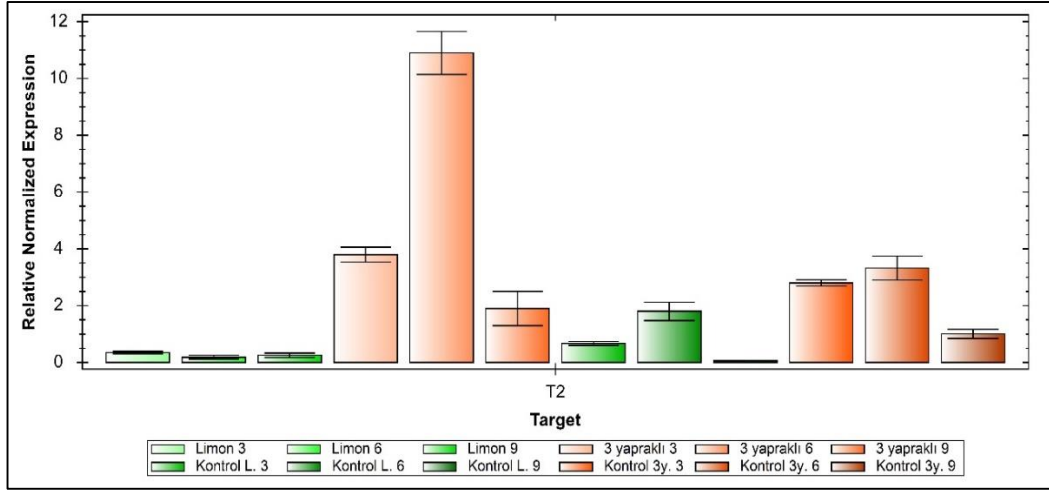
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-2 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında T-2 geninin ekspresyon düzeyinin enfekteli bitkilerde oldukça düşük bir seviyede olduğu belirlenmiştir. Kontrol limon bitkilerinde ise sadece 3. ayda ekspresyon elde edilebilmiştir. Üç yapraklı portakal kontrol bitkilerinde ise 3. ve 6. ay sonunda T-2 R geninin ekspresyonu aynı düzeyde iken 9. ayda düşüş göstermiştir. Üç yapraklı portakal bitkisinde inokülasyonun 3. ayında T-2 geninin ekspresyon

düzeyinin virüs enfekteli ve kontrol bitkilerinde yaklaşık aynı düzeyde oldukları belirlenmiştir. Buna karşın T-2 R geninin ekspresyonu virüs inokülasyonunun 6. ayında 3 kat artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşmış; fakat 9. ay sonunda yine 5 kat düşüş göstermiştir (Şekil 4.32).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde T-2 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde limonda enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşın üç yapraklı portakalda 6. ayda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerin ekspresyon düzeylerindeki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-2 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun üç yapraklı portakalda limona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise T-2 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar T-2 R geninin limon bitkisinde 3. ve 6. aylardaki ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını, enfeksiyonun 9. ayında ise gen ekspresyonunun uyarıldığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren T-2 R geninin, CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).



Şekil 4.31. T-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.32. T-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.15. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde T-2 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.2133 ± 0.0214 B	0.4324 ± 0.1914
	6.ay	0.1460 ± 0.0258 B	1.1661 ± 0.5373
	9.ay	0.2525 ± 0.2044 B	0.0395 ± 0.0120
Üç yapraklı	3.ay	2.2322 ± 0.4733 AB *	1.6233 ± 0.2127
	6.ay	6.3376 ± 0.9567 A a	1.9127 ± 0.0987 b
	9.ay	2.1815 ± 1.8882 AB	0.6014 ± 0.1610

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 0.8341; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 1.1477

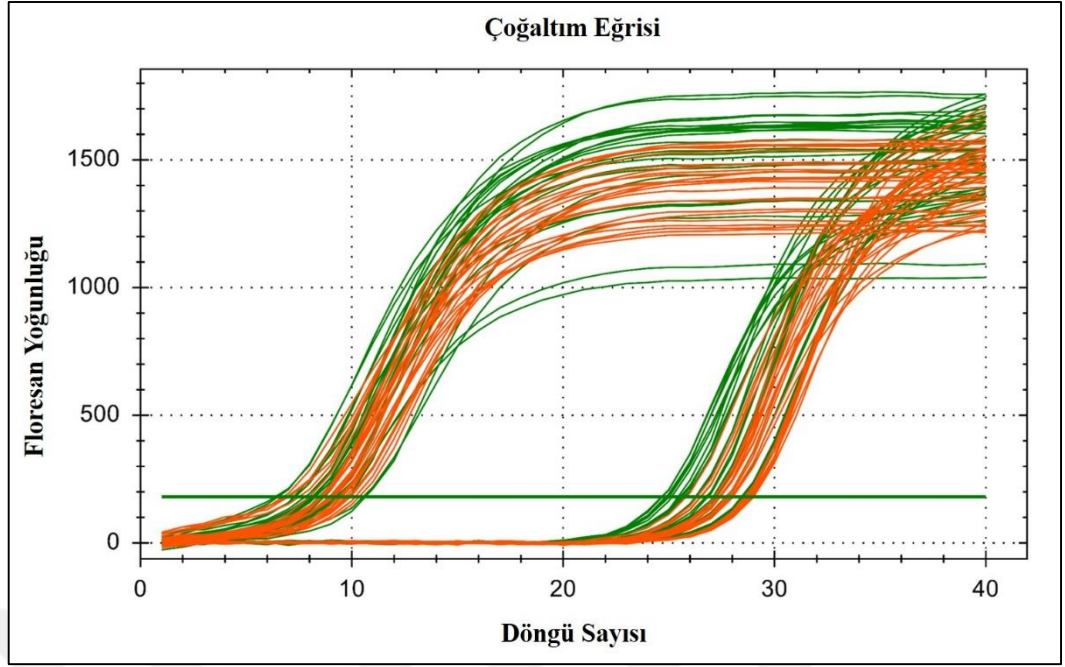
4.3.5.9. TNL Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda TNL geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında TNL R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından TNL geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 5-10. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın TNL geni ise 25-28. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır

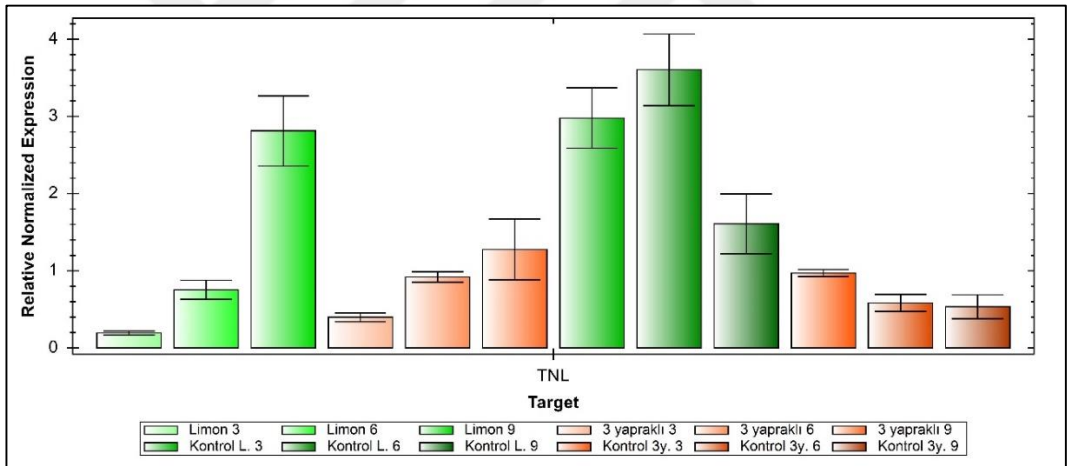
(Şekil 4.33). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde TNL R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde TNL R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ve 6. aylarında TNL geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde yaklaşık aynı düzeyde oldukları belirlenmiştir. Ancak 9. ayda CCDaV enfekteli limon bitkilerinde kontrol bitkilerine göre artış görülmüştür. Buna karşın üç yapraklı portakalın hem virüs enfekteli hem de kontrol bitkilerinde 3, 6 ve 9. aylarda TNL R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür (Şekil 4.34).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde TNL R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde üç yapraklı portakalın enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşın limonda ise sadece 6. ayda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerin ekspresyon düzeylerindeki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde TNL R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun limonda üç yapraklı portakala göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise TNL R geninin ekspresyonunun 9. ay haricinde üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar TNL R geninin limon bitkisinde 3. ve 6. aylardaki ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını, enfeksiyonun 9. ayında ise gen ekspresyonunun uyarıldığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda ise, 6. ve 9. aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren TNL R geninin, CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).



Şekil 4.33. TNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.34. TNL R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.16. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde TNL geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.1494 ± 0.0071	1.6262 ± 0.6697
	6.ay	0.2171 ± 0.0223 b *	1.8208 ± 0.3185 a
	9.ay	1.6540 ± 0.8822	0.8642 ± 0.3259
Üç yapraklı	3.ay	0.2001 ± 0.0324	0.4965 ± 0.1149
	6.ay	0.4778 ± 0.1359	0.2907 ± 0.0080
	9.ay	0.6411 ± 0.0891	0.2884 ± 0.1119

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Harflendirmeler aynı çeşit içerisinde kontrol ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.5200; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): Ö.D

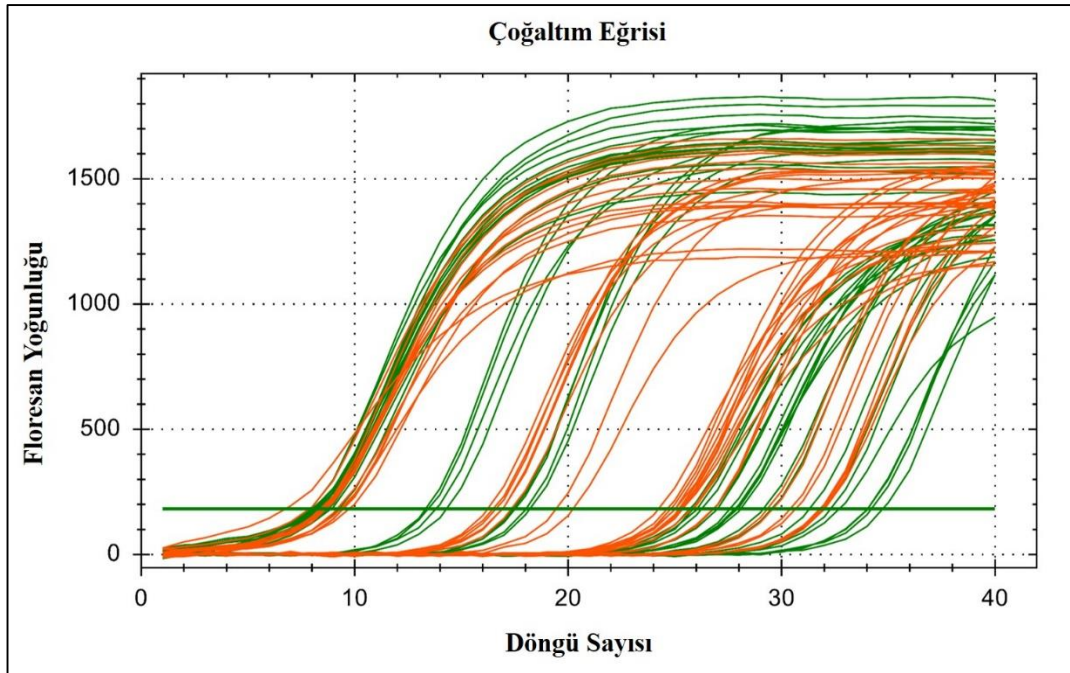
4.3.5.10. RLK-1 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasında ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda RLK-1 geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında RLK-1 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından RLK-1 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 6-20. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın RLK-1 geni ise 24-35. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.35). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-1 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

