

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazan BAYER

**TURUNÇGİL SARI DAMAR HASTALIĞINA KARŞI SÜRGÜN UCU
AŞILAMA YÖNTEMİYLE TEMİZ BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

ADANA, 2008

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TURUNÇGİL SARI DAMAR AÇILMASI HASTALIĞINA KARŞI SÜRGÜN
UCU AŞILAMA YÖNTEMİYLE TEMİZ BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

Nazan BAYER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez, 22/12/2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE	Doç. Dr. Yeşim Y. MENDİ	Yard. Doç. Dr. M. A. KAMBEROĞLU
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür**

**Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: ZP 2006 YL 82**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TURUNÇGİL SARI DAMAR AÇILMASI HASTALIĞINA KARŞI SÜRGÜN UCU AŞILAMA YÖNTEMİYLE TEMİZ BİTKİ ELDE EDİLMESİ

Nazan BAYER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Yıl : 2008, Sayfa: 40

Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Doç. Dr. Yeşim Y. MENDİ

Yard. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan Turunçgil Sarı Damar Açılması hastalığı (*Citrus Yellow Vein Clearing* (CYVC)) ile infekteli Kütdiken limon (*Citrus limon*) ağaçlarından alınan sürgün uçlarına *in vitro* Sürgün Ucu Aşılama (SUA) uygulanmış ve patojenden arındırılma oranları tespit edilmiştir. SUA işlemleri öncesinde ve sonrasında biyolojik indeksleme yapılarak simptomlar turunç (*C. aurantium*) indikatör bitkilerinde gözlemlenmiştir. Bu simptomlar sarı damar açılmaları, kıvrılma ve bükülme şeklinde oluşan yaprak deformasyonları ve boğum aralarında kısılmalardır. SUA işlemleri İlkbahar ve Sonbahar dönemlerinde alınan 2 ve 4 yaprak içeren meristem kullanılarak yapılmış ve her biri Carrizo citrange (*C. sinensis x Poncirus trifoliata*) anaçlarına aşılanmıştır. *In vitro* gelişen bitkilerin turunç bitkisine indekslenmesi sonucunda Sonbahar döneminde elde edilen sağlıklı bitki oranı % 57, İlkbaharda ise % 45 olarak saptanmıştır. SUA çalışmalarında kullanılan 2 yaprakçıklı meristemden % 62 oranında, 4 yaprakçıklı meristemden % 40 oranında sağlıklı bitki elde edilmiştir. SUA çalışmalarında patojenden ari bitki elde etme oranı % 50 olarak saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: CYVC, Sürgün Ucu Aşılma, Kütdiken limon

ABSTRACT

MSc THESIS

OBTAINING PATHOGEN-FREE PLANT CONTRARY TO CITRUS YELLOW VEIN CLEARING BY SHOOT TIP GRAFTING TECHNIQUE

Nazan BAYER

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Year : 2008, Pages: 40

Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Assoc. Prof. Dr. Yeşim Y. MENDİ

Assist. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

In this study, Shoot Tip Grafting technique (STG) has been applied for shoot tips, are collected from Citrus Yellow Vein Clearing (CYVC) infected Kutdiken lemon (*Citrus lemon*) trees at University of Cukurova Search and Practise Plantation Citrus Collection Poots and elemination percentage are determineted. The symptomatic expression were observed on sour orange (*Citrus aurantium*) by biological indexing both pre STG and post STG tecnique. These symptoms were yellow vein clearing and deformation on leaves as curling or distorting, shortening the nodal gap. STG technique was made by using size as the meristem that contained 2 and 4 leaves taken at the spring and autumn times and each on the shoot tips were grafted Carrizo citrange (*C. sinensis x Poncirus trifoliata*) seedlings. The healthy plant percentage, are obtained after grafting consequently were 57 %, 45 %, both Autumn and Spring seasons. The healthy plant percentage, are obtained after grafting consequently were 62 % and 40 % meristem that contained 2 leaves and 4 leaves Finaly as a result in STG studies, percentage of pathogen-free plant observation was 50 %.

Key Words: CYVC, Shoot Tip Grafting, Kutdiken lemon

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunu belirleyen ve çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen sayın Hocam Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezime yardım ve katkılarından dolayı Uzman Dr. Orhan BOZAN'a Araştırma Görevlisi Gökmen KOÇ'a Ziraat Yüksek Mühendisi Tamer TAŐ'a, Doktora öğrencisi Esra UYANIK'a, Yüksek Lisans öğrencileri Yüşra BULDU, Medine GÖK'e ve destekleri için aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL METOD	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aday Ağaçlar	15
3.1.2. İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan İndikatör Bitki	15
3.1.3. İn vitro SUA' da Kullanılan Anaçlar	15
3.1.4. İn vitro SUA Sonrası Elde Edilen Bitkilerin Aşılandığı Anaçlar	15
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.5.1. Kültür Ortamları	16
3.1.5.2. Bitki Yetiştirme Harcı ve Sulama Suyunda Kullanılan Kimyasallar ...	17
3.2. Metod.....	18
3.2.1. İndikatör Bitki Elde Edilmesi ve Muhafazası	18
3.2.2. Ana Materyalin İndekslenmesi	18
3.2.3. İn vitro SUA Tekniğinin Uygulanması.....	19
3.2.3.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....	19
3.2.3.1.(1) SUA'da Anaç olarak Kullanılacak Tohumlar için Katı Tohum Ortamının Hazırlanması.....	19
3.2.3.1.2. SUA Sonrası Bitkilerin Gelişmesi İçin Kullanılan Sıvı Besin Ortamının Hazırlanması.....	19
3.2.3.2. İn vitro SUA Tekniği	20
3.3. SUA' dan Elde Edilen Bitkilerin Turunç Üzerine İndekslenmesi	22

4. BULGULAR ve TARTIŞMA	23
4.1. Ana Materyalde Simptomolojik Olarak Saptanan Patojenin Biyolojik İndeksleme Yöntemiyle Belirlemesine Ait Bulgular	23
4.2. Sürgün Ucu Aşılamaı	25
4.2.1 <i>İn vitro</i> SUA Çalışmalarına Ait Bulgular	25
4.2.2. <i>İn vitro</i> SUA Sonrasında Yan Aşılanmış Bitkilere Ait Bulgular	28
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. İnorganik tuzlar ilave edilmiş Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamı16
Çizelge 3.2. Bitki geliştirme ortamı ve sulama suyuna katılan besin maddeleri.....	17
Çizelge 4.1. SUA çalışmaları ve yan aşılama sonucunda elde edilen bitkilerin % arındırılma oranları.....	30

Şekil 4.1. CYVC ile infekteli Küt diken limon ağaçlarından alınmış yapraklarda gözlemlenen semptomlar	23
Şekil 4.2. Güneş ışığına tutulan CYVC ile infekteli Küt diken limon ağaçlarında daha belirgin bir şekilde gözlemlenen sarı damar açılması semptomu	24
Şekil 4.3. CYVC ile infekteli turunc bitkileri üzerinde gelişen farklı boyutlardaki sarı damar açılmaları	25
Şekil 4.4. CYVC ile infekteli Küt diken limon ağaçlarından alınmış Meristem+4 sürgün ucu ölçüsü kullanılarak Carrizo citrange anaçlarına <i>in vitro</i> SUA tekniği ile aşılınmış ve sıvı ortama alınmış bitkicikler	27
Şekil 4.5. SUA sonrasında gelişen bitkilerin turunc anacı üzerine yan aşılama yoluyla aktarılması.....	29
Şekil 4.6. Turunc indikatör bitkileri üzerinde meydana gelen çizgi şeklindeki sarı damar açılması semptomları.....	31

1. GİRİŞ

Turunçgiller, dünyada tropik ve subtropik bölgelerde yetiştiriciliği yapılabilen oldukça geniş bir kullanım alanına sahip, bitki türlerini içerirler. Başlıca turunçgil üreticisi ülkeler; Brezilya, Çin ve ABD'dir. Türkiye ise üretim miktarı yönünden ilk 10 üretici ülke arasında yer almaktadır (Anonim, 2006). Turunçgil yetiştiriciliği ülkemizde Akdeniz, Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde yapılmakta, iç ve dış ticaret açısından oldukça önemli bir tarım kolunu oluşturmaktadır. Son 10 yıl içinde Türkiye turunçgil üretimi, dünya turunçgil üretiminin % 2,25'ini karşılarken, 919.000 ton ile dünya turunçgil ihracatının % 8'ini karşılamaktadır (Anonim, 2005).

İlk yıllarda yeterince özen gösterilmeksizin yetiştirici ülkeler arasında yapılan üretim materyali alışverişi sonucu yetiştiricilik ve pazarlama alanındaki sorunlara ek olarak birçok entomolojik ve fitopatolojik problemler belirgin olmaya başlamıştır. Bu problemlerin gittikçe önem kazanması nedeniyle yetiştiricilik yapan ülkeler konuyla ilgili bazı sınırlamalar ve uygulamalar getirmek zorunda kalmışlardır (Broadbent, 1987).

Bugüne kadar viral patojenlere karşı herhangi bir tedavi yöntemi bulunamamış olduğundan kabul edilen en etkin yöntem, sağlıklı üretim materyali kullanarak soruna temelden çözüm getirmektir (Navarro, 1981). Söz konusu olan viral patojenler vejetatif çoğaltım yoluyla taşınmaktadır. Bu nedenle vejetatif çoğaltmada temiz bir başlangıç materyalinin kullanımı son derece önemlidir. Temiz materyallerin elde edilmesi amacıyla da bazı doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Hastaliksız bitkileri elde etmek üzere özel *in vitro* kültür teknikleri geliştirilmiştir ve meristem kültürü bu amaçla kullanılan bir tekniklerden biridir (George, 1993).

Virüsten ari bitkileri elde etmek için çoğunlukla kullanılan kültür "meristem kültürü" veya "meristem ucu kültürü" ifadeleri mikro çoğaltım amacı ile değil virüs elemine etme amacı ile başlatılan kültürleri ifade etmektedir. Kültürlerde virüs eliminasyonu için kullanılan eksplantları tanımlamada ise "meristem ucu" terimi daha doğru olurken büyük eksplantlar kullanıldığında (genellikle 1 mm'den büyük) "sürgün ucu" şeklinde ifade etmek daha doğru olmaktadır (George, 1993).

Meyve ağaçlarından virüs eliminasyonu genellikle termoterapi ile meristem ucu kültürlerinden gelişen köklü sürgünlere mikro aşılama ile başarılmıştır. Mikro aşılama virüsten ari anaçların üzerine meristemlerin aşılması tekniğidir. Virüsle bulaşık olmayan tohumlar, kök (anaç) stokları olarak kullanılmaktadır. Eğer meristem *in vitro*'da gelişmiyorsa veya meristemden gelişen sürgünler köklenmiyorsa, bunların *in vitro*'da çoğaltılmış anaçlar üzerine çoğaltılması yapılmaktadır. Ya virüsle bulaşık ana bitkiden direkt olarak aseptik ön işlemler ile ayrılan meristem ucu ya da meristem ucunun *in vitro* kültüründen sonuçlanan küçük bir sürgün ucu virüsten ari anaca aşılansaktadır. Bu tür mikro aşılama meristem kültürünün başarısız olduğu türlerde virüsten ari stokları üretmek için kullanılmaktadır (Zimmerman ve Juwartz, 1994).

Bir bitkinin hücrelerinde virüs konsantrasyonu hücreden hücreye farklıdır ve özellikle apikal sürgün ve kök meristemi hücrelerinin virüs içermesi ihtimali çok düşüktür. Bu nedenle meristem kültürlerinden virüsten ari bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bununla beraber meristemlerin her zaman virüsten ari olmadığı da unutulmamalıdır. Günümüzde meristem kültürü virüs eliminasyonu için rutin olarak uygulanan bir yöntemdir. Ama farklı bitkilerden farklı virüsleri arındırmaya göre de özel yöntemlerle birlikte ele alınmaktadır (Sherwood, 1993).

