

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Murat GÜNEY**

**YURTDIŞINDAN YENİ GETİRİLEN TURUNÇGİL ÜRETİM  
MATERYALLERİNİN *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* YÖNÜNDEN  
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2011**

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YURTDIŞINDAN YENİ GETİRİLEN TURUNÇGİL ÜRETİM  
MATERYALLERİNİN *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* YÖNÜNDEN  
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ

Murat GÜNEY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile  
Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ  
ÜYE

.....  
Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL**  
**Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
**Proje No: ZF2010YL56**

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

**ÖZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YURTDIŞINDAN YENİ GETİRİLEN TURUNÇGİL ÜRETİM  
MATERYALLERİNİN *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* YÖNÜNDEN  
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ**

**Murat GÜNEY**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman :Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ  
Yıl: 2011, Sayfa: 66  
Jüri :Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ  
:Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ  
:Prof. Dr. Yeşim AYSAN

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Seralarında kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş turunçgil üretim materyallerinden, 6 portakal, 6 mandarin, 5 altıntop ve 6 limon çeşidinin virüs (*Tristeza*) ve Spiroplasma (*Spiroplasma citri*) yönünden serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmesi amacıyla 2009–2010 yılları arasında yürütülmüştür.

Çalışmalarda kullanılan üretim materyalleri DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiş ve pozitif kontrol amaçlı kullanılan bitkiler hariç, negatif kontrol bitkilerinde ve diğer üretim materyallerinde *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* enfeksiyonlarına rastlanmamıştır.

PCR çalışmalarında, CTV1 ve CTV10 primer çifti CTV' nin protein kılıf gen 653 bp'lik çoğaltmak amacıyla kullanılmıştır. P58-4f ve P58-4r primer çifti Stubborn' nun putative p58 adhesin-like gen 450 bp'lik mesafeleri çoğaltmak amacıyla kullanılmıştır. RT-PCR çalışması sonucunda, *Tristeza* için sadece pozitif kontrol olarak kullanılan 24 numaralı örnekte agaroz jel de 653 bp' lik band gözlemlenmiş ve diğer örnekler negatif olarak bulunmuştur. Stubborn için ise bütün örnekler agaroz jel de 450 bp' lik band gözlenememiştir.

Bu çalışmada kullanılan çeşitlerin *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* hastalık etmenleri ile bulaşık olmadığı serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Tristeza*, Stubborn, DAS-ELISA, RT-PCR

## ABSTRACT

### MSc THESIS

#### TESTING OF CITRUS PRODUCTION MATERIALS BROUGHT FROM ABROAD IN TERM OF *Tristeza* and *Spiroplasma citri* BY USING SEROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Murat GÜNEY

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ  
Year: 2011, Pages: 66  
Jury :Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ  
:Prof. Dr. Ali ERKILIÇ  
:Prof. Dr. Yeşim AYSAN

This study was conducted on 6 oranges, 6 mandarin, 5 grapefruits and 6 lemons varieties, brought from abroad for production, maintained in greenhouses of Çukurova University, Subtropical Fruits Research and Experimental Centre. These production materials were tested in term of *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* by serological and molecular techniques by 2009 and 2010 years.

The production materials were tested by DAS-ELISA, and except positive control all samples and negative control were found negative for *Tristeza* and Stubborn diseases.

In PCR assays, CTV1 and CTV10 primers couple were used to amplify 653 bp on coat protein gene of CTV; P58-4f and P58-4r primer couple were used to amplify 450 bp on putative p58 adhesin-like gene of Stubborn. In the result of PCR assays, 653 bp band was observed on agarose gel for only sample coded 24 number for *Tristeza* and remaining samples were found as negative; 450 bp bands were not observed on agarose gel for all samples for Stubborn.

It was determined all of varieties used in this study are not infected with *Tristeza* and Stubborn by serologically and molecular techniques.

**Key Words:** *Tristeza*, Stubborn, DAS-ELISA, RT-PCR

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, aydınlatıcı bilgi veren, yapıcı eleştirilerini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ'a teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarım süresince görüşlerine başvurduğum Sayın Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan arkadaşlarım Doktora Örgencisi M. Nasir ROFİQ, Yüksek Lisans Öğrencisi Sevecen DÖKMEZ'e, Ziraat Mühendisi Cemile GÖKSAL ve Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Sekreteri Eda DOĞAN'a yürekten teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen ve beni destekleyen babam İbrahim GÜNEY, annem Eşe GÜNEY, ağabeyim Ahmet GÜNEY'e ve ailemin tüm fertlerine yürekten teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	X
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Turunçgil Tristeza Virüs'ü (Göçüren Hastalığı) .....	2
1.1. Turunçgil Yediverenleşme (Palamutlaşma) Hastalığı .....	4
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	9
3. MATERYAL VE METOD .....	19
3.1. Materyal .....	19
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller .....	19
3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal .....	21
3.1.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyal .....	21
3.1.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....	21
3.1.3.2. PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....	22
3.1.4. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal .....	23
3.2. Metod .....	23
3.2.1. Bitki Materyallerinin Muhafazası .....	23
3.2.2. Serolojik Çalışmalar .....	24
3.2.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları .....	24
3.2.3. PCR Yöntemi .....	26
3.2.3.1. Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi .....	26
3.2.3.2. PCR Çalışmaları .....	27

3.2.3.2.(1). Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi.....	28
3.2.3.2.(2). Primerlerin Oluşturulması .....	28
3.2.3.3. PCR.....	29
3.2.3.4. PCR Yönteminin Uygulaması.....	30
3.2.3.4.(1). <i>Tristeza</i> için RT-PCR .....	30
3.2.3.4.(2). <i>Spiroplasma citri</i> için PCR.....	32
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları .....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	35
4.1. Simptomotolojik Gözlem .....	35
4.2. Serolojik Çalışmalar .....	38
4.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları .....	38
4.3. PCR Yöntemi .....	41
4.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyon Çalışmaları .....	41
4.3.2. PCR Çalışmaları .....	42
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	45
KAYNAKLAR .....	49
ÖZGEÇMİŞ .....	61
EKLER.....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 3.1. <i>Tristeza</i> için kullanılan primerler ve sentezlenen bölgenin moleküler büyüklüğü .....	22
Çizelge 3.2. <i>Spiroplasma citri</i> için kullanılan primerler ve sentezlenen bölgenin moleküler büyüklüğü .....	23





## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 1.1. Türkiye'nin Turunçgil Üretimi (1000 ton) (Foreign Agricultural Service/USDA, 2010) .....	1
Şekil 3.1. Vektörlere karşı çift katlı korumalı seralardaki yurt dışından getirilmiş çeşitlerden bir görünüm (A: Portakal, B: Mandarin).....	19
Şekil 3.2. Bilgisayar kontrollü seralardaki yurt dışından getirilmiş çeşitlerden bir görünüm (A: Portakal, B: Altıntop, C: Limon, D: Mandarin).....	20
Şekil 3.3. ELISA çalışmalarından bir görünüm .....	24
Şekil 3.4. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu çalışmalarından bir görünüm.....	26
Şekil 4.1. <i>Tristeza</i> ile bulaşık bitkide görülen hızlı gelişen ani ölüm (quick decline).....	36
Şekil 4.2. <i>Tristeza</i> ile bulaşık bitkilerden bir görünüm (A: Çiçeklenme, B: Küçük meyveli bitki).....	36
Şekil 4.3. <i>Tristeza</i> ile bulaşık hastalıklı meyve ve sağlıklı meyve görünümü .....	36
Şekil 4.4. <i>Spiroplasma citri</i> ile infekteli turunçgil ağaçlarında sürgün oluşumu (rozetleşme), kaşık şeklinde yaprak oluşumu (A) ve boğum aralarının kısılması (B) görünümü.....	37
Şekil 4.5. <i>Spiroplasma citri</i> ile infekteli ve sağlıklı meyvelerden bir görünüm (A: Üstten görünüş, B: Meyvede iki farklı renk oluşumu, C: Göbeğin kaybolması, C: Eksen çarpıklığı).....	38
Şekil 4.6. ELISA testi sonucunda meydana gelen sarı renk oluşumu, negatif ve pozitif kontroller ve hasta (pozitif kontrol, K) örnek görünümü (A: ELISA sonuçları, B: Örnek numaraları) C: <i>Tristeza</i> S: Stubborn K: Pozitif Kontrol .....	40
Şekil 4.7. <i>Tristeza</i> 'nın Agaroz Jeldeki Total Nükleik Asit Bandları .....	41
Şekil 4.8. <i>Spiroplasma citri</i> 'nin Agaroz Jeldeki Total Nükleik Asit Bandları .....	42
Şekil 4.9. PCR Marker, 1 kb'lik (M) ve pozitif kontrol (24: numaralı örnek; A, B) (A: P1-P6, M1-M6 ve L1-L3 örnekleri; B: L4-L6, A1-A5 ve 25 numaralı örnek) .....	43

Şekil 4.10. PCR Marker (M) ve 450 bp'lik *Spiroplasma citri*, (P1-P6, M1-M6, L1-L6, A1-A5, 24, 25, 26, 27, 28 numaralı örnekler).....45

## SİMGELER ve KISALTMALAR

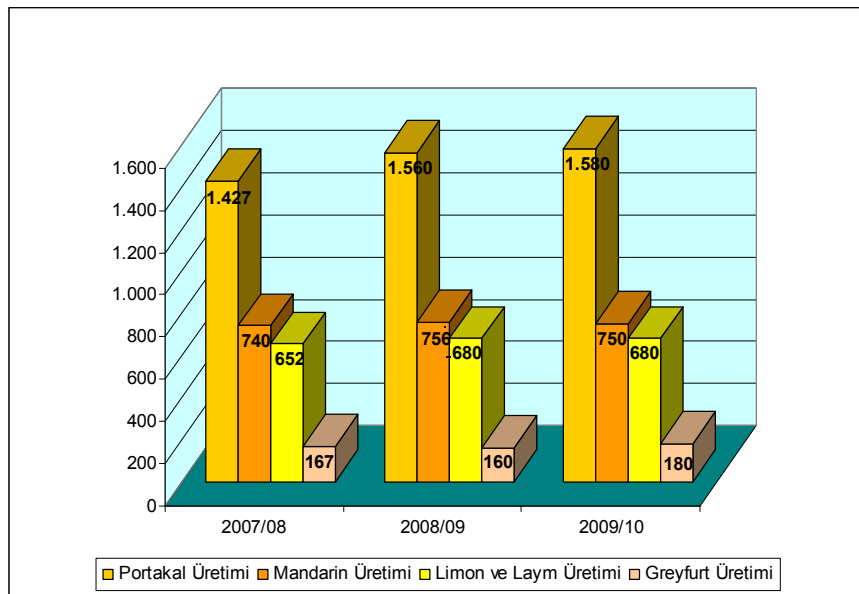
Bp	: Baz çifti
°C	: Santigrad derece
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asid
TTV	: Turunçgil <i>Tristeza</i> Virüsü (TTV)
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
DNA	: Dekosiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	: Ethilenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzim bağlı immunolojik deney (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
gr	: Gram
H <sub>2</sub> O	: Su
Kb	: Kilo baz
µl	: Mikrolitre
M-MLV	: Moloney Murine Leukemia Virus
PBS	: Fosfat Buffer-tuz Tamponu
PCR	: Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pr	: Primer
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>



## 1. GİRİŞ

Turunçgiller, üretim ve ihrac ürünleri arasında dünyada ilk sıralarda yer almaktadır. Dünyada 7,6 Milyon hektarlık alanda 100 milyon ton turunçgil üretimi rapor edilmiştir (FAO, 2007). Turunçgil üretiminin yaklaşık %70'i Kuzey yarım kürede yapılmaktadır. Turunçgil üretimi yapan ülkeler Brezilya, ABD, Çin ve Akdeniz ülkeleri olup bunlar arasında üretim miktarı, kalite ve çeşit açısından farklılıklar görülmektedir. Bu pazar içerisinde Türkiye'nin yıllık turunçgil meyve üretimi (Şekil 1.1) her yıl artarak devam etmekte ve 2007 yılında 2.988 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (FAO, 2007).

Türkiye, Akdeniz ülkeleri içerisinde en önemli turunçgil üreticilerinden birisi konumundadır. Ülkemiz toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak Akdeniz, Ege ve Doğu Karadeniz bölgesinde turunçgil yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde her yıl yaklaşık 92 bin hektar alanda 2,5 milyon ton üretim yapılmaktadır. Yıllık üretim değeri 750 milyon TL olan turunçgilin çoğunluğu yurt içinde tüketilirken % 30'luk kısmı ihrac edilebilmektedir. Türkiye turunçgil üretimi 2,5 milyon ton ile dünya turunçgil üretiminin %2,55'ini karşılarken, 919.000 ton ile dünya turunçgil ihracatının %8'ini karşılamaktadır (Anonymous, 2006).



Şekil 1.1. Türkiye'nin Turunçgil Üretimi (1000 ton) (Foreign Agricultural Service/USDA, 2010)

Turunçgil yetiştiriciliğinde kalite ve kantiteyi olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerden birisi de turunçgil hastalık ve zararlılarıdır (Kranz ve ark., 1977, Ploetzi, 2003). Bunlar arasında virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri, bitkiden bitkiye mekanik yollardan kolaylıkla bulaşabilmeleri, aşı gözüyle ve vektör böcekler aracılığıyla taşınabilmeleri dolayısıyla çok geniş alanlara kısa sürede yayılabilmeleri ve özellikle diğer etmenlerde uygulanabildiği gibi bunlara karşı kullanılacak etkili bir kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması nedeni ile ayrı bir öneme sahiptirler. Az gelişmiş ülkelerde bu tür hastalık etmenlerinden kaynaklanan verim kayıpları %10–50 arasında olmaktadır (Futch ve Brlansky, 2004).

Dünyada turunçgil üretim alanlarında sorun oluşturan 78'den fazla virüs ve viroid hastalığı belirlenmiştir. Ancak bu hastalıklar arasında ülkemizdeki turunçgillerde sorun oluşturan 16 virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni rapor edilmiştir (Nas ve Tekinel, 1973; Cengiz ve Nas, 1976; Çınar ve Önelge, 1992). Ülkemizdeki turunçgillerde sorun oluşturan bu hastalıklar arasında *Tristeza* (Göçüren), *Spiroplasma citri* (Yediverenleşme) hastalıkları, diğer virüs ve virüs benzeri hastalıklara oranla daha yaygın olarak görülmekte ve önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Çınar ve ark., 1993).

### 1.1. Turunçgil Tristeza Virüsü (Göçüren Hastalığı)

Turunçgillerde sorun oluşturan virüs hastalıkları içerisinde son 60 yılın en önemli hastalığı Turunçgil *Tristeza* virüsü (TTV)'dür (Bar-Joseph ve ark., 1989). İspanyolca 'Hüzün' anlamına gelen *Tristeza*, ülkemizde ise "Göçüren hastalığı" olarak bilinmektedir.