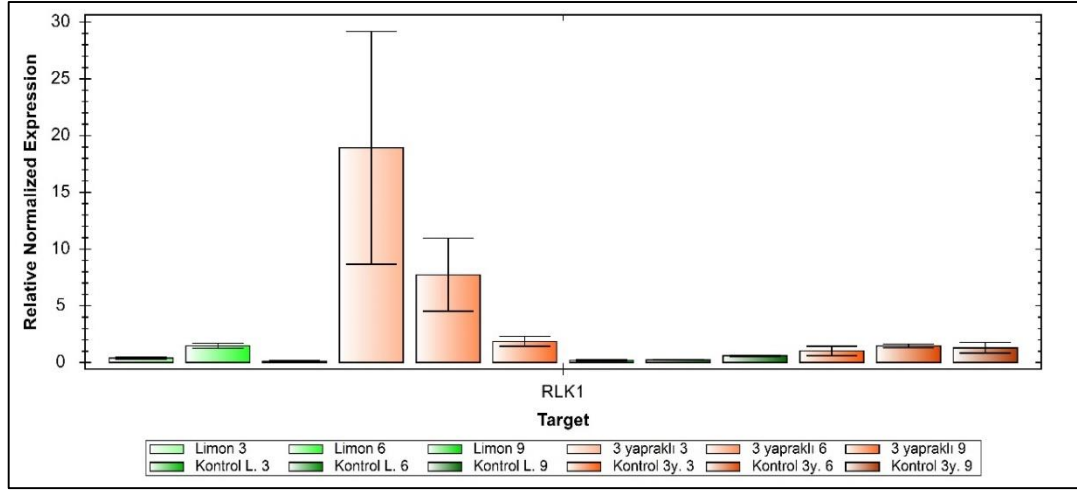
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-1 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında RLK-1 geninin ekspresyon düzeyinin enfekteli ve kontrol bitkilerinde oldukça düşük bir seviyede ve olduğu belirlenmiştir. Üç yapraklı portakal kontrol bitkilerinde de aynı şekilde RLK-1 geninin ekspresyonu birbirine yakın ve düşük bir seviyede tespit edilmiştir. CCDaV enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde inokülasyonun 3. ayında RLK-1 geninin ekspresyon düzeyinin artış göstererek en

yüksek seviyeye ulaştığı; ancak 6. ve 9. aylarda yine düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.36).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde RLK-1 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde limonda 6. ve 9. aylarda, üç yapraklı portakalda ise 3. ve 6. aylarda enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-1 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun üç yapraklı portakalda limona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise RLK-1 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar RLK-1 R geninin limon bitkisinde 9. ay haricinde ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe uyarıldığını, enfeksiyonun 9. ayında ise gen ekspresyonunun baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren RLK-1 R geninin, CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığı tespit edilmiştir. Enfeksiyon sonucunda RLK-1 geninin ekspresyonunun üç yapraklı portakalda limona göre bariz şekilde yüksek olarak gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 4.17).



Şekil 4.35. RLK-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.36. RLK-1 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.17. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-1 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.5434 ± 0.0044 DE	0.2309 ± 0.0793
	6.ay	1.0112 ± 0.1491 D a	0.2261 ± 0.0161 b
	9.ay	0.1418 ± 0.0488 E b	0.6413 ± 0.0480 a
Üç yapraklı	3.ay	32.1680 ± 1.0856 A a *	1.1314 ± 0.2720 b
	6.ay	20.9625 ± 0.7982 B a	1.6023 ± 0.2992 b
	9.ay	2.1416 ± 0.7504 C	1.5962 ± 0.7835

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): 0.6904; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 0.6337; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): 0.3280; LSD Limon 9 ay (0.05): 0.3111; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.4343

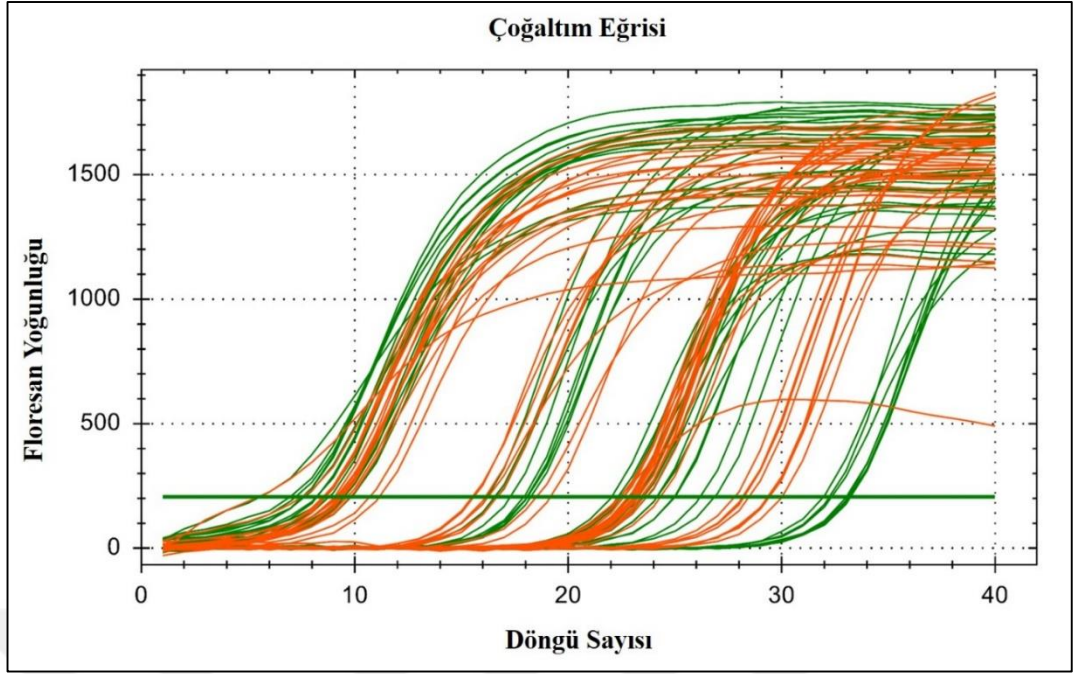
4.3.5.11. RLK-2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda RLK-2 geninin turunçgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında RLK-2 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından RLK-1 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 5-15. döngüler arasında Ct değerine

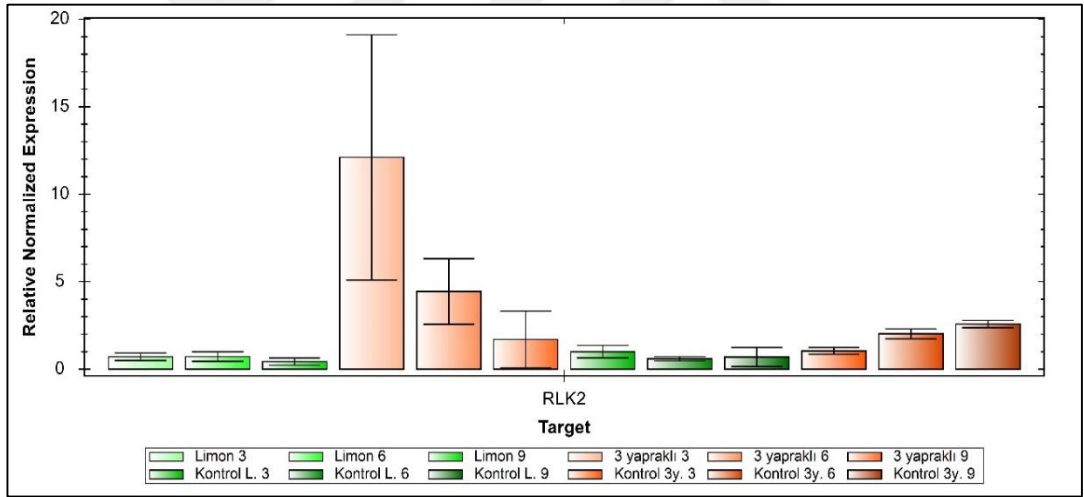
ulaşmıştır. Buna karşın RLK-2 geni ise 22-33. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.37). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-2 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-2 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında RLK-2 geninin ekspresyon düzeyinin enfekteli ve kontrol bitkilerinde oldukça düşük bir seviyede ve olduğu belirlenmiştir. Üç yapraklı portakal kontrol bitkilerinde de RLK-2 geninin ekspresyonunun zaman ilerledikçe artış göstermesine karşın düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. CCDaV enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde inokülasyonun 3. ayında RLK-2 geninin ekspresyon düzeyinin artış göstererek en yüksek seviyeye ulaştığı; ancak 6. ve 9. aylarda yine düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.38).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde RLK-2 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde limonda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkileri arasındaki farklar tüm aylarda istatistiksel olarak önemli bulunmamasına rağmen üç yapraklı portakalda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkileri arasındaki farklar tüm aylarda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-2 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun üç yapraklı portakalda 3. ay haricinde limona göre daha yüksek olduğu ve 3. ayda birbirine yakın olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise RLK-2 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar RLK-2 R geninin limon bitkisinde tüm aylarda ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğunu ve CCDaV enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren RLK-2 R geninin, CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığı tespit edilmiştir. Enfeksiyon sonucunda RLK-2 geninin ekspresyonunun uyarımı üç yapraklı portakalda limona göre bariz şekilde yüksek olarak gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 4.18).



Şekil 4.37. RLK-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.38. RLK-2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.18. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLK-2 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol ekspresyonu
Limon	3.ay	1.4167 ± 0.0289 C	2.3298 ± 1.0141
	6.ay	1.5966 ± 0.2210 C	1.2649 ± 0.1835
	9.ay	0.9743 ± 0.3637 C	1.7785 ± 0.9976
Üç yapraklı	3.ay	110.4578 ± 0.9719 A a *	2.2124 ± 0.2867 b
	6.ay	44.1263 ± 0.6385 B a	4.3638 ± 1.0325 b
	9.ay	24.1014 ± 1.6633 B a	5.4007 ± 0.0004 b

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): 0.5185; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 1.1068; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): 0.7293; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.4025

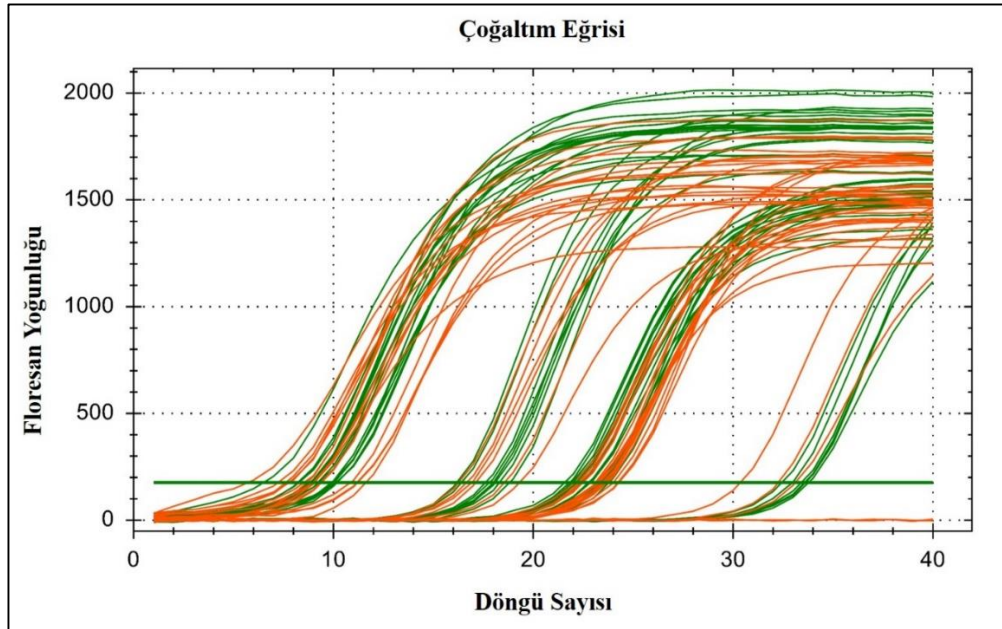
4.3.5.12. RLP-3 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda RLP-3 geninin turuncgil bitkilerinde hastalıklara dayanıklılıkta ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında RLP-3 R geninin ekspresyonu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından RLP-3 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 5-18. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın RLP-3 geni ise 22-33. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.39). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-3 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