Turunçgilleri etkileyen viral kökenli hastalıkların varlığı anlaşılınca kadar patojenler, kaynak bölgeden dünyanın turunçgil yetiştirilen pek çok bölgesine yayılma olanağı bulmuştur. Bazı durumlarda bu etmenler enfektelendikleri ağaçlarda belirgin bir hastalık tablosu oluşturmadıklarından, bu gibi ağaçların üretim materyali olarak kullanılması ile patojenlerin yeni alanlara yayılma fırsatı yaratılmış olmaktadır (Wallace, 1959; Navarro, 1993).

Turunçgil üretiminde gelişmiş olan bir çok ülke, patojenden ari aşı gözü gereksinimlerini tesis ettikleri turunçgil çeşit, ıslah ve sertifikasyon programları kapsamında ürettikleri temiz üretim materyallerini üreticiye sağlayarak gidermektedirler (Navarro, 1981).

Tarihi gelişim içinde turunçgil viral patojenlerin elemine edilmesine yönelik olarak uygulanan doğal seleksiyon ve indeksleme, termoterapi ve değişik doku kültürü yöntemleri arasında en etkin genetik stabiliteye sahip olan meristem

kültürüdür. Ancak turunçgillerin ait olduğu Rutecea familyasında da diğer ağaç türlerinde olduğu gibi meristem kültürü çalışmalarında köklendirme problemi ile karşılaşmıştır. Turunçgillerde Murashige ve ark. (1972), tarafından geliştirilip Navarro ve ark. (1975), tarafından detaylandırılan *in vitro* Sürgün Ucu Aşılama (SUA) tekniği ile bu sorun ortadan kaldırılmıştır. Meristem kültürü çalışmaları infekteli bitkilerin sürgün ucu kısmından oluşan çok küçük boyutlardaki meristematik dokuların virüslerden arınmış olabileceği esasına dayanmaktadır. Bu görüş doğrultusunda tohumdan geliştirilmiş köklendirilmiş anaçların üzerine uygulamaya başlanan SUA çalışmaları bugün turunçgilleri viral patojenlerden arındırmada en geçerli yöntemdir. Bu nedenle turunçgil çeşit, ıslah ve sertifikasyon programları içinde yaygın bir şekilde uygulanmakta olan *in vitro* SUA sonucu elde edilen bitkiler, ismine doğru olup gençlik karakterleri göstermemekte ve büyük oranda patojenlerden arınmış olmaktadır.

SUA çalışmalarında konukçu ve patojene göre değişmekle birlikte turunçgillerin bu patojenlerden arındırılması farklı oranlarda gerçekleşmektedir (Roistacher ve ark, 1976). Bu sonuçlardan yola çıkarak Navarro ve ark. (1981), turunçgil virüs ve virüs benzeri patojenleri, SUA yöntemiyle elemine edilme başarılarına göre gruplandırmışlardır.

In vitro SUA tekniği turunçgil türlerinde % 60-70 oranındaki başarısı ve % 90 toprağa şaşırtmadaki başarısı ile ticari üretimde önemli bir uygulama alanı bulmuştur (Growser, 1994). Bu şekilde SUA yöntemleri virüsten ari klonlar elde etmek için başarıyla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ele alınan Turunçgil Sarı Damar Açılması (*Citrus Yellow Vein Clearing* (CYVC)) hastalığı dünyada ilk kez Pakistan'da limonlarda (*Citrus limon*) ortaya çıkmıştır. Bove (1989), hastalığı Pakistan'da rapor etmiş, *Yellow Vein Clearing* "YVC" olarak adlandırmıştır.

Alshami ve ark. (2003)'larının yapmış oldukları çalışmada Yellow Vein Clearing hastalığını araştırmışlar, etmen virüsü pürifiye ederek 685x14 nm uzunluğundaki ipliksi partiküllerin elektron mikroskopunda gözleyerek hastalığı "Citrus Yellow Vein Clearing" virüsü olarak adlandırmışlardır.

Hastalık simptomlarının (Sarı damar açılmaları, yapraklarda deformasyonlar ve kıvrılmalar) başlangıçta Turunçgil Variegation Virüs (*Citrus Variegation Virus* (CVV)) ve Turunçgil Göçüren Hastalığı (*Citrus Tristeza Virüs* (CTV)) ile akraba olabileceği düşünülmüştür. Bu hastalıkların teşhisinde tanı yöntemleri olarak DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked İmmunosorbent Assay) ve Electron Microscopy (Elektron Mikroskop) gözlemleri gibi teknikler kullanılmıştır. ELISA testinde spesifik CVV ve CTV antiserumları kullanılmış fakat sonuçta CYVC' in bu etmenlerle akraba olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Catara ve ark. 1993).

Daha sonra Grimaldi ve Catara (1996) yaptıkları çalışmada limonlarda bulunan CYVC etmeninin ipliksi bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ülkemizde ilk kez Önelge, 2003 yılında bu hastalığı limonlarda rapor etmiş ve hastalığı “Sarı Damar Açılması” olarak adlandırmıştır. Hastalık Kütdiken ve Enterdonata limon çeşitlerinin ve turunç (*C. aurantium*) bitkilerinin genç yapraklarında, ana ve yan damarlarda renk açılmaları ve yaprakların kenarında kıvrılmalar, buruşup kırışmalar şeklinde görülmektedir. Hastalıklı yapraklar ışığa tutulduğunda damar açılması daha net görülebilmektedir. Hastalık genç yapraklarda belirgin olduğu kadar yapraklar olgunlaştığında da belirginliğini korumakta ve renk açılmaları olgun yapraklarda da görülebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, dünyada ilk kez Pakistan'da teşhis edilen ve daha sonra da Türkiye' de rapor edilen, şimdilik Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği turunçgil parsellerinde limon ve turunçlarda gözlenen sarı damar açılması (*Citrus Yellow Vein Clearing*) “CYVC” hastalığı ile bulaşık Kütdiken limon çeşitlerinden alınan sürgün uçları kullanılarak *in vitro* SUA tekniği ile hastalığı arındırmak ve temiz bitki materyali elde etmektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde bitkileri hastalıklardan arındırmak için kullanılan doku kültürü teknikleri aynı zamanda hastalıklara dayanıklılığı arttırmak, dayanıklı bitki genotiplerini korumak, bitki hastalıklarına karşı somoklonal dayanıklılık meydana getirmek, dayanıklı bireyleri seçmek veya dayanıklılığa cevap veren genlerin aktarılmasını kolaylaştırmak için de kullanılmaktadır (George, 1993).

Viral etmenler vejetatif yollarla taşındıkları için, vejetatif çoğaltma yapılırken temiz bir başlangıç materyalinin kullanımı son derece önemlidir. Temiz materyallerin elde edilmesi amacıyla da bazı doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır (George, 1993).

Doku kültürü teknikleri içinde ise kallus, protoplast, çeşitli üreme kapasitesindeki dokular (ovül, nusellus) ve meristem kültürü yer almaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1983).

Doku kültürü teknikleri içinde, virüslerden arındırma açısından en etkin yöntemlerden biri genetik stabiliteye sahip meristem kültürüdür. Gerçek stabilitenin korunduğu meristem kültüründe yalnız başına meristem değil, meristem ve ilk birkaç yaprakçıktan ibaret olan meristem ucu (sürgün ucu) kültüre alınmaktadır (Walkey, 1985).

Meristem kültürü alanında ilk girişim 1933 yılında White'ın Kuş otu (*Stelaria media*)' nun sürgün ucunu kültüre alması ile olmuştur. Daha sonra 1945 yılında Loo, Kuşkonmaz bitkisinin (*Asparagus officinalis*) 5 mm uzunluğundaki gövde uçlarını kültüre almayı başarmıştır. Esas olarak meristem kültürü başlangıcı Latin çiçeği (*Tropaeolum majus*)' nden başarılı bir meristem ucu kültürleri ve sonuçta köklü bitkilerin elde edilmesi ile olmuştur. Daha sonra meristem ucu kültürlerinin virüsten ari bitkileri üretmedeki potansiyeli büyük ilgi görmüş, 1952 yılında Morel ve Martin tarafından Yıldız Çiçeği (*Dahlia. spp*)' nde ve 1955 yılında da 6 patates (*Solanum tuberosum*) çeşidinde virüsten ari bitkiler elde edilmiştir (Doods ve Roberts, 1986; Nehra ve Kartha, 1994).

Virüs ve virüs benzeri hastalıkların turunçgilleri ciddi boyutlarda etkilediğinin anlaşılmasından sonra, bu hastalıklardan ari bitki elde etmede çeşitli yöntemler

uygulama alanı bulmuştur. Bunlardan en eski olanı poliembriyonik çeşitlerin nüseller çöğürlerinin seçimi olmuştur (Weathers ve Calavan, 1959; Knorr ve Childs, 1968). Nüseller çöğürlerden elde edilen bitkilerin uzun yıllar gençlik karakterleri göstermeleri, fazla dikenli olmaları, ağaç habitusunun büyük olması, geç meyveye yatması, ismine doğru olmaması, yöntemi sınırlayan çok önemli olumsuz yönlerdir (Juarez ve ark., 1976).

Monoembriyonik kültürlerde ise gençlik karakterlerine sahip olmayan virüs ve virüs benzeri etmenlerden ari üretim materyali elde etmek amacıyla pek çok kültür bitkisinde yaygın olarak kullanılan termoterapi turunçgillerde de uygulanmıştır (Desjardians ve ark., 1957; Lin ve Lo, 1966; Olson ve Rogers, 1969).

Virüsten ari bitki rejenarasyonunun kallustan ve protoplastlardan başlatılan kültürlerle de elde edilebileceğini belirten raporlar bulunmaktadır. Ancak kallus kaynaklı bitkiler kesin olarak virüsten ari olmayıp orijinal bitkiye genetik olarak benzemeyebilmektedir. Bu da kallus kültürlerinin virüs eliminasyonunda kullanımının çok uygun olmadığını ortaya koymuştur (George, 1993).

Bazı turunçgil virüs ve virüs benzeri hastalıkların sıcaklık uygulamaları ile inaktive edilebilmesi, diğer bir yöntem olan termoterapinin ana prensibi olduğu bildirilmiştir (Olson ve Rogers, 1969). Termoterapi uygulaması içinde sıcak su uygulaması, sıcak hava uygulaması, sıcak nemli hava uygulaması gibi farklı yöntemler bulunmaktadır. Fakat virüsü tamamen inaktive edecek derecede yüksek ısı uygulamaları çoğu zaman bitkiyi ölüme götürmektedir. Ayrıca bazı virüs ve virüs benzeri patojenlerin bu uygulama ile elimine edilmeyişi, yöntemin uygulanmasında sınırlayıcı faktörler olarak rol aldığı belirtilmektedir (Roistacher, 1977).

İlk olarak *in vivo* Sürgün Ucu Aşılama (SUA) ile Turunçgil Cüceleşme Viroid (*Citrus Exocortis Viroid* (CEVd)) etmeni elimine edilebilmiştir. 38 °C sıcaklıkta 230 gün tutulan limon (*Citrus limon*) fidanlarından alınan yaklaşık 1 cm ölçüsündeki sürgünler, aynı çaptaki anaçlara aşılansarak termoterapi ile sürgün ucu kombine edilmiş ve başarılı sonuç alınmıştır (Stubbs, 1968).