*Closteroviridae* familyasının *Closterovirus* cinsinden olan Turunçgil *Tristeza* virüsü 11 nm ile 2000 nm olan ipliğimsi yapıdaki partiküllerden oluşur. Turunçgil *Tristeza* virüsü, iç dokulara özellikle floeme sınırlı ipliksi yapıda virüslerdir (Bar-Joseph ve ark., 1979; Bar-Joseph ve Lee., 1990).

Turunçgil *Tristeza* virüsü hastalığa duyarlı anaçlar üzerine aşılı ağaçlardaki belirtileri; bodurlaşma (slow decline) ve hızlı gelişen ani ölüm (quick decline) veya ani solgunluk, yaprak dökümü ve enfeksiyonu takiben 2–3 ay içinde ağaç ölümü

şeklinde. Hastalığın en karakteristik semptomu aşı yerindeki aşı uyuşmazlığı şeklindeki şişkinliklerdir. Bu şişkinliklerin bulunduğu yerden kabuk kaldırıldığında kabuk ve odun kambiyal yüzeylerinde iğne ucu şeklinde çıkıntılar ve çukurlar oluşurmasıdır (Salibe, 1986). *Tristeza* ile bulaşık ağaçlarda, göçme (decline), çöğür sarılığı (seedling yellows), ve gövde çukurlaşması (stem pitting), küçük meyve oluşumu ve genç yapraklarda çinko noksanlığına benzer lekelenmeler de görülmektedir. Turunçgil *Tristeza* virüsü yaygın indikatör olan Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle)'da damar beyazlaşması, yaprak bükülmesi ve gövde çukurlaşması semptomları ile spesifiktir (Garnsey ve ark., 1987).

Portakal, mandarin, altıntop ve diğer turunçgil çeşitlerini etkileyen en zararlı turunçgil viral hastalıklarından birisi olan *Tristeza* virüsü özellikle turunç üzerine aşılı portakal (*C. sinensis*), mandarin (*C. reticula*) ve altıntop (*C. paradisi*) çeşit ve türlerinde yıkıcıdır (Roistacher, 1991).

Turunçgil *Tristeza* virüsü'nün kökeni muhtemelen Çin olup hastalığın yayılımı hastalıklı turunçgillerin insan aktiviteleri, özellikle bitkisel üretim, aşı ve budamaya bağlı olarak yayıldığı sanılmaktadır. CTV hastalığı tohumla taşınmamakla birlikte yakın mesafelere aşı yoluyla ve vektörlerle non-persistent olarak taşınmaktadır (Lovisol, 1993).

Ülkemiz Akdeniz Bölgesi turunçgil alanlarında bu virüsün vektörleri arasında *Aphis gossypi* ve *A. spiraecola*' ya sıkça rastlanmaktadır. Hastalığın yayılımı ilk İspanya ve İsrail'de gözlemlenmiştir. Diğer ülkelerden Arnavutluk, Cezayir, Kıbrıs, Mısır, İtalya, Lübnan, Fas, Filistin, Tunus ve Türkiye'de hastalığın yayılımı ile ilgili birçok izolat belirlenmiştir (Davino ve ark., 1983; Bar Joseph ve Lee, 1989; Kyriakou ve ark., 1993; Bové, 1995; D'Onghia ve ark., 1998; Stamo ve D'Onghia, 1998; Jarrar ve ark., 2000).

Dünyada ekonomik olarak önemli ve en yıkıcı turunçgil viral hastalıklarından biri olan *Tristeza* (Bar-Joseph ve ark., 1989; Lee ve Rocha-Pena, 1992; Rocha-Pena ve ark., 1995) Türkiye'de ilk kez (Norman, 1963) Doğu Akdeniz ve Ege Bölgesinde (Özalp ve Azeri, 1967) rapor edilmiştir.

Virüslerin saptanmasında çok sık kullanılan ELISA (Bar-Joseph ve ark., 1979; Cambra ve ark., 1991; Rocha-Pena ve Lee, 1991) ve RT-PCR (Nolasco ve



ark., 1993, Roistacher, 1991) yöntemleri *Tristeza* hastalığının tanılanmasında (Cambra ve ark., 1981) çoğunlukla kullanılmakta ve virüsün saflaştırılmasında izlenen aşamaların kontrol edilmesi, virüs miktarının saptanması, bitki bünyesinde virüsün translokasyonunun takip edilmesinde, yaprak bitleri ve in vitro yetiştirilen bitkilerde virüslerin varlığının ortaya konulmasında, sertifikasyon ve eradikasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Ke ve ark., 1984; Cambra ve ark., 1991).

Turunçgil *Tristeza* virüsünün ülkemizdeki varlığı serolojik, RT-PCR ve biyolojik testleme yöntemleri ile (Baloğlu, 1988, Korkmaz ve ark., 2006) belirlenmiştir.

Etmeni bir virüs olan göçüren hastalığının kontrolünde hastalığa dayanıklı anaç seçimi, sürgün ucu aşılama tekniği ile elde edilen sağlıklı bitkilerden üretilmiş fidanlar bahçe tesisinde kullanılmalı, *Tristeza* virüsü ile infekteli ağaçlar imha edilmeli, fidanlar yabancı ot içermeyen koşullarda veya vektörlere karşı çift katlı korumalı seralarda çoğaltılmalı ve hastalığın vektörü olan yaprak bitlerinin mücadelesinde spesifik afit ilacı kullanılmalıdır (Attard, 2004).

## 1.2. Turunçgil Yediverenleşme (Palamutlaşma) Hastalığı

Turunçgil Yediverenleşme hastalığı 1915–1917 yılları arasında Kaliforniya'nın Redland yakınlarındaki Washington Navel portakal bahçelerindeki verimsiz turunçgil ağaçları, anaç üzerinden kesilerek sağlıklı gözlerle tekrar aşılandıklarında tekrar aynı semptomların gözlenmesi sonucunda Waite tarafından bu gelişme tipi 'İnatçı' anlamına gelen İngilizcede "Stubborn" olarak adlandırmıştır. Ancak bu hastalık ilk kez 1929 yılında Perry J.C. tarafından bu isimle tarif edilmiştir (Fawcett ve ark., 1944; Fawcett ve Klotz., 1948).

Bitkilerin ileti demetlerinde bulunan *Spiroplasma citri* sistemik hastalıklara sebep olur. Konukçu bitkilerde lokal lezyonlara neden olmaz. Hücre duvarsız bir bakteridir. 1898 yılından beri bu hücre duvarsız mikroorganizmalar mikoplazmalara benzerliklerinden dolayı 'mikoplazma benzeri organizma' olarak isimlendirilmekteydi. Bu mikroorganizmanın hücre duvarsız olduğu 1967 yılında Japonya'da tespit edilmiştir. Günümüzde kısaca 'mollikütler' olarak da

adlandırılmaktadır. Gram pozitif bir bakteri grubu olan mollikütler, kendi kendine çoğalabilen prokaryotlar içinde en az DNA içeriğine sahip olan mikroorganizmalardır.

Bitkilerin iletim demetlerinden floem'de bulunan mollikütler fitoplazma ve spiroplazma olarak ikiye ayrılırlar. Spiroplazma'lar, spiral morfolojiye sahip, hareketli ve in vitro şartlarda besi yerinde geliştirilebilen mikroorganizmalardır. Taksonomik olarak *Spiroplasma citri* incelendiğinde prokaryot alemi, mollicutes sınıfı, mycoplasmatales takımı, spiroplasmataceae familyası ve spiroplazma cinsine ait bir mikroorganizmadır.