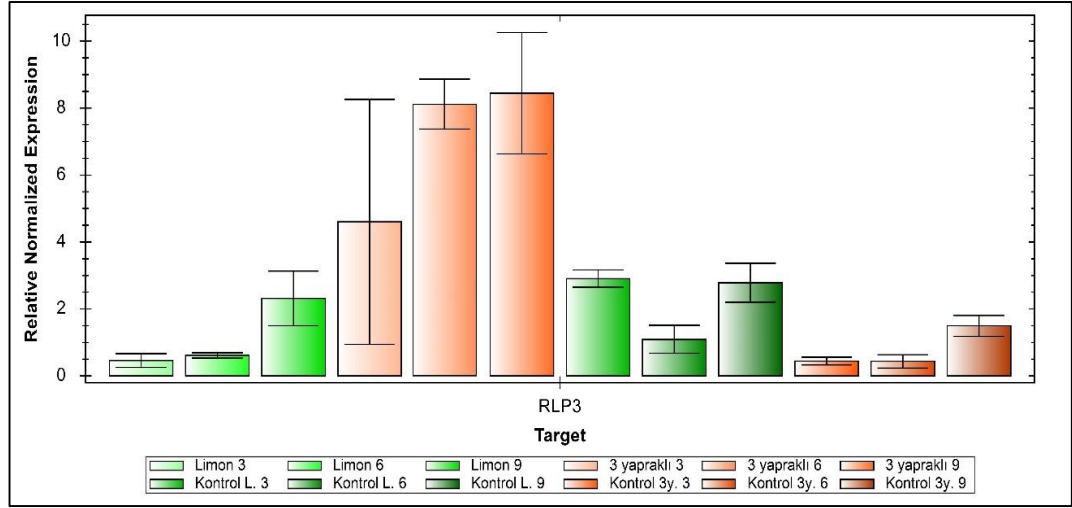
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-3 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3. ve 9. aylarında RLP-3 geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde yaklaşık aynı düzeyde, 6. ayda ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Virüs enfekteli limon bitkilerinde 3 ve 6. aylarda çok düşük ekspresyon elde edilmiştir. Enfeksiyonun 9. ayında enfekteli limon bitkilerinde RLP-3 geninin ekspresyonunun 2 kat arttığı görülmüştür. Üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde 3, 6 ve 9. aylarda RLP-3 R

geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği belirlenmiştir. Ancak enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde gen ekspresyonunun 3. ayda artış gösterdiği ve 9. ayda 2 katına ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.40).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde RLK-3 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde limonda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkileri arasındaki farklar tüm aylarda istatistiksel olarak önemli bulunmamasına rağmen üç yapraklı portakalda enfekteli bitkiler ile kontrol bitkileri arasındaki farklar tüm aylarda istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-3 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun limonda üç yapraklı portakal bitkisine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise RLP-3 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar RLP-3 R geninin limon bitkisinde tüm aylarda ekspresyonun yüksek düzeyde olduğunu ve CCDaV enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren RLP-3 R geninin CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını ve özellikle 3. ay sonunda enfeksiyon ile birlikte çok yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Enfeksiyon sonucunda RLP-3 geninin ekspresyonunun uyarımı üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek düzeyde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.19).



Şekil 4.39. RLP-3 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.40. RLP-3 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.19. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-3 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	2.5349 ± 0.2828 D	4.1386 ± 0.2459
	6.ay	0.7186 ± 0.1228 E	1.6230 ± 0.4666
	9.ay	1.6314 ± 0.4270 D	4.0291 ± 0.8275
Üç yapraklı	3.ay	55.1766 ± 0.8445 C a *	0.6473 ± 0.1607 b
	6.ay	82.6167 ± 1.8087 B a	0.6213 ± 0.0683 b
	9.ay	196.2813 ± 3.5108 A a	2.1616 ± 0.4204 b

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): 0.6916; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): 0.4671; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): 0.6648; LSD Limon 3ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.375

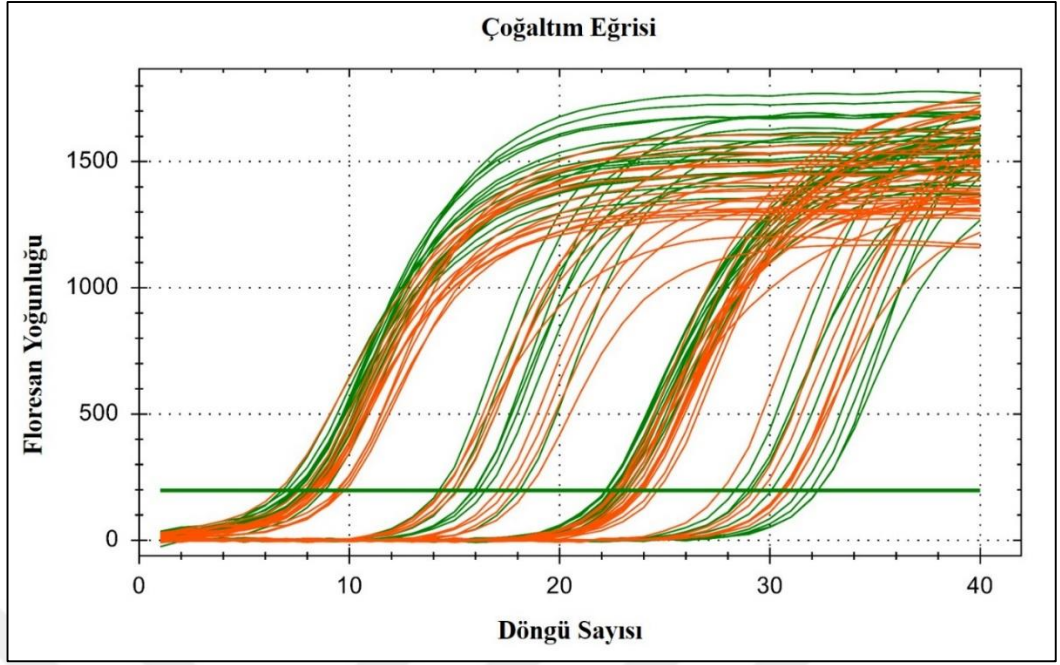
4.3.5.13. RLP-5 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasında ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda RLP-5 geninin turunçgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında RLP-5 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından RLP-5 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 6-18. döngüler arasında Ct değerine

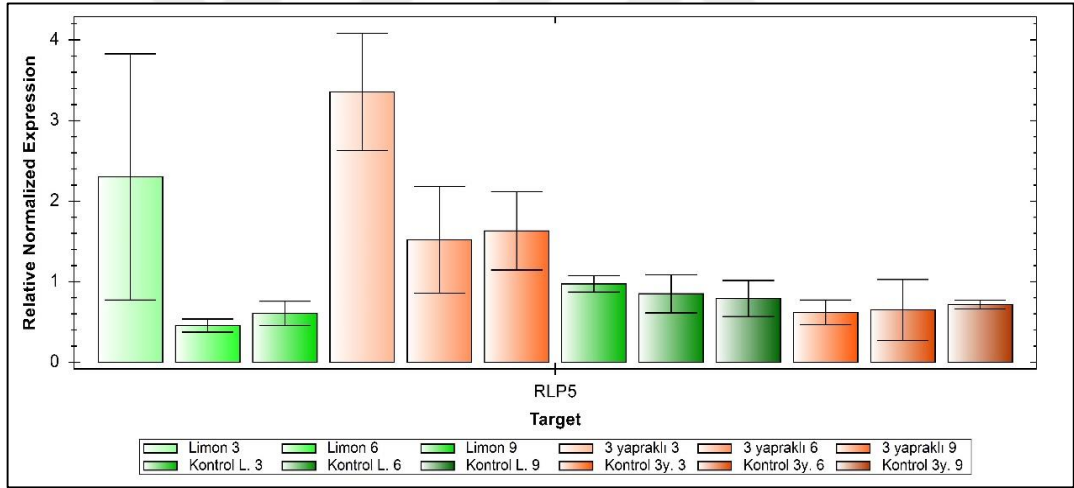
ulaşmıştır. Buna karşın RLP-5 geni ise 23-33. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.41). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-5 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-5 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında RLP-5 geninin ekspresyon düzeyinin kontrol bitkilerinde aynı seviyede olduğu ve değişmediği belirlenmiştir. Enfekteli limon bitkilerinde gen ekspresyonu 3. ayda artış göstermiş; fakat 6. ve 9. aylarda 2 kat azalmıştır. Üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde tüm aylarda RLP-5 R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür. Ancak enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde gen ekspresyonunun 3. ayda en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Buna karşın 6. ve 9. aylarda ekspresyonun 2 kat azaldığı ve değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.42).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde RLP-5 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi sonucunda limonda sadece 3. ayda enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Üç yapraklı portakalda ise 3. ve 9. aylarda enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-5 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun nispeten birbirine yakın olmakla birlikte limonda üç yapraklı portakal bitkisine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise RLP-5 R geninin ekspresyonunun 3. ayda birbirine yakın, 6. ve 9. aylarda ise üç yapraklı portakalda limona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar RLP-5 R geninin ekspresyonunun limon bitkisinde 3. ayda düşük düzeyde olduğunu ve CCDaV enfeksiyonu ilerledikçe uyarıldığını, diğer aylarda ise gen ekspresyonunun virüs enfeksiyonu ile baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren RLP-5 R geninin CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.20).



Şekil 4.41. RLP-5 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.42. RLP-5 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.20. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde RLP-5 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	3.9382 ± 0.1174 A a	1.1141 ± 0.1141 b
	6.ay	0.6992 ± 0.1026 D	0.9996 ± 0.2533
	9.ay	0.7380 ± 0.1226 CD	0.9131 ± 0.1428
Üç yapraklı	3.ay	3.9014 ± 0.7882 A a	0.7198 ± 0.1436 b
	6.ay	1.8582 ± 0.0574 BC	0.7430 ± 0.0720
	9.ay	2.2860 ± 0.8766 AB a	0.8157 ± 0.0274 b

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): 0.9371; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): 0.1117; LSD Limon 3ay (0.05): 0.2653; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.5245

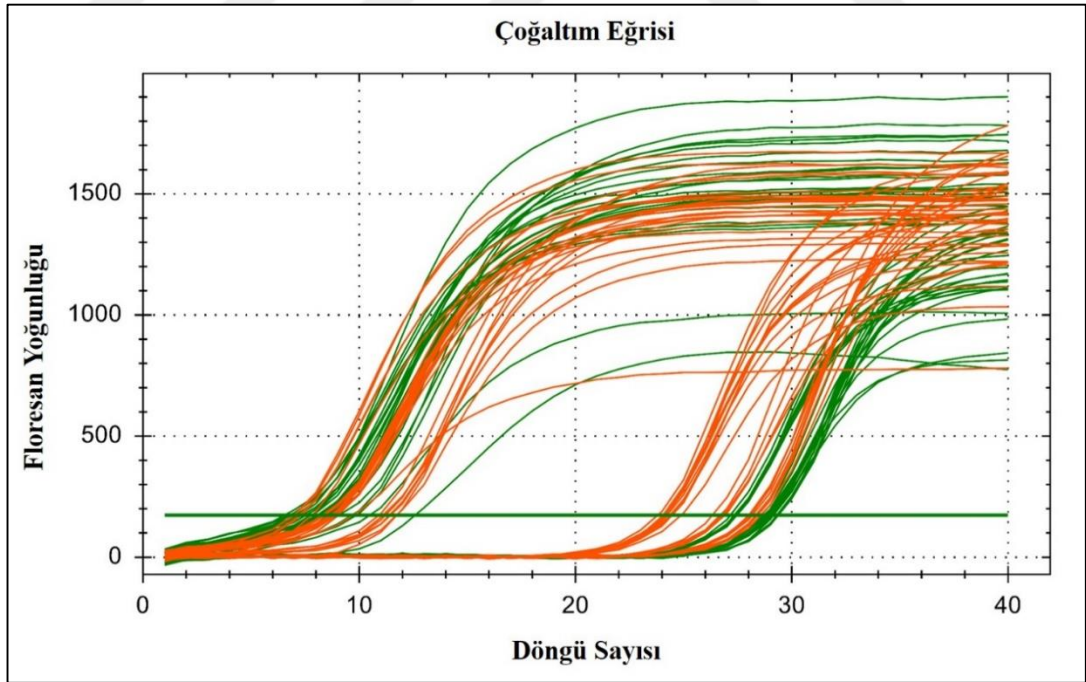
4.3.5.14. Unknown 2 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda Unknown 2 geninin turunçgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında Unknown 2 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından Unknown 2 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 6-12. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın Unknown 2 geni ise 23-29. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır (Şekil 4.43). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 2 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