Murashige ve ark. (1972)' larının *in vitro*'da yetiştirdikleri genç anaç fideleri üzerine sürgün uçlarını aşılansarak birkaç turunçgil bitkisi elde etmede gösterdikleri başarı bu bitkilerin bir kısmının CEVd hastalığından ari olmaları ve nusellar

fidanların sahip oldukları gençlik karakterlerini göstermemeleri ile daha da önem kazanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada 0,1-0,2 mm büyüklükteki büyüme konisi ile ilk 3 yaprakçıktan ibaret olan sürgün uçlarını, 2 haftalık fide anaçlar üzerine aşılamışlar ve mikro aşılanmış bitkileri kontrollü koşullarda büyütmüşlerdir. Çalışma sonunda, sürgün ucu ölçüsü arttıkça, patojenden ari turunçgil elde etme olasılığının azalacağını belirlemişlerdir.

Navarro ve ark. (1975)'lerinin bu konu üzerine yaptıkları daha kapsamlı bir çalışma ile metot rutin hale getirilmiştir. Çalışmada portakallar (*C. sinensis*) için en uygun anaç olarak Troyer citrange (*C. aurantium x Poncirus trifoliata*), limon ve laym için ise kaba limon (*C. jamphiri*) saptanmıştır. En iyi sürgün ucu kaynağı olarak da serada yetiştirilen fidan veya bahçede mevcut ağaçların yaprakları koparılarak, bunların çıplak dallarından oluşan sürgünler olduğu bulunmuştur. Ayrıca kesilen lateral gözleri, *in vitro* da kültüre almak suretiyle, sürgün elde etme yöntemini geliştirmişlerdir. Daha detaylı hale getirilen *in vitro* SUA sonucunda %30 ve %50 oranında başarı ile aşılanarak elde edilen bitkiler, son aşamada %95' lik bir canlılık oranı ile toprağa aktarılabilir duruma geldiği belirtilmiştir.

Aynı araştırmacılar SUA tekniği ile Turunçgil Kavlama Hastalığı (*Citrus Psorosis Virüs* (CPsV)) ve CEVd etmeninin arındırılmasında sürgün ucu kaynağının ve ölçüsünün etkisini araştırmak üzere bir çalışma yapmışlardır. CPsV'ü ve CEVd' inden ari bitki elde etmek için en iyi sürgün ucu kaynağının serada yetiştirilen fidan veya bahçede mevcut ağaçların yapraklarının koparılması sonucu oluşan yeni sürgünlerin olduğunu, en iyi sürgün ölçüsünün ise ilk 3 yaprakçığı içeren sürgün ucu olduğunu bildirmişlerdir (Navarro ve ark., 1975).

Bunlara ek olarak farklı patojenlerin aynı sürgün ucu içinde dağılım deseninin değişebildiğini ve *in vitro* SUA ile farklı ırklarını dahi ayırmanın mümkün olduğunu ortaya koymuşlardır (Navarro ve ark., 1976; Roistacher ve ark., 1976).

Roistacher ve ark. (1976)'ları *in vitro*' da SUA ile birkaç virüs, CEVd ve Turunçgil Yediverenleşme (*Stubborn*) hastalığının eliminasyonu üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlarla farklı anaçlar üzerinde hastalık etmenlerinin arındırılma oranları belirleyebilmişlerdir.

Bu çalışmadan yola çıkılarak turunçgil virüs ve virüs benzeri hastalıklar SUA yönteminin kullanılmasıyla hastalıkları elemine edebilme gücüne göre şu gruplara ayrılmışlardır (Navarro ve ark., 1981).

1. Elemine edilmesi çok kolay olan hastalıklar: CEVd, Turunçgil Gözenekleşme Viroid (*Citrus Cachexia Viroid* (CCaVd)) etmeni, Turunçgil Yediverenleşme Hastalık (*Stubborn*) etmeni
2. Elemine edilmesi kolay olan hastalıklar: Turunçgil Göçüren Hastalığı-Çöğür Sarılığı ırkı (*Citrus Tristeza Virüs-Seedling Yellow* (CTV-SY)), Turunçgil Damar Enasyon Virüs (*Citrus Vein Enation Virüs* (CVEV)) etmeni
3. Elemine edilmesi güç olan hastalıklar: *Citrus Dweet Mottle Virüs* (CDMV), Turunçgil Taşlaşma (*Citrus Impetratura*) Hastalığı, Turunçgil Zamklı Çukur (*Citrus Concave Gum*) Hastalığı ve Turunçgil Gövde Çivileşmesi (*Citrus Cristacortis*) Hastalığı.

In vitro SUA tekniğinde anaç yaşının aşılama başarısına olan etkisini araştırmak üzere, bir haftalık, iki haftalık ve 3-4 haftalık anaçlarla çalışmalar yapılmıştır. En iyi sonuç iki haftalık çöğürlerde alınmıştır. Bir haftalık çöğürlerin üzerinde yapılan aşılamalarda, anaçta kallus gelişimi daha hızlı olması nedeniyle sürgün ucunun gelişmesini engellediği, 3-4 haftalık çöğürlerde ise sürgünlerin kurduğu ve doku kaynaşmasının gerçekleşmediği bildirilmiştir (Navarro ve ark.,1975).

In vitro SUA yönteminin belirli bir esasa oturtulmasından sonra (Navarro ve ark., 1975), birçok araştırmacı değişik SUA teknikleri ve SUA sonrası *in vitro* koşullara aktarılması üzerine araştırmalar yapmışlardır (Navarro ve ark., 1975; Su ve Chu, 1984; Filho, 1984).

In vitro SUA'da değişik birkaç kesim şeklinin karşılaştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, anacın epikotil tepesini kesmek suretiyle sürgün ucunu korteks yüzeyine koyarak aşılama başarısı % 37.5, iletim dokusu üzerine koyarak % 50, anacın tam ortasına koyulmasıyla % 35' lik bir başarı sağlanmıştır (Navarro ve ark., 1975). Anaçta yine epikotilin üst kısmını kesip, 1 mm uzunluğunda yatay ve dikey kesim yaparak ters T oluşturulmasıyla ve sürgün ucunu bu kesim şekliyle ortaya

çıkan korteks yüzeyine koyulmasıyla % 45'lik başarı sağlanmıştır. Bu değerlendirmelere göre en iyi anaç kesim ve sürgün ucu yerleştirme şeklinin ters T olduğu bildirilmiştir.

Su ve Chu (1984), *in vitro*'da gelişen 2 haftalık anaçların tepesini kestikten sonra, epikotilde 2-3 mm aşağıda 0,3-0,4 mm büyüklüğünde korteksi de içine alan üçgen bir parça çıkartmışlar ve 0.2 mm ölçüsündeki sürgün ucunu, üçgen içinde korteksin kesilen yüzeyinin üzerine veya vasküler silindir halkanın üzerine koymuşlardır. İçinde sürgün bulunan üçgeni daha sonra aynı anaçtan elde edilen ve kesilen üçgen büyüklüğündeki epidermal doku ile kapatmışlardır. Araştırmacılar bu tekniği uygularken, iki farklı anaç kullanmışlardır. Luchen portakalın anaç olarak kullanılması sonucunda % 75,8 oranında, Troyer citrange'ın anaç olarak kullanılması sonucunda ise % 60 oranında başarılı aşılama elde etmişlerdir.

Başarılı bir *in vitro* SUA için yapılan araştırmaya göre, meristem bölgesinin etil alkol ile silinmesi binoküler steromikroskobu altında yatay hava akışlı kabinde çalışarak meristem bölgesi izole edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Meristemi ayırmak için kullanılan kesicilerin keskin olmasını sağlamak bakımından sık sık değiştirilmesi ve sterilize edildikten sonra kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Öncelikle dış yapraklar ve yaprak taslakları temizlenip sonra meristematik bölge alındığı için meristematik bölgenin çabuk kuruyabileceği ve zarar görebileceği belirtilmiştir. Kurumayı önlemek için sterilize edilen aletlerin sıcak olmamasına dikkat edilmesi ve çalışma bölgesinin aydınlatılmasında ısınmaya meydan verilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Sherwood, 1993).

Başarılı bir *in vitro* SUA sonrası bitkileri *in vivo* koşullara aktarmak da en az başarılı aşılama kadar önem taşır. Navorro ve ark. (1975)' ları tarafından rutin hale getirilen SUA' da bitkiler aşılama 5-8 hafta sonra toprağa aktarıldığında % 95 oranında canlılık saptanmıştır. Fakat toprağa aktarılan bitkilerin indeksleme büyüklüğüne gelmeleri 7 ay gibi uzun bir zaman almaktadır (De Lange, 1978). Bu sürenin kısaltılması amacıyla toprağa aktarma dışında farklı *in vivo* yöntemler araştırılmıştır.

De Lange (1978), SUA sonrasında bitkileri 10 mm çapındaki kaba limonlara aşılama yaparak % 89 gibi başarılı aşılama oranı elde etmiştir. Mikro aşılama bu

bitkiler, toprağa aktarılan bitkilere oranla daha kısa sürede (5 aydan daha önce) indeksleme büyüklüğüne erişmişlerdir.

Filho (1984) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* SUA'dan hemen sonra bitkicikler sıvı besin ortamına aktarılmayıp 1 aylık anaçlar üzerine aşılantmışlardır. Bu şekilde % 80'lik başarı sağlanabileceği bildirilmiştir.

In vitro SUA yöntemiyle virüs ve virüs benzeri patojenlerle bulaşık bitkilerde, patojenleri bu bitkilerden elemine edilmesinin mümkün olduğunu gösteren bazı çalışmalar yapılmış ve yayınlanmıştır.

Brezilya' da yapılan bir çalışmada SUA yöntemi kullanılarak CTV, CEVd, CCaVd elemine edilmesinde % 100 başarı sağlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmayla, CPsV etmenlerinin arındırılmasında elde edilen % 60' lık oran tamamen virüsten ari bitkiler elde etmek için SUA tekniği ile birlikte termoterapi tekniğinin de kullanılmasının gerektiğini göstermiştir. Bu deneyde fidanlar 38 °C' de 16 saat aydınlıkta, 32 °C' de 8 saat karanlıkta 60 gün boyunca klima odalarında bekletilmiş ve SUA'da kullanılacak olan meristematik sürgün uçları elde edilmiştir. Meristematik parçaların 7 aylık Rangpur laymı (*C. limonia*) fidanlarına aşılantmasından sonra fidanlar sera ortamında geliştirilmiştir. Farklı portakal çeşitlerinin kullanıldığı bu çalışmada CPsV etmenin arındırılmasında % 100 başarı sağlanmıştır (Carvalho ve ark., 2002).

Hindistan' da yapılan bir çalışmada Kinnow (*C. nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora) portakallarında çok ciddi problemlere neden olan Hindistan Turunçgil Halkalı Leke Virüs (*Indian Citrus Ringspot Virus* (ICRSV)) etmeninin elemine edilmesinde SUA ile termoterapi tekniği kombine bir şekilde uygulanmıştır. ICRV etmeni ile infekteli ağaçlardan alınan sürgünlere 40 °C 30 dakika, 45 °C 60 dakika, 50 °C 120 dakika olmak üzere sıcak nemli hava uygulaması yapılmış, sürgünler MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında kültüre alınmıştır. Sürgünlerden geliştirilen sürgün uçları limon anaçları üzerine aseptik koşullarda aşılantmıştır. 50 °C su banyosunda 2 saat bekletilen 0.7 mm uzunluğunda olan sürgün uçlarıyla yapılan *in vitro* SUA yöntemi ile elde edilen ICRSV etmeninden ari bitkilerin (% 36.84) maksimum sayısı her iki uygulama yöntemine göre karşılaştırıldığında, nemli sıcak

hava uygulamasının, su banyosu uygulamasına oranla daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Sharma ve ark., 2008).

Bunlara ek olarak SUA ile ırk ayrımı çalışmaları da yapılabilmektedir. Gonzales ve ark. (1980)'ları şiddetli CTV-SY ile bulaşık bitkilerden orta dereceli CTV izolatu ile bulaşık bitkiler elde etmişlerdir. Aynı zamanda şiddetli CEVd ırkı ile bulaşık bitkilerden orta derecede şiddetli CEVd ırkı ile bulaşık bitkiler elde etmişlerdir.