Yapılan bir çalışmada tekrasiklin grubu antibiyotiklerin portakal fidanlarında hastalık simptomunu baskı altında tutması nedeniyle hastalık etmenin bir virüs olmadığı anlaşılmıştır (Igwegbe ve Calavan., 1970). Turunçgil Yediverenleşme hastalığına bir molliküt olan *Spiroplasma citri* sebep olmaktadır.

*Spiroplasma citri* ile infekteli turunçgil ağaçların genellikle hafif ve şiddetli derecede sürgün oluşturduğu, boğum aralarının kısaldığı ve çok sayıda yan gözler oluşturduğu, oluşan sürgünlerin belirgin bir şekilde yukarı doğru (rozetleşme) olduğu görülür (Deluchi 1964; Schinder, 1966; Calavan, 1966). İnfekteli ağaçların yaprak uçlarında beneklenmeler, kaşık şeklinde yaprak oluşumu, yapraklarda mikroelement (Özellikle Zn) eksikliğine benzeyen değişiklikler, vaktinden önce yaprak dökülmeleri, sürgünlerde geriye doğru ölüm ve bitki boyunda kısaltmalar görülür (Calavan, 1968). İnfekteli ağaçlar normalden daha yoğun yaprak taşır ve güneşe doğru eğiliminde artış gözlemlenir (Carpenter ve Calavan, 1969).

Palamutlaşma veya Yediverenleşme Hastalığı adı da verilen bu hastalıkla ile infekteli turunçgil ağaçlarında mevsim dışı çiçeklenmeler, şiddetli derecede deforme olmuş ve palamut şeklini almış ekseni çarpık meyveler bulunur. Navel cinsi portakal ağaçlarında hastalık meyve göbeğinin kaybolmasına ve meyve renginin normalden açık sarı veya sapa yakın kısmının diğer kısma göre daha yeşil renkte olmasına neden olur. Bu tür meyvelerde abortif tohum oluşumu görülür (Childs ve Carpenter, 1961).

Palamutlaşma Hastalığı ile bulaşık meyvelerin tadı yavan, ekşi veya anormal derecede acı olup düşük kalitededir. Hastalık portakal (*Citrus sinensis*) çeşitlerinde

ve en fazla Washington Navel’de zarar yapmakta, ayrıca mandarin (*C. reticula*) ve altıntop (*C. paradisi*), turunç, şadok ve kamkat’larda da etkilidir (Cengiz, 1965).

Turunçgil Yediverenleşme Hastalığı ile ilgili olarak ilk kez Kaliforniya’da 1915 yılında ve 1928’de Filistin’de genç Turunçgil bahçelerinde önemli ekonomik zararlara neden olduğu bildirilmiştir. 1950’li yılların ortalarında Adana, İskenderun ve İçel’de Washington Navel portakal ağaçlarında verim azalması ve çalılışma şikâyetleri üzerine Türkiye’ye davet edilen Chapot, yaptığı çalışmalarda yediverenleşme hastalığının varlığını belirlemiştir (Chapot, 1959).

Turunçgil Yediverenleşme Hastalığı Cezayir, Fransa (Korsika), Kıbrıs, Mısır, İran, Irak, Ürdün, Lübnan, Fas, İtalya (Sicilya), Suriye, Tunus ve Türkiye’yi de içine alan çok sayıda Akdeniz ve Ortadoğu ülkesinde önemli bir sorun olarak görülmektedir (Fawcett ve ark., 1944; Chapot, 1959; Vogel ve Bove, 1974).

Turunçgil Palamutlaşma Hastalığı Doğu Akdeniz Bölgesinde vektörlerle taşınabilen en önemli turunçgil hastalıklarından birisidir (Çağlayan ve Çınar 1990). Hastalık etmeni *Spiroplasma citri* cüce ağustos böceklerinin bazı türleri (*Euscelis plebeius*, *Scaphytopius nitridus*, *Circulifer tenellus*, *C. haematoceps*) tarafından taşınmaktadır (Liu ve ark. 1983; Bove, 1986).

Yediverenleşme Hastalığı olarak da tanımlanan bu hastalığın mücadelesinde; yeni bahçe tesisinde sürgün ucu aşılama tekniği ile üretilmiş sağlıklı fidanlar veya sağlıklı aşı gözü kullanılmalıdır. Hastalıklı ağaçlar sökülüp yok edilmeli (eradikasyon), sağlıklı fidan üretimi yabancı otlardan arındırılmış koşullarda veya vektörlere karşı korumalı seralarda çoğaltılmalı, vektörlere karşı etkin mücadele yürütülmelidir (Attard, 2004).

Dış ticarete son üç yılda Türkiye’nin yaş meyve ve sebze ihracatının yarısının turunçgillerden karşılanıyor olması ve en çok ihracatı yapılan meyve türü olması turunçgil üretiminin Türkiye açısından önemini ortaya koymaktadır.

Ülkemizde daha çok eski sayılabilecek çeşitlerin üretimde hakim olması ve bu çeşitlerle hâlâ bahçe kurulmaya devam edilmesi ve buna bağlı bilinçsiz şekilde yeni tesislerin oluşturulması dış pazarda rekabet gücünü zayıflatmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, iç tüketim ve dış ticarete talep ve rekabet koşullarını artırıcı yeni çeşitlerin üretimi önem kazanmaktadır.

Dünyanın çeşitli turunçgil üreticisi ülkelerinde bulunan yeni çeşitlerin ülkemize getirilmesi bunların ülkemizde çoğaltılarak ülkemiz turunçgil üretimine dahil edilmesi dünya ile rekabet edebilme açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak aşı gözü veya fidan olarak getirilen bu çeşitler ile birlikte çeşitli hastalık ve zararlılar veya vektör böceklerin ülkemize girmesi söz konusu olabilmektedir. Bu bağlamda turunçgil yetiştiriciliği, turunçgil hastalık ve zararlıları ile ilgili olarak diğer turunçgil üreticisi ülkelerle ilişki içerisinde olan Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi zaman zaman ekonomik turunçgil çeşitlerini Merkeze getirebilmektedir. Ancak yukarıda da belirtildiği üzere bu tür bitkisel materyallerin çoğaltılıp üreticiye verilmeden sağlıklı olup olmadıkları yönünden test edilmesi şarttır. Bununla ilgili olarak yapılan bu çalışmada yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş olan bazı turunçgil üretim materyallerinin *Spiroplasma citri* ve *Tristeza* etmenleri yönünden serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgil *Tristeza* Virüsü (TTV) ilk defa Kaliforniya ve İtalya'da *Citrus sinensis* ve *Citrus aurantium* türlerinde bulunmuştur (Meneghini, 1946; Fawcett ve Wallace, 1946, Kitajima ve ark., 1964). Arjantin (Carrera, 1933)'de Turunç (*Citrus aurantium*) anacı üzerine aşılı 10 milyon (Fernandez Valiela, 1963), Brezilya'da ise 1937 ve 1948 yılları arasında 6 milyon (Bitancourt, 1940) ağacı yok eden TTV turunçgillerin en yıkıcı hastalıklarından biridir.

Turunçgil *Tristeza* Hastalığı'nın yaprak bitleri *Toxoptera citricidus* (Kirk.) ile taşındığı ilk defa 1946 (Meneghini) yılında rapor edilmiştir. Daha sonraki yıllarda hastalığın *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* ve *Toxoptera aurantii* (Dickson ve ark., 1951; Norman ve Grant, 1956) ile taşındığı saptanmıştır.