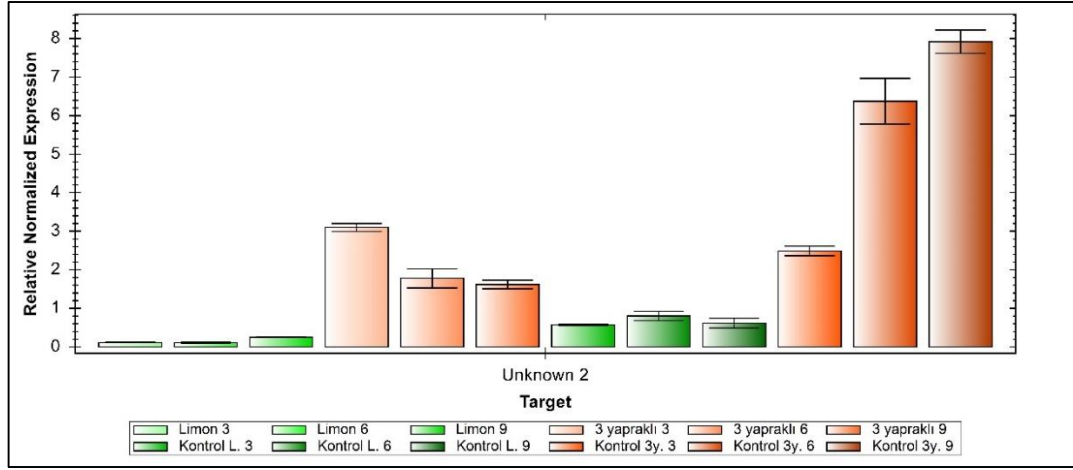
CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 2 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyonunun 3, 6 ve 9. aylarında Unknown 2 geninin ekspresyon düzeyinin enfekteli ve kontrol bitkilerinde düşük ve aynı düzeyde oldukları belirlenmiştir. Buna karşın üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde enfeksiyondan sonra gen ekspresyon seviyesinde düzenli bir artış olduğu tespit edilmiştir. 3. ay sonrası elde edilen gen ekspresyon düzeyinin 9. ay sonunda 4 katına ulaştığı gözlenmiştir. CCDaV ile

enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde ise Unknown 2 gen ekspresyonunun zamanla azaldığı, 6 ve 9. aylarda birbirine yakın düzeyde olduğu görülmüştür (Şekil 4.44).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde Unknown 2 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde limonda 3. ayda, üç yapraklı portakalda ise 9. ayda enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 2 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun üç yapraklı portakalda limona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise Unknown 2 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Unknown 2 R geninin limon bitkisinde tüm aylarda ekspresyonunun yüksek düzeyde olduğu ve virüs enfeksiyonu ilerledikçe baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda 3. ayda düşük olan gen ekspresyonu enfeksiyon ile birlikte uyarılmış, 6. ve 9. aylarda ise CCDaV enfeksiyonu ile baskılanmıştır (Çizelge 4.21).



Şekil 4.43. Unknown 2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.44. Unknown 2 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.21. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 2 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.0495 ± 0.0029 C b	0.2006 ± 0.0020 a
	6.ay	0.0395 ± 0.0061 C	0.3829 ± 0.2600
	9.ay	0.0884 ± 0.0096 C	0.3170 ± 0.2318
Üç yapraklı	3.ay	1.0893 ± 0.0840 A *	3.8730 ± 0.0127
	6.ay	0.6836 ± 0.2810 AB	6.2707 ± 0.4055
	9.ay	0.5765 ± 0.0994 B b	8.7772 ± 0.1155 a

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Üç yapraklı 3 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Üç yapraklı 9 ay (0.05): 0.3197; LSD Limon 3ay (0.05): 0.0300; LSD Limon 6 ay (0.05): Ö.D.; LSD Limon 9 ay (0.05): Ö.D.; LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 0.2706

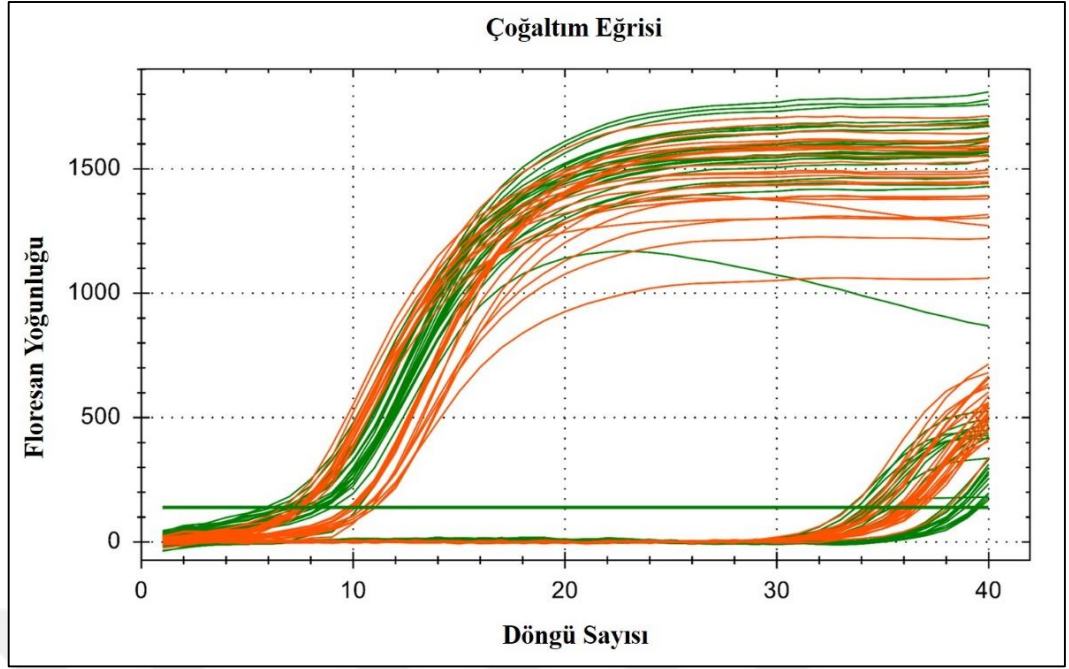
4.3.5.15. Unknown 6 Geninin CCDaV enfeksiyonu sonrasındaki ifadesinin belirlenmesi

Literatür çalışması sonucunda Unknown 6 geninin turuncgil bitkilerinde hastalık dayanımında ve/veya toleransta etkili olabileceği belirtildiğinden dolayı CCDaV inokülasyonu sırasında RLP-5 R geninin ekspresyonunu incelenmiştir. Yapılan qRT-PCR sonucunda üç yapraklı portakal ve limon bitkilerinin tamamından Unknown 6 geni ve referans gen olarak kullanılan rRNA geni çoğaltılmıştır. Tüm bitkilerde referans genin çoğaltımı hızlı bir şekilde gerçekleşerek 5-11. döngüler arasında Ct değerine ulaşmıştır. Buna karşın Unknown 6 geni ise 33-38. döngüler arasında Ct

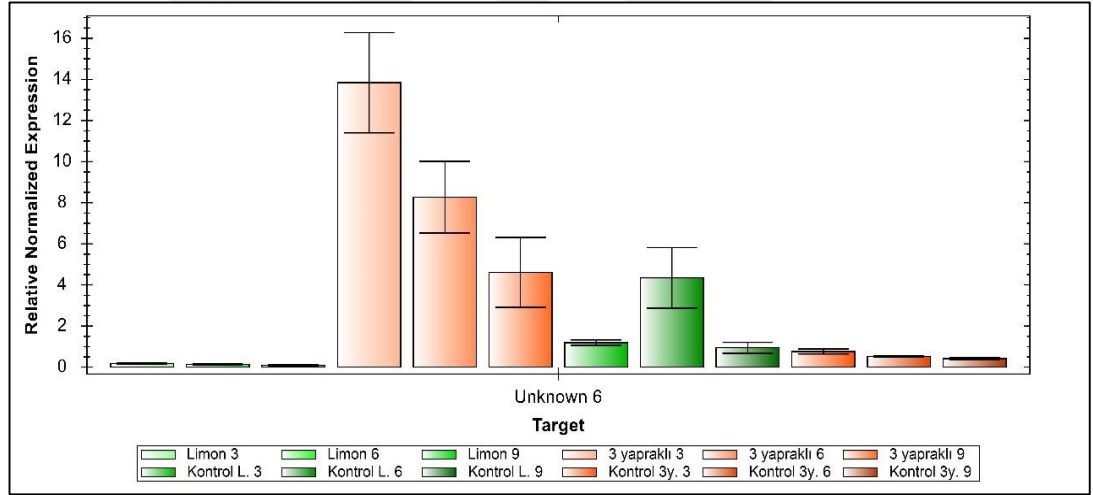
değerine ulaşmıştır (Şekil 4.45). Bu sonuçlar limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 6 R geninin ekspresyonunun farklı olduğunu göstermiştir.

CCDaV inokülasyonu yapılan ve yapılmayan limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 6 R geninin ekspresyon düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde limon bitkisinde CCDaV inokülasyondan 3 ay sonra kontrol bitkilerinden elde edilen Unknown 6 gen ekspresyonunun 6. ayda 3 katına çıktığı; fakat 9. ayda yine aynı seviyeye geldiği gözlenmiştir. Üç yapraklı portakalın kontrol bitkilerinde tüm aylarda Unknown 6 R geninin ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve değişmediği görülmüştür. Ancak enfekteli üç yapraklı portakal bitkilerinde gen ekspresyonunun 3. ayda en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Buna karşın 6. ve 9. aylarda ekspresyonun kademeli olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.46).

CCDaV enfekteli bitkiler ile kontrol bitkilerinde Unknown 6 R genlerinin ekspresyonlarında oluşan değişimlerin analizi neticesinde hem limonda hem de üç yapraklı portakal enfekteli ile kontrol bitkileri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 6 R geninin ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol bitkilerinde genin ekspresyonunun üç yapraklı portakal bitkisinde limona göre daha yüksek olduğu görülmüştür. CCDaV enfekteli bitkilerde ise Unknown 6 R geninin ekspresyonunun tüm aylarda üç yapraklı portakalda limona göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar Unknown 6 R geninin limon bitkisinde tüm aylarda ekspresyonun düzeyinin CCDaV enfeksiyonu ilerledikçe göreceli olarak baskılandığını göstermektedir. Üç yapraklı portakalda tüm aylarda düşük düzeyde ekspresyon gösteren Unknown 6 R geninin CCDaV enfeksiyonuyla uyarıldığını, özellikle 3. ay sonunda enfeksiyon ile birlikte daha yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.22).