Ülkemizde geçmiş yıllarda virüsten ari turuncgil üretme amacıyla nüsellar klon çalışmaları (Özhan, 1967), klon seleksiyonu ve indeksleme yöntemleri (Özalp ve Herper, 1974) uygulama alanı bulmuştur. Gerek nüsellar hatların sahip olduğu fenolojik dezavantajlar, gerekse indeksleme ve klon seleksiyonu çalışmaları için ön koşul olarak, seçilen bireyler içinde hastaliksız bireylerin bulunması gerekliliği ve tüm bu çalışmaların uzun yıllar sürmesi, sonuçta başarıyı engelleyici veya kısıtlayıcı unsurları oluşturmuştur.

Ülkemizde ilk kez turuncgiller üzerine yapılan *in vitro* SUA ile ilgili bir çalışmada virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile infekteli 5 navel (*C. sinensis*) çeşidi (Skags Bonanza, Parent Washington, Frost Nüsellar, Carter, Atwood) ayrı ayrı termoterapi, *in vitro* SUA ve her iki tekniğin kombinasyonu uygulanmıştır. Termoterapi ve *in vitro* SUA'nın uygulanmasıyla arındırılabilme oranlarının düşük kaldığı, her iki uygulamanın kombine edilmesiyle arındırma oranlarının yükseldiği bildirilmiştir. İndeksleme çalışması sonucunda termoterapi ile CEVd ve CCaVd'i % 40, CTV'ü % 25, CPsV'ü % 20 ve *Stubborn* hastalık etmeni % 100 oranında bu çeşitlerden arındırılmıştır. *In vitro* SUA ile CEVd, *Stubborn*, CCaVd, CTV etmenleri % 100 oranında arındırılırken, CPsV etmeninde bu oran % 47 olmuştur. Bu iki tekniğin kombinasyonu ile CEVd, CTV etmenleri ve *Stubborn*' da arındırma oranı % 100 iken CPsV etmeninde oran % 73'e, CCaVd etmeninde ise % 80'e çıkmıştır (Tamer, 1988).

Ülkemizde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada *in vitro* SUA tekniğinde dört farklı anaç kesim şeklinin (ters T, ters T' den parça alma, gövdeye üçgen kesim ve tepeyi kesme) kullanıldığı çalışmada, dört değişik farklı turuncgil türünde kesim yöntemlerinin başarı oranları belirlenmeye çalışılmıştır. Atwood navel portakal çeşidinde ters-T, Star Ruby altıntop (*C. paradisi*) çeşidinde ters-T ve ters-T'den

parça alma, Kaba limon çeşidinde tepeye koyma, Klemantin mandarin (*C. deliciosa*) çeşidinde ise gövdeye üçgen kesim şekli daha başarılı bulunmuştur (Göçmen, 1992).

1983 yılında Ç.Ü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünde virüsten ari bitki elde etme çalışmaları başlamış ve büyük işlerlik kazanarak Ç.Ü Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde pratiğe aktarılmıştır. Termeterapi ve *in vitro* SUA teknikleri kombinasyon halinde uygulanarak 30'dan fazla portakal, mandarin, limon ve altıntop bitkileri tüm patojenlerden arındırılarak bölge üreticilerine testlenmiş bitki olarak aktarılmıştır (Çınar ve ark., 1993).

Bitkisel üretimde etkili olan doku kültürü tekniklerinden meristem ve sürgün ucu teknikleri günümüzde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Bu kültürler önce vejetatif olarak çoğaltılan bitkilerin hızlı klonal çoğaltımı, virüssüz materyal elde etme ve hem vejetatif hem de tohumla üretilen bitkilerin germplazmalarının muhafazası gibi alanlarda kullanılmış, daha sonra bitki ıslahında gen transferi ile genetik transformasyonları gerçekleştirmede kullanılmaya başlanmıştır (Nehra ve Kartha, 1994). Ayrıca vejetatif bitki materyallerinin uluslar arası değişiminde ve patojenlerden arındırmada da kullanılmaktadır.

Virüs ve virüs benzeri hastalıklar turunçgil tarımı üzerinde pek çok olumsuz etkiye sahip olup, ekonomik turunçgil üretimini sınırlayıcı önemli faktörlerden biridir. Virüs ve benzeri hastalıkların turunçgil teknolojisi gelişmemiş ülkelerde verimi % 10-50 oranında azalttığı belirtilmiştir (Futch ve Brlansky, 2004).

Turunçgiller, dünyada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan en eski bitkilerden birisi olmasına karşın, 1933 yılında Fawcett'in CPsV etmeninin virüs olduğunun bildirilmesine kadar, turunçgil tarımında virüslerin etkisi bilinmiyordu (Bar- Joseph ve ark., 1989). Dünyada ekonomik anlamda önemli 30 virüs ve virüs benzeri hastalıktan (Bove, 1995) ülkemizde sadece 14'ü bugüne kadar saptanabilmiştir (Çınar ve ark., 1993). Bu hastalıklar arasında ülkemizde turunçgillerde ortaya çıkan en son hastalık ise "Turunçgil Sarı Damar Açılması" (CYVC) hastalığıdır (Önelge, 2003).

CYVC hastalığı dünyada ilk kez Pakistan'da ortaya çıkmıştır. İtalya ve Pakistan'ın birlikte yürüttükleri araştırma 1987-1991 yılları arasında Pakistan Islamabad'da 4 farklı turunçgil yetiştirilen alanda yürütülmüş ve CYVC belirtileri

gözlenen 15 limon hattından alınan örnekler Pakistan NARC (Ulusal Tarımsal Araştırma Konseyi)'da incelenmiştir. Burada yapılan çeşitli çalışmalarda bu etmenin aşı gözü ile taşınabildiği, yalnızca limon ve nadiren turunçta simptom oluşturduğu, portakal, mandarin veya altıntopta, ayrıca kaba limonda da simptom gözlenmediği rapor edilmiştir.

Hastalığın ilk kez görüldüğü Pakistan' da farklı turunçgil alanlarında bulunan limon ve turunç ağaçlarında sarı damar açılmaları, yapraklarda deformasyonlar ve kıvrılmalar şeklinde simptomlar gözlemlenmiştir. Farklı turunçgil tür ve çeşitlerine yapılan kabuk inokulasyonu ile turunç ve limon yapraklarında beneklenme şeklinde simptomlar geliştirdiği belirtilmiştir. Kaba limon Ciacuculli, Parson's Special mandarin çeşitlerinde, Marsh Seedless altıntop çeşitlerinde, Meksika laymı (*C. latifolia*) çeşitlerinde, Dweet tangor (*C. reticulata*) ve Etrog citron (*C. medica*) çeşitlerinde ise simptom geliştirmedeği belirtilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmalarında hastalığı taşıma denemeleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Hastalık teşhisinde tanı yöntemleri olarak DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked İmmunosorbent Assay) ve Electron Microscopy (Elektron Mikroskop) gözlemleri gibi teknikler kullanılmış, ELISA testinde spesifik CVV ve CTV antiserumları kullanılmış fakat sonuçta CYVC' nin bu etmenlerle akraba olmadığı farklı bir viral etmen olduğu ortaya çıkarılmıştır (Catara ve ark. 1993).

Daha sonraki yıllarda Grimaldi ve Catara (1996) Elektron Mikroskop yöntemiyle limon ve turunç genç ilkbahar yapraklarında CYVC virüs etmenine ait 13-14 nm çapında ve 530-1.800 nm uzunluğunda olan ipliksi virüs partiküllerinin varlığını bildirmişlerdir.

Hindistan' da yapılan bir araştırmada, CYVC hastalığı 16 turunçgil çeşidine aşı yoluyla taşınmış bununla beraber CYVC hastalığı ile infekteli Etrog citron turunçgil bitkisinden, sağlıklı Mosambi portakalının tohumlarına ve *Phaseolus vulgaris* (Fasulye) çeşitleri olan saxa, singtamey, gheusemi ve *Chenopodium quinoa* (Ak kazayağı) bitkilerine mekanik olarak bulaştırılmış, fasulye çeşitlerinden Singtamey ve ak kazayağı bitkisinin inokule edilmiş yapraklarında lokal lezyonlar meydana getirmiş ancak fasulye bitkilerinde infeksiyon sistemik olmuştur. Virüs pürifiye edilmiş ve 685x14 nm iplik şeklindeki partikülleri elektron mikroskopunda

gözlenmiştir. DAS ve DAC (Direct Antigen Coating) ELISA, ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy) serolojik yöntemleriyle CYVC virüsünün protein kılıfının 32 kilo dalton molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir (Alshami ve ark., 2003).

Ülkemizde ise bu hastalık 2003 yılında Önelge tarafından rapor edilmiştir. Bu raporda Çukurova Bölgesinde CYVC ile infekteli limon ağaçlarında, sarı damar açılması semptomunun yapraklarda, yan damarlar üzerinde farklı boyutlarda beneklenmeler şeklinde görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca bu semptomların genç yapraklarda, yaprak kıvrılmaları ve bükülmeler ile birlikte geliştiği, arazi semptomlarının ilkbahar ve sonbahar sürgün gelişme döneminde oldukça belirgin olduğu, yaz gelişme döneminde de gözlemlendiği bildirilmiştir. CYVC' nin aşı ile taşıma çalışmalarında turunç, Enter, Kütdiken, İtalyan ve Lamas limon çeşitlerine taşındığı belirtilmiştir. Bununla beraber, Madam Vinous, Pineapple, Navelina, W.navel, Valencia portakal çeşitleri, Satsuma, Klemantin, Fremont, Nova, Parson's Special, Kara mandarin (*C. reticulata*) çeşitleri, Star Ruby, Rio Red, Marsh Seedles, Duncan altıntopları, Meksika laymı, kaba limon çeşitlerinde CYVC' ye ait herhangi bir semptomun gelişmediği bildirilmiştir (Önelge, 2003).

3. MATERYAL ve METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aday Ağaçlar**

In vitro Sürgün Ucu Aşılama (SUA) tekniği uygulanacak bitki materyalleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Uygulama Çiftliği (AUÇ) turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan, Turunçgil Sarı Damar Açılması (*Citrus Yellow Vein Clearing* (CYVC)) etmeni ile infekteli Kütdiken limon (*Citrus limon*) çeşitlerine ait ağaçlardan alınmıştır. Bitki materyalleri İlkbaharda, Nisan-Mayıs-Haziran aylarında ve sonbaharda Eylül- Ekim-Kasım aylarında alınmıştır.

3.1.2. İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan İndikatör Bitki

In vitro SUA öncesinde ve sonrasında fidanlarda bulunabilecek CYVC etmeni belirlemek amacıyla turunç (*C. aurantium*) indikatör bitkisi kullanılmıştır. Turunç fidanları tohumdan yetiştirilmiş olup, Ç.Ü Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan ağaçlardan meyvelerin olgunlaşmaya başladığı Aralık-Ocak ayları arasında alınmıştır.

3.1.3. In vitro SUA' da Kullanılan Anaçlar

Sürgün ucu çalışmalarında Kütdiken limonlar (*C. jambhiri*) için üç yaprak hibritlerinden olan Carrizo citrange (*C. sinensis x Poncirus trifoliata*) çeşidi anaç olarak kullanılmıştır.

3.1.4. In vitro SUA Sonrası Elde Edilen Bitkilerin Aşılandığı Anaçlar

SUA'dan sonra elde edilen bitkiler daha hızlı bir şekilde indekslenme büyüklüğüne gelmeleri için, turunca yan aşı yapılarak büyümeleri sağlanmıştır.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar**3.1.5.1. Kültür Ortamları**

In vitro SUA' larında anaç olarak kullanılan tohumların geliştiği ortam ve SUA sonrası bitkilerin gelişmeleri için gerekli olan sıvı ortam, Murashige ve Skoog (1962) Temel Besin Ortamının, Navarro ve ark (1975)'ları tarafından modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İnorganik tuzlar ilave edilmiş Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamı (Navarro ve ark., 1975).