Baloğlu (1988), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgiller üzerine yaptığı çalışmada, arazide symptom gösteren ve göstermeyen ağaçlarda indeksleme çalışmaları, ELISA testi ve elektron mikroskobu ile *Tristeza* virüsünün varlığını ortaya koymuştur. Araştırmacı, yoğun olarak turunç anacının kullanılması, infeksiyon kaynağının ve vektör böceklerden bazılarının bulunmasından dolayı bu virüs hastalığının ülkemiz turunçgilleri için potansiyel bir tehlike oluşturduğunu bildirmiştir. Ayrıca bölgede iki ayrı hafif ırkın mevcut olduğunu ve doğal yayılmanın olabileceğini belirtmiştir.

Ghazanfari ve Dods (1994), *Tristeza* virüsünün ELISA yöntemi ile tespit edilebilmesi için ağaçtan alınacak en uygun doku tipini belirlemek amacıyla yaptıkları bu çalışmada, ağaçların dört bir yanından alınan farklı yaşlarda sürgün, yaprak ve yaprak saplarını kullanmışlardır. Araştırmacılar, *Tristeza* virüsünün ağaçta homojen dağılmadığını, ELISA testlerinde en yüksek okuma değerlerini *Tristeza* ile infekteli ağacın kuzey tarafından alınan ve yeni olgunlaşan yaprakların petiollerinden hazırlanan örneklerin verdiğini, bunu sırasıyla olgunlaşmış sürgünler, taze sürgünler, yaşlı petioller, genç ve yaşlı yaprak laminasının takip ettiğini bildirmişlerdir.

Akbulut ve ark., (1996) yaptıkları çalışmada beş Türk turunçgil *Tristeza* virüsü izolatının protein kılıf gen sekanslarını sıralamışlar ve klonlayarak karşılaştırmışlardır. Filogenetik analiz ile Türk izolatlarının gen sekansları ile şiddetli

gövde çukurlaşması semptomlu Japon *Tristeza*, virüsü izolatu (B53)'nin gen sekanslarının birbiriyle yakından ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Beş izolat ile Japon izolatlar monoklonal antikor MCA13 ile reaksiyon göstermişlerdir.

Turunçgil *Tristeza* virüsünün saflaştırılması, virüse spesifik monoklonal antikorlar elde edilmesi ve virüs izolatları arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan bir çalışmada kolon kromatografisi yöntemi ile daha saf virüs elde edilmiş ve immuno elektron mikroskop yöntemiyle virüsün varlığı ortaya konulmuştur. Saf virüs preparasyonunun spektrofotometrik okunmasında 260/280 oranı 1,2 virüs miktarı da 454 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılmış virüs ile yapılan SDS-PAGE yönteminde iki bant gözlenmiş ve virüsün kılıf proteinlerinin molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 26 kDa olarak belirlenmiştir (Kameroğlu, 2000).

Türkiye'deki Turunçgil *Tristeza* virüsünün 10 izolatu, farklı poliklonal ve 2 farklı monoklonal (3E10 ve MCA-13) antibadi kullanılarak direk doku bastırma (DTBIA) ve DAS-ELISA yöntemleriyle kıyaslanmıştır. Ayrıca bir Satsuma bahçesindeki 258 ağaç DAS-ELISA ve DTBIA yöntemleriyle testlenmiştir. ELISA ve DTBIA yöntemleri ile testleme sonucunda toplam 7 ağacın infekteli 251 ağacın ise sağlıklı olduğu saptanmıştır (Korkmaz, 2001).

Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen üç *Tristeza* izolatının biyolojik, serolojik ve genomik farklılıkları belirlemek için yapılan bu çalışmada, P1 izolatu (Meyer) 1982'de Marrakeck yakınlarındaki bir alandan, P2 ve R1 izolatları 1998 ve 2000 yılında Fas ile İspanyol Klamantinden izolatları kullanılmıştır. P1 izolatu Meksika laymı ve altıntop üzerinde hafif, orta ve şiddetli derecelerde damar açılması semptomları göstermiştir. P2 ve R1 Meksika laymı'nda sadece zayıf damar açılması ve kontrol olarak kullanılan diğer indikatör bitkilerde gövde çukurlaşması ve diğer semptomlar görülmemiştir. Sadece P1 izolatu Monoklonal Antibody MCA-13 ile reaksiyona girmiştir. Ancak bütün izolatlar 3DF1+3CA5 karışımı ile pozitif olarak tepkimeye girmiştir. Bu üç teknik TTV izolatlarının karşılıklı ilişkilerinin ayırt edilmesinde kullanıldığını göstermişlerdir (Lbida ve ark., 2005).

Garnsey ve ark. (2005), 30 ülkeden getirdikleri 266 TTV izolatlarındaki semptomları turunç üzerine aşılı portakal ile Duncan greyfurt, *Madam vinous* portakal ve *Mexican lime* üzerine aşılı bitkilerle karşılaştırmalı olarak

değerlendirmişlerdir. Belirledikleri iki standart izolatu her test için referans olarak kullanmışlardır. Testlemeler de izolatların, TTV simptom şiddetinin yanı sıra spesifik indikatör bitkilerde simptomların azalma kabiliyetleri de belirgin bir şekilde farklılıklar gözlemlemişlerdir. Beş indikatör bitki de gözlemlenen simptom farklılıkları; fidan sarılığı, turunç üzerine aşılı portakallarda bodurluk ile portakal ve greyfurlarda gözlemlenen gövde çukurlaşmasının TTV patojenitesinin değişik kombinasyonlarda ve bağımsız bir şekilde ifadesi olduğu kanısına varmışlardır.

Küba'da Turunçgil *Tristeza* virüsü (TTV)'nün *Toxoptera citricida Kirkaldy* varlığında turunçgil alanlarında ağaçların üretkenlik ömrünü uzatmak için son 10 yıldır uygulanan bir virüs yönetim programında, epidemiyolojik ve TTV'nin karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Program kapsamında her alanda tespit edilen epidemiyolojik değişimlere göre sistematik olarak güncellenmektedir. Elde edilen sonuçlar genel virüs sıklığının bazı bölgelerde düşük oranlarda (%7,73) bazı bölgelerde ise daha yüksek oranlarda (en fazla% 53 kadar) olduğunu göstermektedir (Batista ve ark., 2005).

İtalya'da zor kontrol altına alınan Turunçgil *Tristeza* virüsü (TTV) Apulia (güney-doğu İtalya) İyonya kıyılarında turunçgil bahçelerinde varlığı DAS-ELISA ve Dot-Blot Hibridizasyon testleri ile son zamanlarda tespit edilmiştir. ELISA yöntemi ile 7 farklı ülkeden getirilmiş 27 virüslü bitkinin 21'i tanımlanırken, bu izolatların tümünün TTV ile infekteli olduğu riboprobe ile belirlenmiştir. Ayrıca, *Tristeza* odaklı bir bölgeden rastgele 16 turunçgil örneği alınıp incelediklerinde her 7 örneğin 2'sinin TTV ile infekteli olduğu serolojik ve moleküler olarak tanımlamışlardır (Barbarossa ve ark., 2005).

Barzegar ve ark. (2006) yaptıkları bu çalışmada Kuzey İran'da Mahdasht bahçeleri ve Mazandaran Eyaletindeki turunçgil bahçelerinde Japonya'dan ithal edilmiş infekteli Satsuma ağaçlarından izole edilen dört turunçgil *Tristeza* virüsünün biyolojik ve moleküler özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmaya yönelik TTV ile infekteli Alemow (*Citrus macrophylla Wester*) anaçları üzerine aşılı portakal ağaçlarını toplamışlardır. İzolatların kılıf protein geni 672 bp'lik spesifik primerler kullanılarak çoğaltmışlar ve Sekans analizleri Japon NUagA izolatlarında %97–98



fidan sarılığı, California izolatlarında *Tristeza* virüsü %98–99 gövde çukurlaşması belirtilen semptomları saptamışlardır.