Şekil 4.45. Unknown 6 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerindeki çoğaltım eğrileri



Şekil 4.46. Unknown 6 R geninin CCDaV enfekteli ve kontrol limon ve üç yapraklı bitkilerinde ekspresyon analizi

Çizelge 4.22. CCDaV inokülasyonundan sonra limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde Unknown 6 geninin ekspresyon analizi

Tür	Aylar	CCDaV Enfekteli	Kontrol
Limon	3.ay	0.2550 ± 0.0160 B	0.4965 ± 0.1149
	6.ay	0.1412 ± 0.0236 B	0.3779 ± 0.1023
	9.ay	0.1069 ± 0.0615 B	0.2938 ± 0.1112
Üç yapraklı	3.ay	14.3697 ± 5.2590 A	1.6023 ± 0.2992
	6.ay	10.0175 ± 6.0391 A	1.5962 ± 0.7835
	9.ay	5.3331 ± 2.9285 AB	1.1314 ± 0.2720

* Tabloda harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Büyük harfler çeşitlerin aylar bazında farklılığını ve küçük harfler ise aynı çeşit içerisinde kontrolü ile arasındaki farklılıkları göstermektedir (P<0.05). Analiz öncesinde verilere transformasyon uygulanmıştır. LSD Çeşit Ekspresyonu (0.05): 1.9778

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Turunçgil klorotik cüceleşme hastalığına sebep olan Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) dünyada ilk defa ülkemizde 1980 yılının sonlarında ortaya çıkmıştır. Araştırmacıların hastalığın doğada hızlı bir şekilde yayıldığını gözlemlemesi üzerine, olası vektörler üzerine yapılan çalışmalar sonucunda etmenin Defne beyazsineği *Parabemisia myricae* (Kuwana) Hom.: *Aleyroididae*) ile taşındığı bildirilmiştir (Korkmaz vd., 1994a; Korkmaz ve Garnsey, 2000). Böylece hastalık dünyada beyazsinek ile taşınan ilk turunçgil virüs hastalığı olarak kayıtlara geçmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile hastalık etmeninin aşı gözüyle ve gövdeye kesik atılarak da taşınabildiği, ancak bitki özsu inokülasyonu ile taşınmadığı rapor edilmiştir. (Korkmaz vd., 1995; Gök, 2010). Bulunuşundan yaklaşık 30 yıl sonra etmenin Geminiviridae familyasından ssDNA genomuna sahip virüs olduğu Loconsole vd., (2012a) tarafından belirlenmiştir. CCDaV'nin dünyada rapor edildiği iki ülke olan Türkiye ve Çin'de virüsün tüm genom ve CP genine dayalı karakterizasyonlarına yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Şu ana kadar ülkemizde 26 (Karanfil ve Korkmaz, 2019), Çin'de ise 4 adet (Guo vd., 2015) CCDaV izolatının karakterizasyonu yapılmıştır. Etmen sadece bu iki ülkede bulunarak sınırlı yaygınlık gösteriyor olmakla birlikte, günümüzde hastalıkların kısa sürede ve hızlı bir şekilde yayıldığı düşünüldüğünde dünya turunçgil endüstrisi için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında bulunmuş olan CCDaV-BATEM-M izolatının ilk önce tespiti ve karakterizasyonu yapılmıştır. CCDaV CP genine göre hem Türkiye hem de dünya izolatları ile aa ve nt düzeyinde çoklu dizi analizleri yapılarak, filogenetik ilişkileri incelenmiştir. Buna göre CCDaV-BATEM-M izolatı çoğunlukla Doğu Akdeniz Bölgesi'nden elde edilen Türk izolatlarıyla nt düzeyinde % 100 oranında benzerlik göstermiştir. Ayrıca daha önce Antalya'dan elde edilen iki izolatın CP geninin de (ANT79 ve ANT80) bu çalışmada kullanılan izolat ile %100 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Genel olarak hem aa hem de nt düzeyinde yapılan çoklu dizi karşılaştırmalarında CCDaV izolatlarının birbirleri ile çok yüksek seviyelerde sekans homolojisi gösterdiği belirlenmiştir. Karanfil ve Korkmaz (2019)'ın yaptığı çalışma kapsamında elde ettiği CCDaV izolatlarının CP genlerine göre gerçekleştirmiş olduğu çoklu dizi analizleri sonucunda en fazla benzerliğin % 100'lük oran ile Doğu Akdeniz ve Antalya izolatları arasında olduğu belirtilmiştir. En az benzerlik gösteren izolatların

ise ADA34 ve ADA78 arasında % 99.22 oranında olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak CCDaV'nin genetik çeşitliliği ile ilgili birbirine çok benzer bulgular elde edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan CCDaV-BATEM-M izolatının Çin izolatları ile yapılan çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda ortalama olarak % 99.41 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili Karanfil (2019)'in yaptığı bir diğer çalışmada hem nt hem de aa düzeyinde yapılan çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda Türk CCDaV izolatları ile Çin izolatları arasında ortalama olarak % 99.61 benzerlik görüldüğü bildirilmiştir. Bu bağlamda tez kapsamında elde edilen bulguların daha önce elde edilen sonuçlar ile uyumlu oldukları görülmektedir.

Çalışma kapsamındaki inokülasyon uygulamalarında kullanılan CCDaV-BATEM-M izolatının izole edildiği mandarin ağacındaki biyolojik özellikleri incelendiğinde, virüse özgü tipik belirtiler olan genç yapraklarda V şeklinde girintiler, klorotik alanlar, çizgi şeklinde renk açılmaları ve olgun yapraklarda kırışıklık, buruşukluk, kayık şekli oluşumu gözlenmiştir. Daha önce Mersin ve Adana illerinde turuncgil üretim alanlarında gerçekleştirilen gözlemler sonucunda virüsün limon, mandarin ve portakal ağaçlarının yapraklarında deformasyon, kırışıklık ve buruşukluk oluşturduğu bildirilmiştir (Önelge ve Çınar, 1992). Akdeniz Bölgesi turuncgil üretim alanlarında yapılan başka bir sörvey çalışmasında ise CCDaV'nin yaygınlığını belirlemek amacıyla virüse özgü belirtileri gösteren 50 ağaçtan karışık örnekleme yapılmıştır. Toplanan örneklerin çoğunda hastalığa ait tipik belirtilerin görüldüğü rapor edilmiştir (Bozan ve Önelge, 2018). Karanfil ve Korkmaz (2019)'ın yürütmüş olduğu araştırma kapsamında gerçekleştirilen arazi çalışmalarında CCDaV ile enfekteli örneklerin simptomolojik olarak tanısının çok kolay olduğu ve enfekteli olan tüm turuncgil çeşitlerinde yeni çıkan yapraklarda V şeklinde girinti, yapraklarda kloroz, renk açılması, deformasyon ve yaprak ayasında küçülmeler gözlemlendiği bildirilmiştir. Sanal (2020), Klemantin mandarini x Minneola tanjelo melezi olan 186 adet örnek üzerinde yapmış olduğu arazi gözlemleri sonucunda hastalığa ait bir belirti skalası oluşturarak, bu bitkilerdeki hastalık şiddetini değerlendirmiştir. Buna göre; 50 bitkide ana yaprak boyunca klorofil parçalanması, 40 bitkide klorotik lekelenmeler ve yaprak kıvrılması, 54 bitkinin yapraklarında kıvrılma, buruşukluk, kırışıklık, çarpıklıklar ve 42 bitkinin ise belirti göstermediğini tespit etmiştir. Arazide bulunan bitkilerdeki belirtilerin derecelendirildiği hastalık skalasında kullanılan belirtilerin neredeyse

tamamının bu çalışmada kullanılan izolat tarafından sera koşullarında oluşturulduğu görülmüştür.

Tüm bu sonuçlara bağlı olarak, elde edilen CCDaV-BATEM-M izolatının şu ana kadar ülkemizde ve dünyada rapor edilmiş izolatlardan moleküler ve biyolojik olarak önemli farklılıklar göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle kullanılan izolatın biyolojik ve moleküler özellikleri bakımından Türkiye ve dünyadaki diğer izolatları temsil edebilecek nitelikte olduğundan dolayı tezde yapılan inokulasyon çalışmalarında kullanılması uygun bulunmuştur.

Virüs yoğunluğu enfekte bir canlının kanındaki, vücut sıvısındaki veya dokusundaki virüs miktarını ifade etmektedir. Viral yük genellikle mL sıvı veya mg doku başına düşen virüs partikülü olarak da tanımlanmaktadır. Virüs yoğunluğunun bilinmesi enfeksiyonun şiddeti, nasıl ilerleyeceği ve konukçunun virüse tepkisi hakkında önemli bilgiler vermektedir. Virüs yükü, konukçudan alınan örnek içerisindeki virüs partiküllerinin veya viral DNA/RNA kopya sayılarının hesaplanması ile belirlenebilmektedir (Puren vd., 2010). Virüs yoğunluğunun ölçülmesinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Son yıllarda insan, hayvan ve bitkilerde hastalığa neden olan viral etmenlerin yoğunluklarının belirlenmesinde real-time PCR analiz metodu yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.

İnsanlarda Human immunodeficiency virus (HIV) (Vernazza vd., 1997; Tachet vd., 1999), Influenza A (Ngaosuwankul vd., 2010; Piralla vd., 2013), Covid-19 (Siew vd., 2020), hayvanlarda Swine influenza virus, Rabies virus, Canine distemper virus, Feline herpes virus 1, Bovine respiratory syncytial virus gibi hastalıklara neden olan viral etmenlerin virüs yüklerinin belirlenmesi amacıyla real-time PCR yöntemi kullanılmıştır (Minakshi vd., 2014).

Bitkilerde ise, elmada Apple mosaic virus (ApMV) (Gadiou ve Kundu, 2012), şeftali ve kirazda PPV (Schneider vd., 2004), asmada GLRaV 1 ve 3, GVA, GFLV ve GFkV'nin (Pacifico vd., 2011) virüs tanısı ve kantitasyonu ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Turunçgillerde CTV'nin (Bertolini vd., 2008, Loconsole vd., 2010; Ruiz-Ruiz vd., 2007, 2009b), CPsV'nin (Loconsole vd., 2010), CLBV'nin (Ruiz-Ruiz vd., 2009), CEVd'nin (Ghobakhloo vd., 2019), HSVd'nin (Luigi ve Faggioli, 2013)

yoğunluklarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Virüs yoğunluğunun belirlenmesi bitkide virüs enfeksiyonunun seyri, farklı doku ve organlardaki virüs miktarının tespiti, virüsün bitkideki dağılımının araştırılması ve farklı bitki tür ve çeşitlerinin virüse reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gutierrez-Aguirre vd., 2009).

Turunçgil klorotik cüceleşme virüsünün ülkemizde iç karantinaya tabi hastalık etmenler listesine dahil olmaması nedeniyle, virüse özgü geliştirilmiş bir arındırma yöntemi de bulunmamaktadır. Bu noktada farklı turunçgil türlerinin virüse karşı göstermiş oldukları reaksiyonların bilinmesi önem arz etmektedir. Turunçgillerin çok yıllık bitki olması ve hastalık gelişimine uygun ortamlarda yetiştirilmesinden dolayı hastalıklarının özellikle viral hastalıkların kontrolü oldukça zor olmaktadır. Ayrıca genel olarak bitki virüs hastalıklarına karşı kimyasal bir mücadelenin olmaması, virüse dayanıklı veya tolerant tür ve çeşitlerin kullanılmasını en önemli mücadele yöntemi olarak öne çıkarmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada ticari açıdan önemli turunçgil türlerinin CCDaV'ye karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi amacıyla real-time PCR yöntemiyle virüs yoğunluğu ölçülmüştür.

CCDaV yoğunluğunun belirlenmesi için öncelikle, CP geni çoğaltılarak bir standart oluşturulmuş ve hazırlanan standart içerisindeki kopya sayısı 4.1×10^{13} olarak bulunmuştur. Daha sonra bu standart DNA $4 \times 10^1 - 4 \times 10^8$ kopya/ μ l virüs yoğunluğuna karşılık gelecek şekilde 8 adet seri seyreltilmiş standart oluşturulmuştur. Real-time PCR ile çoğaltım sonrasında yapılan standart eğri analizinde R^2 değerinin 1.00 olduğu ve qPCR ile çoğaltılan DNA miktarı ile standartların başlangıç kopya sayıları arasında % 100 uyum olduğu tespit edilmiştir. Slope değeri ise 3.31 olarak belirlenmiştir. Daha önce turunçgillerde CTV, CPsV ve CLB'V'nin yoğunluklarının ölçülmesi ve hızlı tanınması için multipleks RT-qPCR methodunun geliştirdiği bir çalışmada yapılan standart eğri analizinde elde edilen R^2 değerleri 0.92 ile 0.99 arasında değişmiş olup, slope değeri ise 3.32 olarak belirlenmiştir (Osman vd., 2015). CTV'nin enfekteli bitkilerdeki ve yaprak bitlerindeki virüs yoğunluğunun belirlendiği çalışmada ise, 6 farklı örnekten 1.7×10^2 ile 1.7×10^9 arasında virüs kopya sayısı elde edildiği ve R^2 değerinin de 0.99 olarak bulunduğu belirtilmiştir (Bertolini vd., 2008). PPV'nin kiraz ve şeftali ağaçlarından hızlı teşhisi ve viral RNA yoğunluğunun belirlenmesi üzerine yapılan bir başka araştırmada, 10 farklı seri seyreltme yapılarak hazırlanan standartlar

ile oluşturulan standart eğri analizi sonucunda R^2 değerini 0.99 olarak belirlenmiştir (Schneider vd., 2004). Yapılan karşılaştırmalar sonucunda bu çalışmadaki standartlardan elde edilen R^2 değerinin önceki çalışmalar gibi yüksek olduğu ve istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak oluşturulan standartların, örneklerdeki CCDaV yoğunluğunun kopya sayısı şeklinde mutlak olarak belirlenmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Elde edilen virüs yoğunluklarının da farklı turunçgil türlerinin virüse tepkilerinin belirlenmesinde kullanılmaya oldukça elverişli olduğu belirlenmiştir.