Stok solüsyonu	İçindekiler	Miktar(mg/l)
1. Nitratlar	NH ₄ NO ₃	82.5
	KNO ₃	95.0
2. Sülfatlar	MgSO ₄ .H ₂ O	0.0815
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.845
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.43
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00125
3. Halojenler	CaCl ₂ .6H ₂ O	0.0022
	KI	0.0415
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00125
4. P.BO.Mo.	KH ₂ PO ₄	85.0
	H ₃ BO ₃	0.31
	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	12.5
5. NaFeEDTA	FeSO ₄ .7H ₂ O	1.392
	Na ₂ EDTA	1.862
6. Vitaminler	Nikotinik Asit	0.025
	Pridoxin HCl	0.025
	Thiamin HCl	0.005

3.1.5.2 Bitki Yetiştirme Harcı ve Sulama Suyunda Kullanılan Kimyasallar

Bitki yetiştirme ortamı içinde 1:1:1 oranında ince kum, ticari torf karışımı ve sünger taşı (Pumice) kullanılmıştır. Harca karıştırılan kimyasallar, sulama suyu ile verilen besin çözeltileri Çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Bitki geliştirme ortamı ve sulama suyuna katılan besin maddeleri kum+torf+sünger taşı karışımına ilave edilen besin maddeleri

Adı	Kimyasal Formülü
Makro Elementler	
Triplesüperfosfat	P_2O_5
Dolomit	$MgCO_3$
Klisyum karbonat	$CaCO_3$
Mikro Elementler	
Bakır sülfat	$CuSO_4 \times 5H_2O$
Çinko sülfat	$ZnSO_4$ (%36 Zn)
Mangan sülfat	$MnSO_4$ (%28 Mn)
Demir sülfat	$FeSO_4 \times 7H_2O$
Amonyum molibdad	$(NH_4)_6.Mo_7O_{24} \times H_2O$
Borik asit	H_3BO_3

Sulama suyuna ilave edilen besin maddeleri

Adı	Kimyasal Formülü
Kalsiyum Amonyum Nitrat	$Ca(NH_4)_2 NO_3$
Amonyum nitrat	$(NH_4)_2 NO_3$
Potasyum sülfat	K_2SO_4

3.2. Metod**3.2.1. İndikatör Bitki Elde Edilmesi ve Muhafazası**

Çalışmada indekslemede kullanılan turunç bitkisi tohumları ve anaç olarak kullanılan üç yaprak hibritlerinden Carrizo sitrange tohumları, Ç.Ü Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan ağaçlardan elde edilmiştir. Meyveler, olgunlaşma dönemi olan Aralık-Ocak ayları arasında toplanmıştır. Çıkarılan tohumların üst yüzeyindeki yapışkan maddenin uzaklaştırılması amacıyla çeşmede bol suda yıkanmış ve biraz kurumaları için oda sıcaklığında gazete kağıtları üzerine yayılmıştır. Üst yüzeyi kuruyan tohumlar, bez torbalar içine konarak 52 °C' de 10 dakika sıcak su uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Daha sonra % 1'lik 8 Hydroxy-Quinoline Sülfat solüsyonu içerisinde 3 dakika bekletilerek ilaçlama işlemi tamamlanmıştır(Giocometti, 1986). İlaçlanan tohumlar tekrar gazete kağıtları üzerinde 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Hafif kuru ve nemli tohumlar polietilen torbalar içerisine konarak +4 °C' de soğuk odada veya buzdolabında kullanılmaya kadar muhafaza edilmiştir.

Turunç bitkisi tohumları ilaçlandıktan sonra 3.1.5.2' de verilen bitki yetiştirme harcı içinde saksılara, her saksıya 4-5 tohum olarak ekilmiş ve can suları verilmiştir. Çıkış gözlemlenene kadar üzerleri gazete kağıtlarıyla kapatılmış soğuk havalardan etkilenmemeleri için Ç.Ü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Parsellerinde bulunan seralara konulmuştur. İndeksleme amacı için kullanılacak olan turunç tohumları 10-15 cm büyüklüğe ulaşıncaya kadar saksılara şaşırtılmış ve Çizelge 3.2' de verilen sulama suyuna ilave edilen kimyasallarla gübreleme ve sulama işlemleri haftada bir kez uygulanmıştır.

3.2.2 Ana Materyalin İndekslenmesi

Ç.Ü Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan Kütdiken limon çeşitlerinde simptomolojik olarak gözlemlenen CYVC hastalığını belirlemede indikatör bitki olarak turunç bitkisi kullanılmıştır.

CYVC hastalığı ile bulaşık olduğu düşünülen Kütdiken limon çeşitlerine ait ağaçlardan alınan sürgünlerden elde edilen gözler, turunç bitkisine aşılacaktır.

Doku inokulasyonları her indikatör bitkiye 2 adet göz aşısı şeklinde yapılmıştır. İndekslemeden bir ay sonra bitkiler geriye doğru budanarak yeni sürgünlerin oluşması teşvik edilmiş ve CYVC hastalığına ait sarı damar açılması, normalden küçük yapraklar, genç yapraklarda oluşan kıvrılma ve bükülme gibi belirtiler araştırılmıştır. Bitkiler indekslenirken kullanılan aşı bıçakları ve makaslar her defasında % 2'lik Sodyum Hipoklorit solüsyonuna (NaOCl) batırılarak sterilize edilmiştir. Negatif kontrol olarak 1 adet turunc bitkisine hiçbir işlem uygulanmamış ve diğer indekslenen bitkilerle birlikte Ç.Ü. Bitki Koruma Araştırma Parselinde bulunan seraya konulmuştur. Yaz aylarında haftada iki defa, kış aylarında haftada bir defa olmak suretiyle sulaması yapılmış, gerekli görüldüğünde gübreleme (Çizelge 3.2.) ve bakım işlemleri indeksleme yapılan bitkilere uygulanmıştır.

3.2.3. *In vitro* SUA Tekniğinin Uygulanması

3.2.3.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Murashige ve Skoog (1962) temel besi ortamının esas alınmasıyla oluşturulan katı ve sıvı ortamlar hazırlanmıştır. Ortamların hazırlanmasında, Çizelge 1' de verilen 1,2,3,4,5 no'lu kimyasal maddeler ayrı ayrı 500 ml destile suda eritildikten sonra, 1 no'lu stok solüsyon oda sıcaklığında, diğerleri ise buzdolabında saklanmıştır. 6 no'lu vitamin ortamı 250 ml destile suda eritilip buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.1.(1). SUA'da Anaç Olarak Kullanılacak Tohumlar İçin Katı Tohum Ortamının Hazırlanması: 1,2,3,4,5 no'lu stok solüsyonlarından 10' ar ml alınıp 1000 ml'ye tamamlanmış ve 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile pH 5.7'ye ayarlanmıştır. Kültür ortamı, % 1'lik Difco Bacto Agar ilavesi ile katılaştırılmıştır. Hazırlanan kültür ortamı, 150x25x2 mm ölçüsündeki Pyrex test tüplerine 25'er ml konularak 121 °C' de 15 dakika süre ile otoklav edilmiştir. Otoklav edilen tüpler buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1.2. SUA Sonrası Bitkilerin Gelişmesi İçin Kullanılan Sıvı Besin Ortamının Hazırlanması: 1,2,3,4,5 ve 6 no'lu stok solüsyonlarından 10' ar ml alınmış, 100 mg Myo-inositol ile 75 g Sakaroz ilave edilmiş ve destile su ile 1000

ml' ye tamamlanıp, pH 5.7' ye ayarlanmıştır. Hazırlanmış olan bu sıvı kültür ortamı, test tüplerine yine 25 ml olarak konmuştur. Bitkilerin tüp içerisinde tam olarak ve sabit bir şekilde yerleşebilmeleri için, ortasında delik bulunan filtre kağıtları tüplere yerleştirilmiştir. Kapakları kapatılan tüpler 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklav edilmiş ve buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.2. *In vitro* SUA Tekniği

Aşılama işlemine geçilmeden önce, aşağıdaki işlemler sıra ile yapılmıştır.

Anaç Tohumların Çimlendirilmesi: Her iki tohum kabuğu soyulan Carrizo citrange tohumları % 0.5'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 10 dakika yüzey sterilasyonu için bekletilmiştir. 3 defa destile su ile çalkalandıktan sonra, %1' lik Difco Bacto Agar ile katılaştırılan Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamı bulunan tüplere üçer tohum ekilerek 27 °C'de sabit sıcaklıkta ve karanlık koşullarda 14 gün süre ile kültüre alınmışlardır. Tohumların ekimi esnasında kullanılan aletler, ekim yapılan katı ortamın bulunduğu deney tüpünün ağız kısmı ve tüpün kapak kısmı her defasında ispirto ocağı kullanılarak steril edilmiş, yatay akışlı steril kabinlerde tohumların ekimi yapılmıştır.

Sürgün Ucunun Elde Edilmesi ve Hazırlanması: Sürgün ucu kaynağı olarak Ç.Ü. Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan Kütdiken limon ağaçlarında gelişen genç sürgünler kullanılmıştır. Sürgünler yaklaşık 1 cm kalacak şekilde fazla yaprakları atılmıştır. Araziden toplanan meristemler daha sonra petri kaplarına alınarak % 0.25'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 5 dakika süre ile steril edilmiş ve 3 kez steril destile su ile çalkalanmıştır.

Anacın Hazırlanması: 14-17 gün sonunda uygun büyüklüğe gelmiş Carrizo citrange çöğürleri tüplerden alındıktan sonra steril koşullarda, epikotil 1-1.5 cm, hipokotil, 4-6 cm uzunluğunda kalacak şekilde kesilmiştir. Ayrıca kotiledonlar ve yan sürgünlerde uzaklaştırılmıştır. Aşılama işlemi için, stereobinoküler mikroskop altında anacın epikotil ucuna 1mm dikey ve 2 mm yatay ters-T keşiği açılmıştır.

Anaç hazırlığı sırasında kullanılan kesici aletler keskin olması bakımından sık sık değiştirilmiş, ateşe tutularak sterilize edilen aletlerin sıcak olmamasına dikkat edilmiştir (Sherwood, 1993).

Aşılama İşlemi ve Aşılınmış Bitkilerin Bakımı: Aşılama işlemi yine sterobinoküler mikroskop altında yapılmıştır. SUA işlemi, ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde alınan meristem dokusu ile ilk iki yaprak primordiasını içeren 0.14-0.18 mm ölçüsündeki sürgün ucu (meristem+2) ve meristem dokusu ile ilk dört yaprak primordiasını içeren 0.18-0.21 mm ölçüsündeki (meristem+4) iki ayrı sürgün ucu ölçüsü kullanılarak yapılmış, iki farklı ölçüdeki sürgün uçlarının her biri, Carrizo citrange anacında açılan ters-T kesiği içine meristematik bölgenin çabuk kuruyabileceği göz önünde bulundurularak çok hızlı bir biçimde yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında kurumayı önlemek için sterilize edilen aletlerin sıcak olmamasına dikkat edilmiş ve çalışma bölgesinin aydınlatılmasında ısınmaya meydan verilmemiştir (Sherwood, 1993).

Sıvı ortamlara aktarılan ve iki yaprak geliştirdikten sonra yan aşılama kullanılan bitkiciklerin turunç anacı ile çok daha iyi kaynaşmasını sağlamak amacıyla anaçta ve bitkicikte mümkün olduğunca uzun kesit alınmıştır.