Hırvatistan'da turunçgil yetiştirilen bahçelerde çeşitli Satsuma mandarinlerde (*Citrus unshiu Marc.*) en fazla zarar veren turunçgil patojeninin *Tristeza* virüsü olduğu serolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur. 4 Satsuma çeşidi Ichimaru, Kuno ve Zorica Rana canlı indikatör Meksika laymı (*Citrus aurantifolia* cv. *Swingle*)'nda TTV varlığını belirlemek için biyolojik olarak testlenmiş ve belirtilen semptomlar Satsuma mandarin çeşitlerinin TTV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. olduğunu göstermiştir. Laboratuarda yapılan DTBIA, DAS-ELISA, IC/RT-PCR testlemeleri sonucunda yaprak bükülmesi, kloroz, damar açılması, gövde çukurlaşması ve bodurlaşma belirtilen semptomları saptanmıştır. DTBIA testlemeleri Kuno mandarinlerin %42'sinin TTV ile negatif olduğunu göstermiştir (Hartl-Musinov ve ark., 2006).

Ülkemiz Edremit Körfez Bölgesi'nde yer alan Edremit, Havran ve Burhaniye ilçelerindeki turunçgil bahçelerinde 2005 ve 2006 yılları arasında Satsuma Owari mandarinlerinde virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinden *Tristeza*, Exocortis, Satsuma dwarf ve Psorosis'in varlıklarının belirlenmesi amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Çalışmalarda *Tristeza* virüsünün saptanmasında hem DAS-ELISA hem de biyolojik indeksleme yöntemleri uygulanarak test edilmiş ve 156 örnekten 38'i pozitif bulunmuştur. Ayrıca DAS-ELISA testi sonucunda *Tristeza* için pozitif bulunan örneklerden 6'sı biyolojik indekslemede kullanılmış ve indikatör bitkilerden Meksika lime (*Citrus aurantifolia*)'nda damar açılması (vein-clearing) ve gövde çukurlaşması belirtilen semptomları gözlenmiştir (Korkmaz ve Önder, 2008a).

Ülkemizin üç farklı turunçgil üretim bölgesi olan Edremit Körfezi, Kıyı Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesindeki arazi çalışmalarında (2005–2006) *Tristeza*'ya dayanıklı *Poncirus trifoliata* anacı üzerine aşılı Satsuma cv. owari mandarin ağaçlarından toplanan 119 örnek DTBIA ve DAS-ELISA yöntemleri ile testlenmiştir. DTBIA ve DAS-ELISA testleri sonucunda, 119 örnekten 20'si (%16,8) *Tristeza* ile infekteli olduğunu saptanmıştır. Ayrıca, infekteli 20 örnek ile indeksleme çalışmaları sonrasında turunç anacı üzerine aşılı greyfurt ve portakal ağaçlarında herhangi bir semptom görülmediği, ancak Meksika lime (*Citrus aurantifolia*)'nda

vein-clearing, leaf cupping ve chlorosis simptomları gözlemlenmiştir (Korkmaz ve ark., 2008b).

Ülkemizin beş farklı turunçgil üretim bölgesinde yapılan arazi çalışmalarında (2005–2006) farklı turunçgil çeşitlerinden toplanan 201 örneği turunçgil *Tristeza* virüsü ile bulaşık olup olmadığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmiştir. ELISA testi sonucunda 41 örnek *Tristeza* ile infekteli bulunurken, PCR çalışmalarında ilaveten 13 örnek daha *Tristeza* ile infekteli bitki saptanmıştır (Korkmaz ve ark., 2008c).

Bertolini ve ark. (2008), Bitki dokularında ve yaprak bitlerinde *Tristeza* virüsünün kantitatif tespitinde geliştirdikleri TaqMan Real-time RT-PCR yöntemi ile saflaştırılmış Hedef RNA'yı doku baskı (tissue-print) ve ezilmiş (squash) prosedürlerini kullanarak, yaprak bitleri ve bitki dokularındaki turunçgil *Tristeza* virüs RNA'sının belirlenmesinde kullanmışlardır. Bu yöntem ile farklı bölgeler ve kökenlerden gelen TTV izolatları testlemişlerdir. Kantitatif sınır  $1.7 \times 10^2$  ile  $1.7 \times 10^9$  arası transkript kopyası olarak değişmekte olarak belirlemişlerdir. İnfekteli bir ağacın farklı organlarındaki TTV RNA'sının tahmini sayısı, saflaştırılmış RNA'ların şablon olarak kullanıldığı ve  $1.9 \times 10^4$  ile  $3.7 \times 10^6$  arası (tissue-printed) (doku baskı) doku malzemesi olarak değerlendirildiğinde  $4.5 \times 10^5$  ile  $6.5 \times 10^8$  arası olarak belirlemişlerdir. Yaprak bitleri kopya sayısı ise  $1.23 \times 10^5$  ile  $4.73 \times 10^3$  arasında değişkenlik gösterdiğini saptamışlardır.

Yokomi ve ark. (2009), Kaliforniya'da Turunçgil Klonal Koruma Programı kapsamında yaklaşık 40 yıldır kurulu olan koleksiyonlardan aldıkları temsili izolatlar ile son zamanlarda yayılım gösteren izolatların filogenetik ilişkisinin tespiti ve genetik farklılıkların belirlenmesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında 385 izolata spesifik probler ile RT-PCR, MMM analizi, SSCP yöntemini kullanarak değerlendirmişlerdir. İzolatların % 90'dan fazlası T30 genotipine sahip olduğu ve izolatların 37'si standart olmayan (NS) TTV genotip yapısında olduğunu saptamışlardır.

Roy ve ark. (2009), *Tristeza* virüsü genotiplerinin ayırt edilmesi ve eş zamanlı belirlenmesi için Simplex ve hexaplex RT-PCR testlerini geliştirmişlerdir. *Tristeza* virüsü; simptomları, nükleotid homoloji ve filogenetik analizlerine bağlı olarak beş

genotip içinde gruplandırmışlardır. Bu genotipleri; T3, T30, T36, VT ve B165 olarak tasarlamışlardır. Gen Bankasından gelen genotipik TTV nükleotid gen dizisi verilerine dayanarak spesifik primerler hazırlamışlardır. Kontrol P18 geni dahil olmak üzere beş genotipinde eşzamanlı belirlenmesinde Hexaplex-RT-PCR yöntemini kullanılarak çoğaltmışlardır. Hex-RT-PCR sonuçlarının doğruluğunu dizi analizi yöntemi ile karşılaştırmalı olarak ortaya çıkarmışlardır.

Yokomi ve ark. (2010b), Kaliforniya Exeter yakınlarındaki Lindcove Araştırma ve Yayın (Extension) Merkezinde, 2007 yılı baharı, 71 hektarlık alanda turunçgil *Tristeza* virüsü ile bulaşıklı en az 50 ağaç tespit etmişler ve yaptıkları bu çalışma ile izolatların yaprak biti ile taşınabilirliğini ve genetik çeşitliliklerini değerlendirmişlerdir. Temsili dokuz ağaçtan alınan örneklemelerle ELISA, RT-PCR, çoklu moleküler markır testi, Protein kılıf (CP) gen analizi ve vektör taşınımı ile ilgili testler yapmışlardır. Dokuz izolatında T30 genotipine sahip olduğunu saptamışlardır. Analizler, yaprak bitlerinin % 12,5'luk genel bir etkinlik gösterdiği ve TTV' yi 9 temsili ağaçtan 5'ine taşıdığını göstermişlerdir. Merkez arazide turunçgil alanında yaptıkları surveyi ile 1296 ağacın %1,2 oranda TTV ile infekteli olduğunu belirlemişlerdir.