Araştırma kapsamında farklı turunçgil türlerinde CCDaV yoğunluğu, virüs kopya (Sq) ve eşik döngü (Cq) değerlerine göre iki farklı şekilde ve virüs inokülasyonundan 3, 6, 9 ve 12 ay sonlarında qPCR ile belirlenmiştir. Buna göre Cq değerlerinin karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde tüm aylarda en düşük Cq değerleri ile CCDaV'nin en çok çoğaldığı turunçgil türleri limon ve altıntop olurken, en yüksek Cq değerleri ile virüsün en az çoğaldığı turunçgil türü ise üç yapraklı portakal olmuştur. Mandarin, portakal ve turunç türlerinde virüs yoğunlukları birbirine benzer ve orta düzeyde olmuştur. Limon bitkisinde en yüksek virüs yoğunluğu 13.43 Cq değeri ile 6. ayda elde edilmiştir. Üç yapraklı bitkisinde ise inokülasyondan sonra geçen zamana bağlı olarak virüs yoğunluğunun giderek azaldığı gözlenmiştir.

Real time PCR'da eşik döngü (Ct) reaksiyon floresan sinyalinin eşığı geçtiği döngü numarası olarak tanımlanmaktadır. Eşik döngü, örneklerde PCR başlangıcındaki DNA/RNA kopya sayısını hesaplamak için kullanılır ve bu değer Ct ile ters orantılıdır. Standart eğri grafiğindeki y eksenini eşik döngüyü (Ct) ve x eksenini ise başlangıç hedef DNA veya RNA miktarını (Sq) göstermektedir. CCDaV'nin konukçu bitkideki yoğunluğunun belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Ancak farklı virüslerin farklı bitki tür ve çeşitlerinde veya dokulardaki miktarlarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. CTV'nin 4 farklı genotipinin portakal bitkisindeki virüs yoğunluklarının belirlenmesine yönelik analizlerin yapıldığı bir çalışmada, 13.9 Cq değeri ile T30 genotipinin en yüksek virüs yoğunluğuna ulaştığı belirlenmiştir. En düşük virüs yoğunluğunun ise 15.8 Cq değeri ile VT genotipinden elde edildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada R^2 değerinin 0.986 ile 0.999 arasında, slope değerinin ise 3.663 ile 3.054 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Ruiz-Ruiz vd., 2007). Asmada ekonomik kayba yol açan GLRaV-1,

GLRaV-3, GVA, GFLV ve GFkV hastalıklarına neden olan etmenlerin yoğunluklarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada elde edilen Cq değerleri 21.11 ile 35.92 arasında, Sq değerleri ise 1.87×10^3 ile 4.32×10^8 arasında değişmiştir (Pacífico vd., 2011). Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)'ünün domates ve kabak bitkilerindeki yoğunluklarını belirlemek amacıyla farklı metotların denendiği bir çalışmada, virüsü en hassas ve spesifik olarak teşhis eden metodun TaqMan qPCR olduğu ve 9.51×10^1 DNA kopya sayısı ile kabak bitkisinde, 7.8×10^2 DNA kopya sayısı ile de domates bitkisinde çoğaldığı bildirilmiştir (Simon ve Ruiz, 2018). Domateste yapılan başka bir çalışmada Tomato torrado virus (ToTV)'üne ait farklı ülkelerden elde edilen 23 farklı örnekte virüs yoğunluklarına bakılmıştır. Buna göre örneklerde Ct değerlerinin 17.38 ± 0.26 ile 32.34 ± 2.92 arasında, Sq değerlerinin ise $1.31 \times 10^7 \pm 1.14 \times 10^6$ ile $6.85 \times 10^3 \pm 3.12 \times 10^3$ arasında değiştiği belirtilmiştir (Herrera-Varquez vd., 2015).

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında limon, portakal, mandarin, altıntop, turunç ve üç yapraklı portakal turunçgil türlerinin CCDaV'ye karşı dayanıklılıkları açısından karşılaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre virüse en duyarlı çeşitlimon, en dayanıklı çeşitlim ise üç yapraklı portakal olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Ruiz-Ruiz (2007)'in yaptığı bir çalışmada portakal, turunç, greylort, Meksika laymı ve Alemow gibi farklı turunçgil çeşit ve dokularındaki CTV miktarının ve yoğunluğunun qRT-PCR ile ölçümü yapılmıştır. Buna göre farklı turunçgil türlerinden elde edilen Cq değerlerinin 18.80 ile 21.20 arasında, Sq değerlerine göre virüs kopya sayılarının ise $1.62 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^3$ arasında değiştiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda CTV'ye karşı en duyarlı çeşitlim Meksika laymı, en dayanıklı çeşitlim ise turunç olduğu belirlenmiştir. Ayrıca virüs yoğunluğunun kabuk ve meyve dokularında daha fazla, yaprak ve kök dokularında ise daha az olduğunu belirtilmiştir. Bertolini (2008)'nin farklı ülkelerden getirilen CTV izolatlarını içeren örneklerde virüs yoğunluklarını belirlemek amacıyla ELISA, (IC)-RT-nested-PCR ve qRT-PCR analizlerinin hassasiyetlerinin de karşılaştırıldığı çalışma sonucunda qRT-PCR'ın virüs yoğunluğunun belirlenmesinde diğer yöntemlerden açık ara daha hassas olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın qRT-PCR analizlerinde en düşük Ct değerine sahip olan Pineapple portakalda en çok virüs yoğunluğunun, buna karşın en yüksek Ct değerleri gösteren Washington Navel portakalında ise virüs yoğunluğunun en az olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışma kapsamında CTV ile enfekteli mandarin bitkisinde en çok

virüs yoğunluğu genç ve yaşlı yapraklardan elde edilirken, en düşük virüs yoğunluğunun ise meyve sapı ve genç sürgünlerden elde edildiği bildirilmiştir. Ghobakhloo (2019)'nun yapmış olduğu çalışmada ise CEVd'ye karşı tolerant ve hassas olduğu bilinen turunç ve Troyer sitranjı türlerindeki viroid yoğunluklarına bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar 10^1 ile 10^8 kopya/mg aralığındaki enfekteli kabuk dokusundaki viroid kopya sayısının tespit edilebildiğini ve Troyer sitranjındaki viroid yoğunluğunun turunç bitkisindekine göre çok daha fazla olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca virüs inokülasyonundan 3, 6, 10, 13 ve 16 hafta sonra yapılan RT-qPCR analizlerinde ise her iki türde de en başarılı sonuçların 16. hafta sonrasında alındığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise virüs yoğunluğu 12 ay süreyle her üç ayda bir ölçülmüş ve tespiti yapılmıştır. Bundan sonra yapılacak yoğunluk belirleme çalışmalarının enfeksiyondan sonra birer veya ikişer hafta aralıklarla yapılarak, ilk üç ayda enfeksiyon seyrinin incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Bitkiler doğada maruz kaldıkları biyotik stres faktörlerine karşı tepki vererek, bu streslere uyum sağlamak için çeşitli mekanizmalar kullanmaktadır. Bitkiler kendileri için tehlike arz eden mikroorganizmalardan kaçınma ve onları yok etme mekanizmasına sahip olmamakla birlikte, patojenlere karşı savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bunlar içerisinde dayanıklılık (R) genleri bitki savunma mekanizmalarının önemli temel taşlarından birini oluşturmaktadır. Bitki-patojen etkileşimleri temelde gen-için-gen teorisi olarak da adlandırılan konukçudaki her bir dayanıklılık (R) genine karşılık patojende bir avirülenslik (avr) geninin bulunması olarak da açıklanabilmektedir. Direnç genleri, bitki genomlarında yer alan ve R proteinleri üreterek patojenlere karşı bitkide hastalık dayanıklılığını uyarılmaktadır. Günümüzde bitkilerde farklı virüs, bakteri, fungus ve nematodlara karşı dayanıklılık sağlayan 60'tan fazla R geni belirlenerek karakterizasyonu yapılmıştır. Arabidopsis genomunda 1356, domateste 465 ve asmada 253 adet R geni olduğu (Sanseverino vd. 2010) ancak, henüz karakterizasyonu yapılmamış ve hangi patojenle ilişkili olduğu bilinmeyen çok fazla sayıda R geni vardır. Turunçgillerin model türü olarak belirlenen ve tüm genom dizilimi Xu ve arkadaşları tarafından 2013 yılında tamamlanmış olan portakal bitkisinde ise 249 adet potansiyel R geni olduğu belirtilmiştir.

Bazı R genlerinin hangi patojene karşı dayanıklılık sağladıkları ve dayanıklılığın etki mekanizmaları bilinmemektedir. Model bitki Arabidopsis'te CMV'ye karşı dayanıklılık

sağlayan RCY1 geni, Turnip crinkle virus (TCV)'ye karşı dayanıklılık sağlayan HRT geni, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı dayanıklılık RPS2 geni bu dayanıklılık genlerindedir (Gururani vd., 2012). Ayrıca tarımsal üretim açısından önemli bitkilerden domates en fazla R geni karakterizasyonu yapılan bitkidir. Domateste Sw5, Tm-2, Tm-2², I-2 R genleri sırasıyla TSWV, TMV, ToMV, *Fusarium oxysporum*'a karşı dayanıklılık sağlayan bilinen R genleri arasında yer almaktadır. Bunun yanında bazı bitkilerde karakterizasyonu yapılmış ve bir patojen ile etkileşimi bilinen çok az sayıda R geni bulunmaktadır. Bunlar arasında patateste PVX'e karşı dayanıklılık sağlayan Rx1 ve Rx2 genleri, PVY'ye karşı ise dayanıklılıktan sorumlu Y-1 geni ve tütünde TMV'ye karşı dayanıklılık sağlayan ve ilk belirlenen R geni olan N geni bulunmaktadır. Turunçgillerin model türü olarak tüm genom dizilimi tamamlanan portakal genomunda 250'ye yakın R geni ve benzeri olmasına (Plant resistance gene wiki, 2014) rağmen bunlardan hiçbiri herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. Turunçgillerde sadece üç yapraklı portakalda CTV'ye karşı dayanıklılık sağlayan Ctv geninin R geni olduğu belirlenmiştir (Dalio vd., 2017). Buna karşın turunçgil genomunda da henüz bir patojen ile eşleştirilmemiş ve etki mekanizması ortaya konmamış çok sayıda R dayanıklılık geni olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında turunçgillerde gelecek için potansiyel bir tehlike oluşturan CCDaV ile ilişkili olabilecek R genlerinin gen ekspresyonu yoluyla tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu portakal genomunda tespit edilen 249 adet R geni ve benzerlerinden farklı grupları temsil eden 15 adet gen seçilerek CCDaV enfeksiyonu sırasında duyarlı ve dayanıklı turunçgil türlerinde gen ekspresyonu incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda CNL, T-2, TNL, RLK-1, RLK-2, RLP-3, RLP-5 ve Unknown 6 R genlerinin ekspresyonunun CCDaV'ye karşı dayanıklı üç yapraklı portakal bitkisinde, duyarlı limon bitkisine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Karşılaştırmalı ekspresyon analizleri sonucunda seçilen 15 R geninden CN, T-2, RLK-1, RLK-2, RLP-3, RLP-5 ve Unknown 6 genlerinin yüksek düzeyde uyarılmış olması, bu genlerin CCDaV'ye karşı dayanıklılıkta rol aldığını göstermiştir.