Kesilen bitkicik, anaçta açılan kesit içine özenle yerleştirilmiş ve şeritler halinde kesilmiş parafilm ile sıkıca bağlanmıştır. *In vitro* bir ortamdan *in vivo* ortama adapte olması amacıyla, iki ucu kesilmiş şeffaf bir polietilen torba yan aşılınmış bitkinin üzerine geçirilerek açık uçları aşı bölgesinden 5-10 cm alt ve üst kısmından bağlanmıştır. Aşının daha iyi kaynaması amacıyla, turuncun yan aşı yapılan bölgesinin üstünde kalan kısmı en uç kısmından itibaren hafifçe eğilerek anacın toprağa yakın yerinden sıkıca bağlanmıştır.

Yan aşı uygulanmış turunç bitkileri 24-26 °C gündüz, 21-23 °C gece sıcaklığına ayarlı kontrollü klima odalarında gelişmeye bırakılmıştır. Aşılardan 10 gün sonra anacın kıvrılan kısmı torba üzerinden kesilmiştir. Aynı zamanda torbanın alt kısmı, bir hafta sonra ise üst kısmı da açılarak torbalar tamamen çıkarılmıştır. Yan aşı uygulanmış bitkide gelişmeyi teşvik amacıyla, aşı yerinin 8-10 cm üzerinden anaç

kesilmiştir. Bitkiler normal gelişmeleri süresince bakım işlemleri uygulanmış ve sulamaları düzenli olarak yapılmıştır.

3.3 SUA' dan Elde Edilen Bitkilerin Turunç Üzerinde İndekslenmesi

SUA çalışması sonucunda elde edilen Kütdiken limon bitkilerinin CYVC hastalığından arınıp arınmadığını araştırmak amacıyla yetiştirilen turunç bitkilerine SUA yöntemi ile geliştirilmiş bitkilerden alınan göz (1 adet) ve kabuk dokuları (2 adet) verilmiş ve turunç yapraklarında gelişen damar açılmaları, yapraklarda gelişen kırışıklık ve buruşukluklara bakılarak belirtiler gözlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca SUA sonrasında gelişen Kütdiken limon bitkilerinin yapraklarında da damar açılması belirtileri gözlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. Ana Materyalde Simptomolojik Olarak Saptanan Patojenin Biyolojik İndeksleme Yöntemi ile Belirlenmesine ait Bulgular**

Ç.Ü Ziraat Fakültesi AUÇ turuncgil koleksiyon parsellerinde bulunan Kütdiken limon (*Citrus limon*) çeşitlerine ait ağaçlarda sarı damar açılması simptomsu yapraklarda, yan damarlar üzerinde farklı boyutlarda sarı renk açılmaları şeklindedir. Damarlardaki renk açılması yeşil renginin sarıya dönmesi ve çizgi şeklinde gelişmektedir. Yapraklar normal boyuttan daha küçük gelişmekte renk açılmaları bazen yaprak yüzeyinde beneklenme şeklinde gözükabilmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. CYVC ile infekteli Kütdiken limon ağaçlarından alınmış yapraklarda gözlemlenen simptomlar. Yan damarlar boyunca görülen sarı damar açılmaları ve yapraklarda meydana gelen kıvrılma ve deformasyonlar

Ayrıca bu simptomların görüldüğü genç yapraklarda kıvrılma ve bükülmelerde gözlemlenmiştir. Arazi simptomlarının ilkbahar ve sonbahar sürgün gelişme döneminde genç yapraklarda daha belirgin olduğu hatta yaz gelişme döneminde olgun yapraklar üzerinde varlığı da belirlenmiştir. Damar açılması simptomsu, yapraklar güneş ışığında daha belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Güneş ışığına tutulan CYVC ile infekteli Kütdiken limon yapraklarında daha belirgin bir şekilde gözlemlenen sarı damar açılması simptomu

Çalışmada indikatör bitki olarak kullanılan turunç (*C. aurantium*) bitkileri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde gözlemlenen Turunçgil Sarı Damar Açılması (*Citrus Yellow Vein Clearing*=CYVC)) hastalığı ile infekteli olduğu simptomolojik olarak belirlenen Kütdiken limon (*C. limon*) çeşidine ait ağaçlardan alınan doku parçaları ile (göz ve kabuk) Mayıs-Haziran ayları arasında aşılansmıştır. Bu aşılama çalışmasıyla hastalığın ana materyalinin biyolojik indeksleme yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır. Böylece Kütdiken parsellerinde simptomolojik olarak belirlenen CYVC hastalığı turunç bitkilerine aktarılmış ve hastalığın belirtileri turunç bitkilerinde gözlemlenmiştir. İndeksleme işlemi yapılan turunç bitkileri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Araştırma Parsellerinde bulunan seralara konulmuş, sulama ve bakım işlemleri düzenli olarak yapılmıştır.

İndeksleme işleminin yapıldığı Mayıs ayından üç ay sonra serada bulunan turunç indikatör bitkilerinde CYVC hastalığına ait simptomlar gözlenmeye başlanmıştır. Bu simptomlar yaprak yan damarları üzerinde farklı boyutlardaki sarımsı bant şeklinde damar açılmaları, beneklenmeler, yapraklarda deformasyonlar

ve kıvrılmalar, yaprak küçülmeleri, bitki boyunda kontrol bitkilerine oranla kısalma, bodurlaşma şeklindedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. CYVC ile infekteli turunç bitkileri üzerinde gelişen farklı boyutlardaki sarı damar açılmaları, yapraklarda hem içe hem dışa doğru oluşan kıvrılmalar

4.2 Sürgün Ucu Aşlamaları

4.2.1. *In vitro* SUA Çalışmalarına Ait Bulgular

In vitro SUA' da anaç olarak Carrizo citrange (*C. sinensis x Poncirus trifoliata*) anaçları kullanılmıştır. Carrizo citrange tohumları soyulup, yüzey sterilizasyonundan sonra daha önceden hazırlanan katı agar ortamına ekilmiş ve inkübatörde karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır.

Tohumların çimlenme sorununu ortadan kaldırmak için önlemler alınmış Kasım-Aralık aylarında hasat edilen tohumlar Giacometti (1986)'nin belirttiği yöntemle muhafaza edilmiştir. Bu yöntemle tohumlar 52 °C' de 10 dakika sıcak su uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Daha sonra % 1'lik 8 Hydroxy-Quinoline Sülfat solüsyonu içerisinde 3 dakika bekletilerek ilaçlama işlemi tamamlanmıştır. Araştırmacı bu yöntemle Florida kaba limon, portakal, Troyer ve Carrizo

citrange tohumları çimlenme kaybı olmadan 1 veya daha uzun yıllar muhafaza edilebildiğini belirtmektedir. *In vitro* SUA için anaçların ekildiği katı ortam hazırlığında herhangi bir sorun yaşanmadığı sürece anaç olarak daha çok 10-14 günlük anaçlar kullanılmıştır. Bazen bu sürenin geçtiği 20-25 günlük anaçlar da çalışmada kullanılmıştır. Ancak 3-4 haftalık anaçların kullanımı aşılama başarısını etkilemiş ve bu anaçlarda aşılma başarısı düşük olmuştur. Benzer şekilde Navarro ve ark. (1975)' larının 15 günlük anaçların öncesinde ve sonrasında aşılama başarısının etkilendiğini belirtmişlerdir.

In vitro SUA işlemleri ilkbahar (Nisan-Mayıs-Haziran) ve sonbahar (Ekim-Kasım-Aralık) olmak üzere iki farklı dönemde yapılmıştır. CYVC hastalığı ile infekteli Kütdiken limon çeşitlerine ait ağaçlardan alınan meristemlerin Carrizo citrange anaçları üzerine aşılama sırasında tohumdan katı ortama ekilerek çimlendirilen ve iki hafta sonunda elde edilen Carrizo citrange anacının epikotil ucuna 1mm dikey ve 2 mm yatay ters-T şeklinde açılarak hazırlanan kesige yerleştirilmiştir. SUA sonucunda meristem dokusu ile ilk iki yaprak primordiasını içeren 0.14-0.18 mm sürgün ucu (meristem+2) ölçüsü kullanılarak aşılama ve sıvı ortama aktarılmıştır. Bu yöntem kullanılarak toplam 16 adet bitkicik elde edilmiştir. Bu bitkiciklerin 6 tanesi sonbahar döneminde, 10 tanesi ilkbahar döneminde elde edilmiştir.

Çalışmada uygulanan ikinci meristem büyüklüğü ise meristem dokusu ile ilk dört yaprak primordiasını içeren 0.18-0.21 mm sürgün ucudur. Bu ölçü kullanılarak aşılama yapılmış SUA yapılmış sıvı ortamlara aktarılmış 20 adet bitkicik elde edilmiştir. Bu bitkiciklerin 8 tanesi sonbahar döneminde, 12 tanesi ilkbahar döneminde elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. CYVC ile infekteli Küt diken limon ağaçlarından alınmış Meristem+4 sürgün ucu ölçüsü kullanılarak Carrizo citrange anaçlarına *in vitro* SUA tekniği ile aşılanmış ve sıvı ortama alınmış bitkicikler

Sonbahar döneminde CYVC ile infekteli simptom gözlenen ağaçlarda sürgün ucu bulmak zorlaştığı için bu dönemde yapılan *in vitro* SUA tekniğinin kullanıldığı bitki sayısı daha az kalmıştır. Bu nedenle ilkbahar döneminde elde edilen aşılanmış bitki sayısı, sonbahar döneminde elde edilen aşılanmış bitki sayısına göre daha fazladır. Arazide CYVC ile infekteli bazı Küt diken limon ağaçlarının yaprakları yolunmuş ve sürgün teşviki için zemin hazırlanmıştır. Ancak rüzgarın etkisiyle çıplak kalan dallarda meristem dal üzerinde kurumaya ve SUA tekniği için bu meristemler kullanılamaz bir hale gelmiştir. Uygulanabilir diğer bir yöntem olarak CYVC ile infekteli bitkilerden alınan dalların laboratuvarda tüp içinde sürgün vermeye teşvik edilmesidir (Navarro ve ark., 1984). Uygulanan bu yöntemde fungal ve bakteriyel bulaşıklıklar bu tekniğin uygulanmasına olanak vermemiştir.

In vitro SUA işleminden sonra sıvı besin ortamına aktarılan 36 adet bitkicığın gelişimleri sırasında bakım işlemleri devam etmiştir. Anaç olarak Carrizo citrange kullanıldığı için oluşan sürgünler tipik üç yapraklı şekilde geliştiğinden aşılama kullanılan Küt diken limon çeşitlerinden belirgin bir şekilde ayırt edilebilmiştir. Anaç

sürgünleri sık sık alınarak, yan aşılama yapılacak olan sürgün ucunun gelişmesine olanak tanınmıştır.

Aşılmalarda *in vitro* olarak çalışılmasına rağmen, bitkilerin geliştiği test tüplerinde bakteriyel ve fungal bulaşmalar kaydedilmiştir. Bu sorunun çözümü için bazen haftada 3 defa olmak üzere genç bitkiler taze ortamlara alınarak, bitki gelişimi için teşvik edilmişlerdir. Buna rağmen bulaşıklık nedeniyle bitki ölümleri de ortaya çıkmıştır.

Mikrobiyal bulaşıklığı önlemek için mücadelede uygulanan diğer bir yöntem ise bulaşık tüplerden alınan aşılı bitkiciklerin kökleri % 96'lık alkol ile silinmiş veya 0.1' lik Sodyum Hipoklorit solüsyonunda 30 saniye tutulduktan sonra üç defa steril suda yıkanmıştır. Böylece bitkinin büyümesine zaman kazandırılmıştır. Ancak uygulanan her iki yöntemde de başarı sınırlı olmuştur. Bu nedenlerden dolayı bitkiciklerin bulunduğu tüplerde meydana gelen fungal ve bakteriyel bulaşıklıklar SUA tekniğinde başarı oranını düşürmüş (% 50), bitkiler iki yaprakçık oluncaya kadar temiz ortamlara aktararak yaşatılmaya çalışılmıştır. Bulaşık olan bitkiciklerin temiz tüplere aktarma işlemi yapılırken yatay hava akışlı kabin içinde çalışılsa bile aktarma işleminden sonra herhangi bir SUA işlemi yapılmamış veya kabin uzun süre çalışır durumda bırakılmış, havaya dağılan fungal etmenlerin uçucu sporların bitkicikleri bulaştırma ihtimalleri göz önünde bulundurulmuştur.