Yokomi ve ark. (2010c), *Tristeza* virüsünün potansiyel ciddi izolatlarının belirlenmesi ve TTV tüm izolatlarının tespiti için bir multipleks Taqman tabanlı RT-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Protein kılıf (CP) gen dizilerine dayanan bir TTV TaqMan prob (TTV-CY5) evrensel CTV izolatlarının tespiti için tasarlanmışlardır. Üç izolata spesifik proplar, multipleks bir reaksiyonda TTV izolatu ayrımı için iki coat protein genleri (CPi) arasında hedef intergene dizileri geliştirmişlerdir. Prob CPi-SP, TTV izolatlarından fidan sarılığı (TTV-SY), portakal ve greyfurtlarda gövde çukurlaşması (TTV-SP)'nı belirlemede VT ve T3 genotipleri için; Prob CPi-T36 ise T36 genotipleri için tasarlamışlardır. Ayrıca, Prob CPi-T36-NS Kaliforniya'da bir dış grup clade izolatları belirlenmede hafif T36 benzeri genotipler için tasarlamışlardır.

*Spiroplasma citri*'nin neden olduğu Yediverenleşme Hastalığının en önemli semptomlarının yapraklarda ve sürgünlerde hafif ve şiddetli derecelerde sürgün (rozetleşme) oluşumu, kaşık seklinde yaprak oluşumu, meyvelerin palamut şeklini alması, geciken veya düzenli olmayan yeşillenmeler ve mavi albedo oluşumu ile

abortif tohum oluşumu olduğunu rapor etmiştir. Mavi albedo simptomuna tarla koşullarında artan *Spiroplasma citri* ile bulaşık altıntop, portakal ve tanjelo ağaçlarında rastlandığı belirtilmiştir (Olson, 1969).

Saillard ve ark. (1978), Fas ve Korsika' dan topladıkları Cüce ağustos böceklerinde *Spiroplasma citri*'yi ELISA tekniğiyle saptamışlardır. ELISA yönteminin hem kültüre alınmış *Spiroplasma* 'ları hem de bitki veya böceklerdeki etmeni direkt olarak saptamak için kullanılabilceği belirlemişlerdir.

Archer ve ark. (1982), yaptıkları bir çalışmada konukçu böcekte ve bitkide *Spiroplasma citri*' nin varlığının belirlenmesinde ELISA yönteminin duyarlı bir metot olduğunu göstermişlerdir. Yaprak biti *Euscelidius variegatus*'da *Spiroplasma citri*'nin çoğaldığını ELISA yöntemi ile testleyerek ortaya koymuşlardır. Böylelikle Yediverenleşme hastalığının vektörlerinin belirlenmesinde ELISA yönteminin uygun bir teknik olduğunu göstermişlerdir.

Çağlayan ve Çınar (1990) yaptıkları bu çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesindeki Valensiya ve Navelina portakal çeşitleri, Minneola tangelo, Fremont ve Encore mandarin çeşitleri ve Star Ruby altıntop çeşitlerinde Yediverenleşme hastalığı etmeni *Spiroplasma citri*'yi Deformasyon ve Büyüme Engelleyici testleri, Dikey Jel Elektroforez ve ELISA testleri uygulayarak göstermişlerdir. Deformasyon testi ile Washington Navel ve İsrail (SPA) izolatlarının homolog anti serumlarının 1:10240 ve 1:2560 olarak tespit etmişler. Büyüme engelleyici testinde SPA 5 mm anti serum ile 10 mm homolog anti serum genişliğindeki bir tabakada hiçbir engelleyicinin olmadığı saptamışlardır. 1-dikey jel elektroforez ve ELISA testleriyle de deformasyon ve büyüme engelleyici testlerinden elde edilen bulguları doğrulamışlardır.

Kersting ve Şengonca (1992) yaptıkları bu çalışma da *Spiroplasma citri*' nin üç yeni yaprak biti *Balclutha hebe*, *Cicadulina bipunctella* (*Cicadulina bipunctata*) ve *Orosius orientalis* ortaya çıkarmışlardır.

Doğu Akdeniz Bölgesinde yaptıkları bir araştırmada Yediverenleşme hastalığının dört konukçu bitkisi saptanmış ve bunlar içerisinde en önemli konukçunun susam (*Sesamum indicum*) olduğu bulunmuştur (Kersting ve ark., 1993).

Bitkinin iletim demetlerinde sınırlı kalan hastalık etmeni *Spiroplasma citri* çeşitleri arasındaki genetik farklılıkları göstermek ve yeni izolatları ortaya çıkarmak amacıyla 1980 ile 1993 yılları arasında Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) ile çoğaltılan 35 *Spiroplasma citri* izolatı 2005–2006 yıllarında çoğaltılmıştır. Analizlerde 20 primer çifti kullanılarak önemli oranda izolatlar arasındaki farklılıkları açığa çıkarmışlardır. Ancak, 15 yıl önce toplanan örnekler ile son zamanlarda toplanan izolatlar karşılaştırıldığında genetik bilgiler de benzerlikler olmadığını saptamışlardır. RAPD ile 5 band diziliminde *Spiroplasma citri*'nin farklı izolatlarına ait gen dizilimlerini saptamışlar ve DNA'yı modifiye eden enzim, zarda yer alan lipoproteini kodlayan fragmentler (DNA parçaları) ve virüs fragmentlerini gösterilmişlerdir. Ancak izolatlar arasında farklılıklar olmadığı PCR sonuçları ile açığa çıkmıştır (Mello ve ark., 2008).

Yokomi ve ark. (2008) yaptıkları bu çalışmada turunçgil palamutlaşma hastalığının belirlenmesinde *Spiroplasma citri*'nin P58 ve P89 gen sekanslarını esas alan primerler kullanılarak, Kern County (Kaliforniya, ABD)'deki iki turunçgil bahçesinden alınan örneklerin PCR analizleri geleneksel metotlar kullanılarak patojenin kültürleri ile karşılaştırmalarını yapmışlardır. PCR sonuçları kullanılan primerler de zamana bağlı olarak örnekler % 85 ile % 100 arasında kültürleri eşleştirilmiştir. PCR ile örneklerin negatif kültürlerinde *Spiroplasma citri*'nin varlığını saptanmışlardır. İzolatların P58 primer çiftleri ile farklı reaksiyon göstermeleri eski ve yeni izolatlarda iki farklı *Spiroplasma citri* popülasyonundan kaynaklandığını saptamışlardır. Ayrıca turunçgil palamutlaşma hastalığının tekrar oranı bahçelerde % 3,7 ile % 58,3 olarak saptamışlardır. Bu sonuçlar *Spiroplasma citri*'nin ortaya çıkartılmasında Real-time PCR'ın iyi bir yöntem olduğunu göstermişlerdir.

Mello ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada Yediverenleşme hastalığı şiddetinin bakteriyel genotipi ile değil *Spiroplasma citri* popülasyonu ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Turunçgil üretiminde *Spiroplasma citri*'nin neden olduğu Yediverenleşme hastalığının etkisi infekteli ağaçlardaki hastalık şiddeti ile bakteriyel popülasyonu ile ilişkileri bulunmadığını saptamışlardır. Kantitatif PCR, şiddetli

simptomlu ağaçların hafif simptomlu ağaçlardan meyvede *Spiroplasma citri* popülasyonunun yaklaşık 6000 kez yüksek olduğunu göstermiştir.