CNL grubu R genleri hem monokotil hem de dikotil bitkilerde bulunmaktadır. CNL genlerinin çeşitliliği bitki türüne göre değişmekte olup, çok sayıda NBS-LRR proteinleri içermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar Arabidopsis'te 150, yoncada 177, papayada 6, patateste 370, pirinçte 400, asmada 500'den fazla ve soya

fasulyesinde 188 tane CNL geni olduğunu göstermiştir (Ghelder ve Esmenjaud, 2016). Nematoda karşı dayanımı olduğu bilinen domates bitkisine uygulanan nematod inokülasyonundan sonraki 18. günde Mi-1.1 geninin, 4. günde ise Mi-1.2 geninin ekspresyonunun maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Nematod inokülasyonu yapılmadan önce bitkide yapılan analizlerde ise her iki genin ekspresyonunun da çok düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Lavrova vd., 2016). Arabidopsis'te *Hyaloperonospora arabidopsidis* fungal patojeni ile ilgili yapılan bir çalışmada, fungus inokülasyonundan 21 gün sonra bitki yapraklarından yapılan analizde RPP8 geninin yüksek ekspresyonu elde edilirken, köklerden alınan dokularda aynı genin ekspresyonunun ölçülecek düzeyin altında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada 2 adet CNL geninin ekspresyonu incelenmiş ve bunlardan bir tanesinin ekspresyonunun CCDaV enfeksiyonuna karşı üç yapraklı portakalda uyarıldığı belirlenmiştir. CNL geninin ekspresyonunun duyarlı bitkide düşük, dayanıklı bitkide yüksek olması bu gen grubunun CCDaV'nin dayanıklılığıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Plasma membran proteinleri arasında yer alan Receptor-Like Kinase (RLK)'ların, çeşitli çevresel ipuçlarına karşı çeşitli hücre sel cevaplarda, hormonal sinyallerde ve stres algısında rol aldıkları bilinmektedir. Arabidopsis'te 600'den, pirinçte 1000'den fazla gene sahip olan büyük bir protein ailesini oluşturmaktadır. Limon bitkisinde yapılan bir çalışmada küf hastalığına neden olan *Capnodium citri* inokülasyonundan sonra 12, 24, 48 ve 72 saat sonra yapılan real-time PCR analizlerinde P5 geninin ekspresyonunun 72. saat sonrasında maksimum seviyeye ulaştığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, bitkiden izole edilen P5 geni için yapılan karakterizasyon çalışmaları sonrasında genin, RLK grubu R genleri ile %83 oranında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar P5 geninin limon bitkisinde sadece *Capnodium. citri* enfeksiyonu sırasında aktive olduğunu bildirmişlerdir (Felice ve Wilson, 2010). Bu çalışmada toplam 20 adet RLK grubu R geninden 4 tanesinin ekspresyonu incelenmiş, bunlardan 2 tanesinin ekspresyonunun CCDaV enfeksiyonuna karşı üç yapraklı portakalda uyarıldığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak bu tez çalışmasında da RLK gen ekspresyonunun duyarlı bitkide düşük, dayanıklı bitkide yüksek olması, bu gen grubunun CCDaV'nin dayanıklılığıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

RLP (receptor-like protein)'ler tüm yüksek bitkilerde bulunan büyük protein ailelerini oluşturmaktadır. Hücre içerisindeki DNA onarımı, rekombinasyon, transkripsiyon, RNA işlenmesi, hastalık dayanımı ve bağışık yanıt gibi işlevlere sahip olduğu, ayrıca çeşitli patojenleri tespit eden immünoresptörler gibi görev yaptıkları bilinmektedir (Dalio vd., 2017). Mandarinde yapılan bir çalışmada *Xylella fastidiosa* ile enfeksiyonundan 24 saat sonra 33 genin ekspresyonunda değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerden 9 tanesinin ekspresyonunun enfekteli bitkilerde kontrol bitkilerine göre azaldığı, 24 tanesinin ekspresyonunun ise arttığı belirlenmiştir (Rodrigues vd., 2013). Bu tez çalışmasında toplam 57 adet RLP grubu R geninden 2 tanesinin üç yapraklı portakalda uyarıldığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak RLP3 ve RLP5 genlerinin duyarlı bitkideki ekspresyonu düşük olurken dayanıklı bitkilerde artmış olması, bu R gen grubunun CCDaV dayanıklılığıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir..

TNL grubu genleri tek çenekli bitkilerde daha yaygın olduğu, Arabidopsis, patates, erik ve keten gibi bitkilerden izole edilip karakterizasyonu yapılmış TNL R genleri bulunduğu bilinmektedir. TNL genleri virüsler (TMV/N), bakteriler (*Pseudomonas syringae*/RPS4), funguslar (*Melampsora lini*/L6) ve nematodlar (*Globodera rostochiensis*/Grol1-4, *Meloidogyne spp.*/Ma) gibi patojenlere karşı bazı dayanıklılık genlerini içermektedir. Şeftalide *Meloidogyne spp.*'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan TNL genleriyle ilgili yapılan çalışmada 15 adet bitkiye karışık nematod inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyondan 3 hafta sonra 10 adet bitkide gal oluşumu gözlenirken, 5 adet bitkide belirti gözlenmemiştir. Yapılan RNA izolasyonu ve Northern-blot hibridizasyonu sonucunda saçak köklerde gal oluşumu olan bitkilerde TNL-1 geni elde edilememiştir. Gal oluşturmamış ve kontrol bitkilerinde ise yüksek seviyede TNL-1, TNL-2 gen ekspresyonu belirlenmiştir (Claverie vd., 2011). Bu tez çalışmasında bir adet TNL grubu R geninin üç yapraklı portakalda uyarıldığı belirlenmiştir. TNL geniyle ilgili daha önce yapılan çalışmalarda duyarlı bitkilerdeki ekspresyonun düşük, dayanıklı bitkideki ekspresyonun ise yüksek düzeyde elde edilmiş olması, bu çalışma sonucunda yüksek seviyede elde edilen TNL geninin CCDaV'ye karşı dayanıklılıkta ilişkili olabileceğini desteklemiştir. Turunçgillerde daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da viral etmenle ilişkili TNL grubu bir R geni belirlenmiştir.

Unknown grubunda dayanıklılıkla ilişkisi olabilecek ancak herhangi bir alt gruba dahil edilmemiş genler bulunmaktadır. Plant Resistance Gene Wiki veri tabanındaki *Citrus sinensis*'e ait R genleri içinde yer alan Unknown grubu genler incelendiğinde, Fortune cinsi mandarin bitkisinde *Alternaria alternaria* f.sp. *citri*'ye karşı dayanıklılıkta etkili olabilecek aday genlerin SNP markerleri ile analizleri yapılmıştır. Araştırmada öncelikle genç yaprakların üst ve alt yüzeylerine hazırlanan bakteri süspansiyonu ile inokülasyon yapılmıştır. Kontrol bitkilerin distile steril su püskürtülmüştür. Hastalığa duyarlı olan bitkilerde inokülasyondan iki gün sonra yaprak belirtileri gözlenirken, dayanıklı olan bitkilerde ise hiçbir simptom oluşmamıştır. Çalışmada 24 adet Unknown grubu gen için 9 adet SNP markeri kullanılarak MAS yapılmış ve 9 adet genin patojene karşı dayanıklılıkta etkili olabileceği bildirilmiştir (Cuenca vd., 2016). Bu tez çalışmasında toplam 148 adet Unknown grubu R geninden 5 tanesinin ekspresyonu incelenmiş ve bunlardan iki tanesinin üç yapraklı portakalda uyarıldığı ve bu genlerin CCDaV dayanıklılığıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda bakteriyel patojenle ilgili Unknown grubu genler belirlenirken, bu çalışmada bir viral etmenle ilişkili R geni belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasının birinci kısmında CCDaV-BATEM-M izolatının moleküler karakterizasyonu, CP genine göre hem ülkemiz hem de dünya izolatları ile aa ve nt düzeyinde çoklu dizi analizleri ve filogenetik ilişkileri incelenmiştir. İkinci kısımda ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen turunçgil türlerin CCDV'ye dayanıklılık ve duyarlılık durumları ortaya konulmuştur. Virüs yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan real-time PCR analizleri sonucunda CCDaV'ye en duyarlı turunçgil türü limon, en dayanıklı turunçgil türü ise üç yapraklı portakal olarak tespit edilmiştir. Üçüncü kısımda ise limon ve üç yapraklı portakal bitkilerinde CCDaV'ye karşı dayanıklılıkta ve toleransta etkili olabileceği düşünülen 15 adet R dayanıklılık geninin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Her bir gen için yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda 15 adet genin 7 tanesi üç yapraklı portakal bitkisinde yüksek ekspresyon vererek, CCDaV dayanıklılığı ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda ümitvar bulunan R genleri ile birlikte yeni R genlerinin de dahil edildiği araştırmaların yapılması, etmenin kontrolüne ve yayılmasına karşı alınacak önlemler açısından önem arz etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında limon, mandarin, portakal, altıntop, üç yapraklı portakal ve turunç

türlerini temsil edecek şekilde belirlenen çeşitlerle çalışılmıştır. Daha fazla sayıda turunçgil tür, çeşit ve turunçgil akrabalarının da dahil olduğu çalışmaların yapılmasının, CCDaV dayanıklılık mekanizmasının daha net ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, CCDaV konsantrasyon analizlerine virüs inokülasyonundan 3 hafta sonra yeni sürgün oluşumu ile başlanıp ayda bir yapılacak analizlerle virüse ait enfeksiyon mekanizması hakkında daha çok bilgi sahibi olunması mümkün görülmektedir. Ayrıca hastalığın bulaşık fidan ve aşı gözleri ile hızlı bir şekilde yayılma potansiyelinden dolayı, ülkesel çapta iç karantina önlemlerine ağırlık verilmesi ve etmenle ilgili sertifikasyon programlarının uygulanması gerekmektedir. CCDaV'nin vektörü olan *Parabemisia myricae* ile ilgili moleküler analizlere ve etmenin turunçgiller dışında kalan olası konukçularına yönelik detaylı çalışma yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Baker, R., Caffier, D., Choiseul, J.W., Clercq, P.D., Dormannsné-Simon, E., Gerowitt, B., Karadjova, O.E., Lövei, G., Lansink, A.O., Makowski, D., Manceau, C., Manici, L., Perdakis, D., Puglia, A.P., Schans, J., Schrader, G., Steffek, R., Strömberg, A., Tiilikkala, K., Van Lenteren, J.C. & Vloutoglou, I. (2008). Pest Risk Assessment Made by France on Citrus chlorotic dwarf virus Considered by France as Harmful in the French Overseas Departments of French Guiana, Guadeloupe, Martinique and Reunion. *The EFSA Journal*, 684, 1-17.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., de Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M. (2008). Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathology*, 120, 177–188.
- Bozan, O. & Önelge, N. (2018). Adana, Mersin ve Hatay İllerinde Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) Hastalığının Yaygınlığı. *Çukurova Tarım Gıda Bil. Der.*, 33(1), 57-62.
- Claverie, M., Dirlewanger, E., Bosselut, N., Van Ghelder, C., Voisin, R., Kleinhentz, M., Lafargue, B., Abad, P., Rosso, M.N. & Chalhoub, B. (2011). The *Ma* gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiology*, 156, 779-792.
- Cuenca, J., Aleza, P., Garcia-Lor, A., Ollitrault, P. & Navarro, L. (2016). Fine Mapping for Identification of Citrus Alteria Brown Spot Candidate Resistance Genes and Development of New SNP Markers for Marker-Assisted Selection. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1948.
- Çandar, A. & Erkan, S. (2011). Bitkilerde viral etmenlere karşı genetik dayanıklılık mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 3, 13-27.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N. & Korkmaz, S. (1993). Citrus Virus and Virus-Like Diseases in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Proc. Conf. IOCV*, 12, 377-400.
- Dalio, R.J.D., Magalhaes, D.M., Rodrigues, C.M., Arena, G.D., Oliveria, T.S., Souza-Neto, R.R., Picchi, C., Martins, P.M.M., Santos, P.J.C., Maximo, H.J., Pacheco, I.S., De Souza, A.A. & Machado, M.A. (2017). PAMPS, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. *Annals of Botany*, 119, 749-774.
- Decroocq, V., Foulongne, M., Gall, O.L, Mantin, C., Pascal, T., Schurdi-Levraud, V. & Kervella, J. (2005). Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genet. Genomics*, 272(6), 680-689.
- FAO (2017). <https://www.fao.org/statistics/en/>. (Son erişim tarihi: 02.10.2019)