Bulaşıklıkların tekrarlanıp bitki ölümlerinin artmasını engellemek için *in vitro* SUA uygulanmış bitkiler iki yaprakçık geliştirdikçe turunç bitkisine yan aşı uygulamasına geçilmiştir.

SUA çalışmalarında aşılama başarısı genel olarak değerlendirildiğinde saatte 15 kadar bitkinin aşılması gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar sonunda % 35 dolayında sürgün oluşturulmuş bitki elde edilmiştir. Bu değerler bu konuda yapılmış benzeri çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Navarro ve ark., 1975; Tamer, 1988; Şaş, 1991).

4.2.2. *In vitro* SUA Sonrasında Yan Aşılanmış Bitkilere Ait Bulgular

SUA sonrasında elde edilen bitkiciklerin daha hızlı gelişimini sağlamak amacıyla bitkicikler turunç çöğürleri üzerine yan aşı şeklinde aşılarak aktarılmıştır.

Fakat burada dikkat edilmesi gereken bir konu, anaç olarak kullanılan turunçta ve kalem olarak kullanılan Carrizo citrange bitkisinde kesit yüzeylerinin olabildiğince büyük alınmasıdır. Bu şekilde temas yüzeyi artarak besin alışverişi kolaylaştırılmış ve bitki aşılama başarısı daha fazla olmuştur. *In vitro* SUA işlemleri sonucunda elde edilen bitkicikler, turunç anacına yerleştirildikten sonra parafilm ile sarılarak sıkıca bağlanmıştır. Böylece SUA sonrasında elde edilen bitkiler turunç anacında daha hızlı bir gelişme dönemine geçmiş ve yaklaşık 3 ay gibi bir sürede hastalıktan arınıp arınmadığını anlamak için indekleme boyutuna ulaşmıştır. Yan aşılamanın uygulaması sırasında herhangi bir güçlükle karşılaşılmamış ve başarılı bir şekilde turunç bitkilerine aşılama uygulanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SUA sonrasında gelişen bitkilerin turunç anacı üzerine yan aşılama yoluyla aktarılması

İlkbahar döneminde elde edilen meristem+2 yaprakçık sürgün ölçüsü kullanılarak SUA tekniği ile elde edilmiş 10 adet bitkicik turunç bitkisi üzerinde indekleme çalışmasına alınarak hastalıktan (CYVC) temizlenip temizlenmediği kontrol edilmiştir. Sürgün veren bu bitkiciklerde ve yan aşılamanın yapıldığı turunç bitkilerinde yapılan gözlemler sonucunda bitkilerin 4 tanesinde CYVC hastalığına ait

sarı damar açılması, damarlarda beneklenmeler, yapraklarda kıvrılma ve bükülmeler şeklindeki simptomlar 3 ay sonunda gözlemlenmeye başlanmış, 6 tanesinde ise herhangi bir simptoma rastlanmamış ve sağlıklı olarak değerlendirilmiştir. Bu şekilde ilkbahar döneminde CYVC hastalığından arındırmada başarı yüzdesi % 60 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. SUA çalışmaları ve yan aşılama sonucunda elde edilen bitkilerin % arındırılma oranları

Dönem	Meristem Ölçüsü	Bitkicik Sayısı	Sağlıklı Bitki Sayısı	Hastalıklı Bitki Sayısı	% Arındırma Başarısı
İlkbahar	M+2	10	6	4	%60
Sonbahar	M+2	6	4	2	%66
İlkbahar	M+4	12	4	8	%33
Sonbahar	M+4	8	4	4	%50

Sonbahar döneminde elde edilen meristem+2 yaprak sürgün ölçüsü kullanılarak SUA tekniği ile elde edilmiş 6 adet bitkicik turunç üzerine indekslenmiştir. Bu dönemdeki indeksleme çalışmaları sonucunda gelişen bitkiciklerde ve yan aşılama yapılmış turunç bitkilerinin 2 tanesinde sarı damar açılması ve yaprak yüzeyinde yeşil renkten sarıya doğru dönen beneklenmeler şeklinde CYVC hastalığına ait yaprak simptomları gözlenmiş (Resim 6), 4 bitkide ise herhangi bir simptoma rastlanmamıştır. Sonbahar dönemindeki indekslemeler sonucunda elde edilen hastalıktan arı bitki elde etme başarı yüzdesi % 66 olarak belirlenmiştir.

İlkbahar döneminde elde edilen meristem+4 yaprak sürgün ölçüsü kullanılarak SUA tekniği ile elde edilmiş 12 adet bitkicik indeksleme boyutuna ulaştığında bir göz, iki kabuk dokusu alınmış, turunç üzerine biyolojik indeksleme yapılarak hastalıktan arı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Sürgün veren bu bitkicikler üzerinde ve turunç bitkilerinde yapılan gözlemler sonucunda bitkilerin 8 tanesinde sarı damar açılması yaprak simptomları 2 ay sonunda gözlemlenmeye başlanmış, daha sonra yapraklarda meydana gelen simptomlar ise yaprak kıvrılmaları ve bükülmeleri şeklindeki deformasyonlar olarak gözlemlenmiştir. İndekslenmiş bitkilerin 4 tanesinde ise herhangi bir simptoma rastlanmamıştır. İndekslemeler sonucunda yapılan gözlemlere

dayanarak hastalıktan ari temiz bitki elde etmedeki başarı yüzdesi %33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.6. Turunç indikatör bitkileri üzerinde meydana gelen çizgi şeklindeki sarı damar açılması belirtileri

Sonbahar döneminde meristem+4 yaprak sürgün ölçüsü kullanılarak elde edilen 8 adet bitkicik turunç indikatörü üzerine testlenmiştir. Bu bitkilerin 4 tanesinde CYVC hastalığına ait sarı damar açılması, yaprak yüzeyinde beneklenmeler ve yaprak deformasyonları şeklindeki belirtiler gözlenmiş, 4 tanesinde ise hastalığa ait herhangi bir belirtmeye rastlanmamıştır. Yapılan indekslemeler sonucu elde edilen hastalıktan ari temiz bitki elde etme başarı yüzdesi % 50 olarak belirlenmiştir.

SUA aşılama çalışmaları sonucunda ilkbahar döneminde her iki sürgün ucu ölçüsü kullanılarak toplam 22 adet bitki elde edilmiş, sonbahar döneminde bu sayı 14'e düşmüştür. Sonbahar döneminde CYVC ile infekteli Kütdiken ağaçlarından taze sürgün eldesi daha zor olduğu için ilkbahar döneminde elde edilen bitkicik sayısı daha fazla olmuştur.

Yapılan indekslemeler sonucunda ilkbahar döneminde elde edilen toplam 22

bitkiden 10 tanesi sağlıklı, sonbahar döneminde elde edilen 14 bitkiden 8 tanesi sağlıklıdır. Bu şekilde sonbahar döneminde elde edilen sağlıklı bitki oranı (% 57) ilkbahar döneminde elde edilen sağlıklı bitki oranından (% 45) daha fazladır. Bu durumda CYVC ile infekteli Kütdiken limon ağaçlarındaki sürgünlerin yaz sıcaklarında termoterapi etkisine maruz kaldığı ve sonbahar aylarında yapılan SUA çalışmalarının başarı oranını olumlu bir şekilde etkilediği düşünülebilir.

SUA çalışmalarında kullanılan meristem+2 yaprak ölçüsüyle 16 adet bitkicikten turunc bitkisine indekslenmesi sonucu 10 adet sağlıklı bitki elde edilmiş, meristem+4 yaprak ölçüsüyle elde edilen 20 adet bitkiciğin turunca indekslenmesi sonucu 8 adet hastalıktan arı bitki materyali gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre meristem+2 yaprak sürgün ölçüsü kullanılarak elde edilen hastalıktan arı bitki sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Nitekim SUA' da kullanılan sürgün ucu ölçüsü büyüdükçe patojenlerden arınmış bitki elde etme oranı düşmekte fakat aşılama başarısında bir artış meydana geldiği Navarro ve ark. (1976) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar benzer niteliktedir. Bu sonuçlara göre CYVC hastalığı ile bulaşık bitkilerden toplamda 36 adet bitkiden 18 adet sağlıklı patojenden arındırılmış bitki elde edilmiştir. Çalışma sonucunda toplamda temiz bitki elde etme başarı oranı % 50 olarak saptanmıştır.

Navarro ve ark. (1981) yaptıkları çalışmaya göre % 50' lik bir başarı oranı CYVC hastalığını elemine edilebilmesi kolay hastalıklardan biri olarak karşımıza çıkarmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi AUÇ turunçgil koleksiyon parsellerinde bulunan CYVC hastalığı ile infekteli Kütdiken limon (*Citrus limon*) ağaçlarından alınan doku parçaları turunç (*C. aurantium*) bitkisine verilmiş ve hastalığın biyolojik indekslemesi yapılmıştır. Biyolojik indeksleme sonucunda indikatör bitkilerde gözlemlenen semptomlar yapraklarda yeşilden sarı renge doğru değişen damarlarda renk açılmaları ve çizgi şeklinde bantlaşmalar ve sarımsı beneklenmelerdir. İnfekteli yapraklar ışığa tutulduğunda semptomlar daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Aynı zamanda indekslemeden 3 ay sonra normalden küçük yaprak oluşumu ve oluşan bu yapraklarda kıvrılma, bükülme gibi deformasyonlar tespit edilmiştir.

SUA çalışmaları sonucunda ilkbahar döneminde toplam 22 adet bitkicik, sonbahar döneminde ise 14 adet bitkicik elde edilmiştir. Sonbaharda elde edilen bitki sayısı ilkbahar dönemine oranla daha az olmuştur. İlkbahar döneminde bitkiler daha aktif olmasının yanı sıra sonbahar döneminde sürgün gelişiminin daha az olması bunu etkileyen faktörlerdir.

Sonbahar döneminde elde edilen toplam sağlıklı bitki oranı % 57, ilkbahar döneminde elde edilen sağlıklı bitki oranı % 45 olarak saptanmıştır.

SUA çalışmalarında kullanılan meristem+2 yaprak ölçüsüyle 16 adet bitkiden 10 adet sağlıklı bitki elde edilmiş, meristem+4 yaprak ölçüsüyle elde edilen 20 adet bitkiden ise 8 adet hastalıktan arı bitki materyali elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre meristem+2 yaprak sürgün ölçüsü kullanılarak elde edilen hastalıktan arı bitki sayısı daha fazla olmuştur.

CYVC hastalığı ile bulaşık Kütdiken limon ağaçlarından toplam olarak 36 adet bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerin 18 tanesi sağlıklı olup, CYVC semptomu geliştirmemiştir. Temiz bitki elde etme başarı oranı % 50 olarak saptanmıştır.

CYVC hastalığı için biyolojik indekslemede kullanılan turunç çöğürlerinde yan damar üzerinde sarı renkli bantlaşmalar şeklinde renk açılmaları, yaprakların normal boyutunda küçülmeler, boğum aralarında kısalmalar, yapraklarda içeri ve dışarı bükülmeler ve kıvrılmalar şeklinde deformasyonlar oluşmuştur. Turunç çöğürleri hastalığın indekslenmesinde oldukça uygun bir indikatör bitki olup iki ay gibi kısa

sürede bulaşık bitki semptomlarını geliştirmektedir.