- Felice, B.D. & Wilson, R.R. (2010). Molecular characterization of a novel pathogen-responsive receptor kinase-like in *Citrus limon*. *Tree Genetics & Genomes*, 6, 47-56.
- Gadiou, S. & Kundu, J.K. (2012). Evaluation of Reference Genes for the Relative Quantification of Apple stem grooving virus and Apple mosaic virus in Apple Trees. *Indian J. Virology*, 23(1), 39–41. doi: 10.1007/s13337-012-0065-4.
- Ganesh, T., Rajes, T., Banerje, A. & Rymba, H. (2018). One Step RT-PCR Method for Quick and Reliable Detection of Citrus tristeza virus (CTV) in Mid-Hills of Meghalaya, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7(5), 1296-1300.
- Ghelder, C.V. & Esmenjaud, D. (2016). TNL genes in peach: insights into the post-LRR domain. *BMC Genomics*, 17, 317.
- Ghobakhloo, M., Dizadji, A. & Yanchi, A. (2019). A real-time PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus exocortis viroid in two sensitive and tolerant rootstocks. *Crop protection*, 115, 27-30.
- Gök, M. (2010). *Turunçgil Sarı Damar Açılması (TSDA) ve Turunçgil Klorotik Cüceleşme (TKC) Hastalıklarının Otsu Konukçulara Mekanik Olarak Taşınma Çalışmaları*. (Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Guo, J., Lai, X.P., Li, J.X., Yue, J.Q., Zhang, S.Y., Li, Y.Y., Gao, J.Y., Wang, Z.R., Duan, H.F. & Yang, J.D. (2015). First Report on Citrus chlorotic dwarf associated virus on Lemon in Dehong Prefecture, Yunnan, China. *Plant Disease*, 99, 1287.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. & Park, S.W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51-65.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delic, D., Gruden, K., Mumford, R. & Ravnkar, M. (2009). Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 162, 46-55.
- Herrera-Vásquez, J.A., Rubio, L., Alfaro-Fernández, A., Debreczeni, D.E., Font-San-Amrosio, I., Falk, B.W. & Ferriol, I. (2015). Detection and absolute quantitation of Tomato torrado virus (ToTV) by real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 221, 90-94.
- Jones, J.D. (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Elsevier Science*, 4, 281-287.
- Karahocagil, P., Tunalıoğlu, R. & Anaç, H. (2003). *Turunçgiller Durum ve Tahmin: 2003/2004*. TEAE Yayınları, Ankara, 80.

- Karanfil, A. & Korkmaz, S. (2018). Genetic diversity of Turkish Citrus chlorotic dwarf-associated virus isolates based on coat protein gene. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 6403-6407.
- Karanfil, A. & Korkmaz, S. (2019). Geographic distribution and molecular characterization of Turkish isolates of the Chlorotic dwarf-associated virus. *Journal of Plant Pathology*, 101, 621-628.
- Kokkinos, C.D. & Clark, C.A. (2006). Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses. *Plant Disease*, 90(6), 783-788.
- Korkmaz, S. & Garnsey, S.M. (2000). *Chlorotic dwarf*. In: Timmer, P., Garnsey, S.M ve Graham, T., Eds. Compendium of citrus diseases (2nd Ed.) APS Press, Minnesota. 55-56.
- Korkmaz, S. (1997). *Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerinde Vektörle Taşınan Virüs Benzeri Bir Hastalığın Taşınması, Yayılması, Duyarlı Tür ve Çeşitlerin Belirlenmesi ve Tanısı Üzerine Araştırmalar*. (Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Korkmaz, S., Çınar, A., Bozan, O. & Kersting, U. (1994a). Distribution and Natural Transmission of A New Whitefly-Borne Virus Disease of Citrus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Proceedings of the Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, 9, 437-439.
- Korkmaz, S., Çınar, A., Önelge, N. & Kersting, U. (1994b). Doğu Akdeniz Bölgesinde Turunçgil Fidan İşletmelerinde Bir Sörvey Çalışması. *Ç.Ü. Zir. Fak. Der.*, 9(4), 13-24.
- Korkmaz, S., Çınar, A., Kersting, U. & Garnsey, S.M. (1995). Citrus chlorotic dwarf: A New Whitefly- Transmitted Virus Like Disease of Citrus in Turkey. *Plant Disease*, 79, 1074.
- Korkmaz, S., Kersting, U., Ertuğrul, B. & Çınar, A. (1996). Transmission and Epidemiology of citrus chlorotic (CCD) disease in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. *J. Turk. Phytopath.*, 25(1-2), 71-76.
- Lavrova, V.V., Udalova, Z.V., Matveeva, E.M., Khasanov, F.K. & Zinovieva, S.V. (2016). Mi-1 Gene Expression in Tomato Plants under Root-Knot Nematode Invasion and Treatment with Salicylic Acid. *Doclady Biochemistry and Biophysics*, 471, 413-416.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. & Kinard, G., (2008). A Reliable and Inexpensive Method of Nucleic Acid Extraction for the PCR-Based Detection of Diverse Plant Pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.

- Loconsole G., Saldarelli P., Doddapaneni H., Savino V. & Giovanni P.M. (2012a). Identification of A Single-Stranded DNA Virus associated with Citrus Chlorotic Dwarf Disease, A New Member in the Family Geminiviridae. *Virology*, 432, 162-172.
- Loconsole, G., Saponari, M. & Savino, V. (2010). Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *Eur. J. Plant Pathology*, 128, 251–259.
- Luigi, M. & Faggioli, F. (2013). Development of a quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) for the detection of hop stunt viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2), 231-235. doi: 10.1007/s10658-013-0243-2.
- Minakshi, P., Ranjan, K., Brar, B., Ambawat, S., Shafiq, M., Alisha, A., Kumar, P., Ganesharao, J.V., Jakhar, S., Balodi, S., Singh, A. & Prasad, G. (2014). New Approaches for Diagnosis of Viral Diseases in Animals. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 55-63.
- Ngaosuwanukul, N., Noisumdaeng, P., Komolsiri, P., Pooruk, P., Chokeyhaibulkit, K. & Chotpitayasunondh, T. (2010). Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virol J.*, 7(75), 65-68. doi: 10.1186/1743-422X-7-75.
- Osman, F., Hodzic, E., Kwon, S.J., Wang, J. & Vidalakis, G. (2015). Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of *Citrus tristeza virus*, *Citrus psorosis virus* and *Citrus leaf blotch virus*. *Journal of Virological Methods*, 220, 64-75.
- Önelge, N. & Çınar, A. (1992). Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerinde Crinkle Leaf (Buruşuk Yapraklılık) Virüs Hastalığı. *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(4), 43-50.
- Pacifico, D., Caciagli, P., Palmano, S., Mannini, F. & Marzachi, C. (2011). Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. ‘Nebbiolo’ by real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods*, 172(2), 1-7.
- Piralla, A., Dalenob, C., Parianic, E., Conaldid, P., Espositob, S., Zanettic, A. & Baldantia, F. (2013). Virtual quantification of influenza A virus load by real-time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology*, 56, 65– 68.
- Plant Resistance Genes Wiki (2014). http://prgdb.crg.eu/wiki/Main_Page (Son erişim tarihi: 10.10.2015)
- Puren, A., Gerlach, J.L., Weigl, B.H., Kelso, D.M. & Domingo, G.J. (2010). Laboratory operations, specimen processing and handling for viral load testing and surveillance. *The Journal of Infectious Diseases*, 201, 27-36.

- Rodrigues, C.M., Souza, A.A., Takita, M.A., Kishi, L.T. & Machado, M.A., (2013). RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defence response. *BMC Genomic*, 14, 676.
- Roistacher, C.N. (1991). *Graft-Transmissible Diseases of Citrus: Handbook for Detection and Diagnosis*. Food & Agriculture Organization of the United Nations, 286.
- Ruiz-Ruiz, S., Ambrós, S., Vives, M.D.C., Navarro, L., Moreno, P. & Guerri, J. (2009a). Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 160, 57–62.
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J. & Ambrós, S. (2007). A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Methods*, 145, 96–105.
- Sanal, D. (2020). *Klemantin Mandarinini X Minneola Tanjelo Melez Popülasyonunda Turunçgil Klorotik Cüceleşme Hastalığı İle İlişkili Qtl Bölgelerinin Belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Sanseverino, W., Roma, G., De Simone, M., Faino, L., Melito, S., Stupka, E., Frusciante, L. & Ercolano, M.R. (2010). PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Pub. Med*, 38, 814-21.
- Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. & Frederick, R.D. (2004). Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods*, 120, 97–105.
- Siew, E.D. & Birkelo, B.C. (2020). Covid-19-Associated acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(10), 1383-1385.
- Simon, A. & Ruiz, L. (2018). Absolute quantification of Tomato leaf curl New Delhi virus Spain strain ToLCNDV-ES: Virus accumulation in a host-specific manner. *Plant Disease*, 102, 165-171.
- Tachet, A., Dulioust, E., Salmon, D., De Almeida, M., Rivalland, S., Finkielsztejn, L., Heard, I., Jouannet, P., Sicard, D. & Rouzioux, C. (1999). Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS*, 13, 823–831.
- TÜİK (2017). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas>. (Son erişim tarihi: 02.10.2019)
- Vernazza, P.L., Gilliam, B.L. & Dyer, J. (1997). Quantification of HIV in semen: correlation with antiviral treatment and immune status. *AIDS*, 11, 987–993.

Xu, Q., Chen, L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W., Hao, B., Lyon, M., Chen, J., Gao, S., Xing, F., Lan, H., Chang, J., Ge, X., Lei, Y., Hu, X., Miao, Y., Wang, L., Xiao, S., Biswas, M., Zeng, W., Guo1, F., Cao1, H., Yang, X., Xu, X., Cheng, Y., Xu1, Y., Liu, J., Luo, O., Tang, Z., Guo, W., Kuang, H., Zhang, H., Roose, M., Nagarajan, N., Deng, X. & Ruan, Y. (2012). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*, 59-66.

Zhou, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Chen, H., Li, T. & Zhou, C. (2017). Distribution and Molecular Characterization of Citrus chlorotic dwarf-associated virus in China. *Australasian Plant Pathology*, 46, 227-229.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bengi TOPKAYA
Doğum Yeri ve Yılı : Elazığ, 1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : topkayabengi@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Yavuz Selim Lisesi, 2002
Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 2008
Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma A.B.D, 2011

Mesleki Deneyim

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü 2011-... (halen)

Yayınlar

- Çelik, N. & Topkaya Kütük, B. (2016). *The Presence Of Sharka Disease in Antalya-Turkey*. III. International Symposium on Plum pox virus, 09-13 May 2016, Antalya.
- Şahin-Çevik, M., Çevik, B., Topkaya-Kütük, B. & Yazıcı, K. (2017). Identification of drought-induced genes from the leaves of Rangpour Lime (Citrus limon (L) Osbeck). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 92(6).
- Topkaya Kütük, B. & Çevik, B. (2011). *Antalya İli Turunçgil Alanlarında Psorosis Virüsü'nün Belirlenmesi, Biyolojik ve Moleküler Karakterizasyonu*. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş.
- Topkaya Kütük, B., Çevik, B., Çelik, N., Polat, İ., Kurt, Ş. & Turgutoğlu, E. (2015). *Turunçgillerde Sorun Olan Bazı Virüs ve Viroid Hastalık Etmenlerinin Multiplik RT-PCR ile Belirlenmesi*, VII. Bahçe Bitkileri Kongresi, Çanakkale.
- Topkaya, B., Turgutoglu, E. & Cevik, B. (2018). *Replication of Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) in Lemon and Grapefruit*. International Horticultural Congress, 12-16 August 2018, Istanbul, Turkey.

Topkaya, B., Turgutoglu, E. & Cevik, B. (2019). *Quantification of Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) in Sweet Orange and Mandarin*. International Molecular Plant Protection Congress, 10-13 April 2019, Adana, Turkey.

Topkaya-Kütük, B. & Çevik, B. (2016). *Development of A Sensitive Nested-RT-PCR Method For Detection Of Citrus Psorosis Virus*, 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium, 6-10 June 2016, Avignon, France.