KAYNAKLAR

- ALSHAMI, A.A.A., AHLAWAT, Y.S., and PANT., R.P., 2003. A Hitherto Unreported Yellow Vein Clearing Disease of Citrus in India and Its Viral Etiology. Indian Phyto. Soc. Indian Phyto. Vol. 56, no. 4, 422-427 pp.
- ANONİM, 2005 Akdeniz Turunçgil İhracatçılar Birliği, Mersin.
- ANONİM, 2006. Citrus Production in the World. FAO. <http://www.fao.org>
- BAR-JOSEPH, M., MARCUS, R. and LEE, R.F., 1989. Citrus Tristeza Virus (CTV). AAB Descriptions of Plant Viruses no. 353. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol. Wellesbourne, Warwick, UK.
- BHOJWANI, S. S., and RAZDAN, M.M.,1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 520 p.
- BROADBENT, P., 1987. Citrus Budwood Multiplication. FAO Plant Prot. Bull. Vol. 35, no.1, 2-10 pp.
- BOVE, J.M., 1989. Virus-like disease of citrus Pakistan. FAO Report, 56 p.
- BOVE, J.M., 1995. Virus and virus-like disease of citrus in the Near East Region. FAO, Rome eds: 518 p.
- CARVALHO, S. A., SANTOS, A., FRANCISCA, A. and MARCOS, A.M., 2002. Psorosis Virus Complex Elimination from Citrus by Shoot-tip Grafting Associated to Thermoherapy. Fitopatol. Bras. Vol.27 no.3, Brasilia.
- CATARA, A., AZZARO, A. DAVINO, M. and POLIZZI G., 1993. Yellow vein clearing of lemon in Pakistan. In. P. Moreno, J.V.da Graça, L.W. Timmer and J.A. Doods (eds.), Proc. 12th Conf. Intern Organization Citrus Virol. Univ. Press, Riverside. 364-367 pp.
- ÇINAR, A., KERSTING, U., ÖNELGE, N., KORKMAZ, S., and ŞAŞ, G., 1993. Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean region of Turkey. In. P. Moreno, J.V. da Graça L.W. Timmer and J.A. Doods (eds.), Proc. 12th Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Calif. Press, Riverside.

- DEJARDIANS, P.R., J. WALLACE, G.T. LANGE, and R.S. DRAKE., 1957. The Suppression of Tristeza Virus Symptoms in Mexican Lime Seedlings by Heat Treatment. *Plant Disease Repr.* Vol: 41, 230-231 pp.
- DE LANGE, J.H., 1978. Shoot-Tip Grafting A Modified Procedure. *Citrus and Subtrop. Fruit.* Vol:39, no.5, 13-15 pp.
- DOODS, J.H. and ROBERTS, L.W., 1986. *Experiments in Plant Tissue Culture*, Cambridge University Press. 113-121 pp, USA.
- FILHO, H.P.S., 1984 Modified Micro-Grafting Procedure In Citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* Vol:1, 327-329 pp.
- FUTCH, S.H and BRLANSKY, R.H., 2004. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus, *Citrus Industry Magazine.* Vol: 85 no.7 22-23 pp.
- GEORGE, E.F., 1993 *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology, Exegetics* (ed) , England.
- GIOCOMETTI, D.C., 1986. Oranges and Other Citrus in Lepo and Guidelines for Seed Exchange and Plant Introduction in Tropical crops. L.A Withers (eds) *FAO Plant Protection* 76 p.
- GONZALES, M., PENA, I., GONZALES,R., ZAMORA, U., and RODRIGUEZ, I., 1980. Introduccion en Cuba del injerto *in vitro* de apices de brotes en el genero Citrus y generos afines, como una forma de obtener plantas libres de virus. *Agrotecnia de Cuba* Vol: 9, no.2 61-71 pp.
- GÖÇMEN, M.T., 1992. Turunçgillerde *In vitro* Sürgün Ucu Aşılama Tekniğinde ve Bu Yolla Elde Edilen Bitkilerin Yetiştirilmesinde Yapılan Modifikasyonların Aşılama Başarısına ve Bitki Gelişimine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Adana. 70 s.
- GRIMALDI, V., and CATARA, A., 1996. Association of filamentous virus with yellow vein clearing of lemon. In: Moreno, P, J.V. da Graça and R.K. Yakomi (eds.), *Proc. 13th Conf. IOCV Univ. Calif. Press, Riverside, California* 343-345 pp.
- GROWSER, J.W., 1994. *In vitro* culture of tropical fruits. In: Vasil I.K and Thorpe T.A (eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. 475-496 pp.

- JUAREZ, J.L., NAVARRO, L. and GUARDIOLA, J.L., 1976. Obtention de Plant Nucleaires de Divers Cultivars de Clementiniers au Moyen de la Culture de Nucelle *in vitro*. Fruits. Vol: 31, 751-762 pp.
- KNORR, L.C. and CHILD, J.F.L., 1968. Incidence and Spread of Citrus Viruses: Control Methods and Programs. Production of Virus-free Budwood in Citrus-Past, Present, and Future. In W.C. Price (ed.), Proc. 4 th. Conf. Intern. Organization. Citrus Virol. Univ. Florida Press, Gainesville.
- LIN, K.H. and LO, A., 1966. A Preliminary study on Thermotherapy of Yellow Shoot Disease of Citrus, Rev. Appl. Mycol., Vol :45, 1067 p.
- LOO, S.W., 1945. Cultivation of excised stem of asparagus *in vitro*. Am. J. Bot. Vol: 32, 13-17 pp.
- MOREL, G. and MARTIN, C., 1952. Guersion de dahlias atteints d'une malaide a virüs. C.R. Acad. Sci. Paris, Vol :253, 1324-1325 pp.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant Vol:15, 474-497 pp.
- MURASHIGE, T., BITTERS, W.P., RAGA, T.S. NAUER, E.M. ROISTACHER, C.N. and HOLLIDAY, B.P., 1972. A Technique of Shoot Apex Grafting and its Utulization Twords Recovering Virüs-free citrus clones. Hort. Science Vol: 7, no.2, 118-119 pp.
- NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N. and T. MURASHIGE., 1975. Improvement of Shoot Tip Grafting *in vitro* for Virs-free Citrus J.Amer. Soc. Hort. Sci. Vol:100, no.5, 471-479 pp.
- NAVARRO, L., ROISTACHER., C.N. and MURASHIGE, T., 1976. Effects of Size and Source af Shoot Tips on Psorosis-A and Exocortis Content of Navel Orange Plants Obtained by Shoot Tip Grafting *in vitro*. In CALAVAN, E.C., (ed.), Proc. 7th Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Florida Press, Gainesville.
- NAVARRO, L., 1981. Citrus Shoot-Tip Grafting (STG) *in vitro* and its Applications: A Reciew,. Proc. Int. Soc. Citriculture. Vol:1, 452-456 pp.
- NAVARRO, L., BALLESTER, J.F., JUAREZ, J., PINA, J.A., ARREGUI, J.M. and BONO, R., 1981. Devolepment of A Programme for Disease- free Citrus

- Budwood in Spain. Proc. Int. Soc. Citriculture. Bangalore, India. Vol :1977, no.1, 70-73 pp.
- NAVARRO, L., PINA, J. and BALLESTER, J.F., 1984. The Citrus Quarantine Station in Citrus In. S.M. Garnsey, L.W. Timmer and J.A. Doods (eds.), Proc. 9 th. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Calif. Press, Riverside. 365-370 pp.
- NAVARRO, L., 1993. Citrus Sanitaitaion, Quarantine and Certification Programs In. P. Moreno, J.V.daGraça L.W. Timmer and J.A. Doods (eds.), Proc. 12th Conf. Intern Organization Citrus Virol. Univ. Calif. Press, Riverside.
- NEHRA, N.S. and KARTHA, K.K., 1994. Meristem and shoot tip culture : Requirements and applications, In : Vasil I.K and Thorpe T.A (eds), Plant Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. 37-70 pp.
- OLSON, E.O. and ROGERS, B., 1969. Effects of Temperature on Expression and Transmission of Stubborn Disease of Citrus. Plant Disease Repr., Vol :53, 45-49 pp.
- ÖNELGE, N., 2003. Türkiye’ de Limonlarda Sarı Damar Açılması İle İlgili İlk Rapor J. Turk. Phytopath.,Vol.32, no. 1, 53-55.
- ÖZALP, M.O. and HEPER, E., 1974. Ege Bölgesinde Virüssüz Satsuma (Rize) Mandarinini Yetiştirilmesi Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni. Vol: 14, no. 2, 83-100 pp
- ÖZHAN, M., 1967. Monoembriyonik Bazı Turunçgil Çeşitlerinde Nüseller Klonların Elde Edilmesi Gayesiyle Yapılan Araştırmalar. Tarım Bakanlığı Yayını Teknik Kitap, 418 p., Dizergonca Matbaası, İzmir.
- ROISTACHER, C. N., NAVARRO, L. and MURASHIGE, T., 1976. Recovery of Citrus Selections Free of Several Virüses, Exocortis viroid, and *Spiroplazma citri* by Shoot-tip Grafting *in vitro*, In E.C. Calavan (ed.) Proc 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Calif. Press, Riverside.
- ROISTACHER, C.N., 1977. Elimination of Citrus Pathogens in Propagative Budwood. 1. Budwood Selection, Indexing and Thermoteraphy. Proc. Int. Soc. Citruculture. Vol: 3, 965-972 pp.

- SHARMA, S., SINGH, B., RANI, G., ZAIDI, A.A., HALLAN, V., NAGPAL, A.K. and VIRK, G.S., 2008 *In vitro* production of Indian Citrus Ringspoot Virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Vol: 92, 85-92 pp.
- SHERWOOD, J.L., 1993. Applied aspects of plant regeneration. In: Dixon da and Gonzales R. A. (eds), *Plant Cell Culture- A Practical Approach*, Newyork, 135-138 pp.
- SU, H. J. and CHU, J. Y., 1984. Modified Technique of Citrus Shoot-Tip Grafting and Rapid Propagation Method to Obtain Citrus Budwoods Free of Citrus Viruses and Likubin Oranism. *Proc. Int. Soc. Citruculture* Vol: 1, 332-334 pp.
- STUBBS, L.L., 1968. Apparent Elimination of Exocortis and Yellowing Viruses in Lemon by Heat Therapy and Shoot Tip Propagation. In J.F.L. Childs (ed.), *Proc. 4th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Florida Press, Gainesville*.
- ŞAŞ, G., 1991. Turunçgillerde GA³ Uygulaması ve *in vitro* Sürgün Ucu Aşılama Tekniği Kombinasyonunun Psorosis Grubu Hastalık Etmenlerinden Arındırılmış Üretim Materyali Elde Etme Oranına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi Adana. 97 s.
- TAMER, Ş., 1988. Virüs ve Virüs Benzeri Hastalık Etmenlerinin Navel Portakallarından Arındırılması. Doktora Tezi. Adana. 96 s.
- WALKEY, D.G.A., 1985. *Applied Plant Virology*. William Helnemann Ltd, London
- WALLACE, J.M., 1959. A Half Century of Research on Psorosis. Citrus Virüs Disease, Univ. Calif. Div. Agr. Sci. Berkeley, 243 p.
- WEATHERS, L.G. and CALAVAN, E.C., 1959. Nusellar Embryony-A Means of Freeing Citrus Clones of Viruses. In Citrus Disease, ed. J.M. Wallace Univ of California, Division of Agr. Sciences. Berkeley USA.
- WHITE, P.R., 1933. Controlled Differentiation in A Plant Tissue Culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, Vol :66, 567-513 pp.
- ZIMMERMAN, R.H. and JUWARTZ, H. J., 1994. In vitro culture of temperate fruits. In: Vasil I.K and Thorpe T.A (eds), *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dorcrecht, Netherlands, 457-474 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İskenderun'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi İskenderun' da tamamladıktan sonra 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programı'nda lisans eğitimine başladım. 2005 yılında "Ziraat Mühendisi" ünvanı ile mezun oldum.

2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.