Kubaa ve ark. (2009), Suriye’de turunçgil bahçelerinde Yediverenleşme hastalığı etmeni, *Spiroplasma citri*’nin moleküler yöntemlerle saptamaya yönelik yaptıkları bu çalışmada, Eylül 2008’de, Kolumela 130 simptomlu ve simptomsuz ağaçların meyvesinden toplamış örneklerde *Spiroplasma citri*’de varlığının tespiti için Bari Üniversitesine göndermişlerdir. DNA ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı konvansiyonel PCR (conventional and real-time PCR) yönteminde, sırasıyla, P58-6f/4r ve p58 3f/4r primer çiftleri kullanarak, Yokomi ve arkadaşlarına göre testlemişlerdir. İki farklı bahçeden (Lattakia 11 ve 1 Tartous olarak) on iki portakal ağacı (% 9,2), *Spiroplasma citri* testlerinde pozitif olarak tespit edilmiştir.

Mello ve ark (2010a), Kaliforniya’da Yediverenleşme hastalığının epidemiyolojisi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Seçilen iki ticari bahçedeki hastalık oranı; kültüre alma ve spesifik PCR kullanılarak, sırasıyla, örnekleme tekniğine bağlı olarak, % 46-85 ile % 1-4 arasında çeşitlilik göstermiştir. Şiddetli veya hafif simptomlu ağaçlarda meyve kalitesi ve verimi ile 2006 ve 2007 yıllarında Kaliforniya’da *Spiroplasma citri*’den arı bir bahçedeki ağaçların meyve kalite ve verimini karşılaştırmışlar ve infekteli ağaçlar *Spiroplasma citri*’den arı ağaçlardan %30 daha düşük verim ve meyve kalitesinde olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, son zamanlarda Kaliforniya toplanan 34 *Spiroplasma citri* izolatu ile ABD ve Akdeniz bölgesinden 20 yıl önce getirilmiş 35 *Spiroplasma citri* izolatu, RAPD markırları kullanarak karşılaştırmışlar ve bölgesel veya toplanma zamanına bağlı olmayan önemli genetik farklılıklar tespit etmişlerdir. Ticari bahçelerde hastalık oranı % 84,8 ve meyve kalitesi ve verimi üzerine etkisi önemli olmakla beraber daha yüksek değerlerde de olabileceği sinyali vermiştir.

Kaliforniya’da *Spiroplasma citri*’nin neden olduğu Stubborn hastalığının etkisi tam olarak anlaşılmış veya ölçülmemiş olması üzerine yapılan bu çalışmada turunçgil üretiminde *Spiroplasma citri* infeksiyonunun etkisini ölçmek ve farklı simptomlu ağaçlarda bakteriyel dağılım değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarda ölçümlere; üretim serası gölgeliği, yüksekliği, genişliği, gövde çapı ve meyve sayısı ve erken hasat meyve sayısını da dâhil etmişlerdir. Ağaç başına 30

meyve tartılmış, ölçülmüş ve renk, boyut ve güneş yanığı için değerlendirilmişlerdir. Meyve suyunu ekstrakte edip tartmışlar ve toplam kuru madde ve titre edilebilir asit miktarını ölçmüşlerdir. İnfekteli ağaçlarda meyvelerin deforme olma olasılığı sağlıklı ağaçlardan daha fazla olup, meyveler daha küçük, daha biçimsiz olarak gözlemlenmişlerdir (Mello ve ark., 2010b).

Yokomi ve arkadaşları (2010a) Real-time PCR kullanarak turunçgil yetiştirilen alanlarda Stubborn hastalığı yaygınlığının tahminine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Real-time PCR yöntemini, *Spiroplasma citri* P58 putative adhesin multigen dizilimine bağlı primer çifti P-58-3f/4r ve DNA bağlayıcı florofor SYBR Green kullanılarak *Spiroplasma citri*'nin tespit etmek için geliştirmişlerdir. Kaliforniya merkezi iki ilçesinde beş test alanından toplanan 1239 ağaç Real-time PCR testlenmiş ve hastalığın tahmini oranları % 4,2, % 22,4, % 28,6 ve % 58 olarak saptanmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

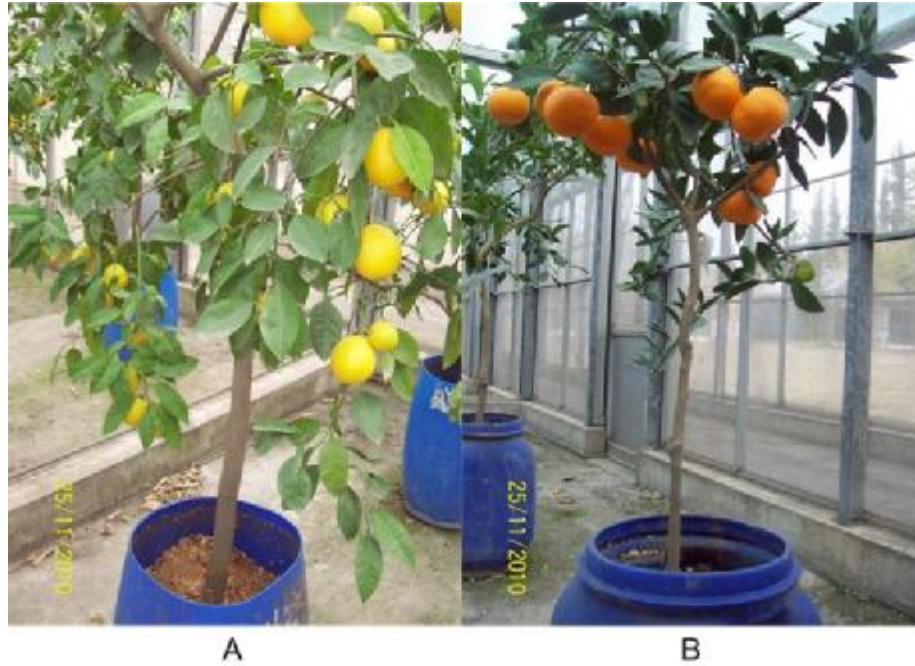
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller

Araştırma, Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı ve araştırma seralarında yürütülmüştür.

Araştırmalarda bitki materyali olarak Merkez Seralarında kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından getirilmiş bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitleri kullanılmıştır (Şekil 3.1; 3.2).

Çalışmalarda kullanılan bitki materyallerinden portakal çeşitleri P1, P2, P3, P4, P5, P6, mandarin çeşitleri M1, M2, M3, M4, M5, M6, altıntop çeşitleri A1, A2, A2, A4, A5, limon çeşitleri L1, L2, L3, L4, L5, L6 olarak kodlanmıştır. Ayrıca çalışmalarda kullanılan kontrol bitkiler ise; 24 (=pozitif kontrol, *Tristeza*) ve 25, 26, 27 (=negatif kontroller) olarak kodlanmıştır.



Şekil 3.1. Vektörlere karşı çift katlı korumalı seralardaki yurt dışından getirilmiş çeşitlerden bir görünüm (A: Portakal, B: Mandarin).





Şekil 3.2. Bilgisayar kontrollü seralardaki yurt dışından getirilmiş çeşitlerden bir görünüm (A: Portakal, B: Altıntop, C: Limon, D: Mandarin).

### 3.1.2. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından getirilmiş bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitlerinden alınan bitki dokuları materyal olarak kullanılmıştır. *Tristeza* virüsü için bitki materyallerinin sürgün kabuk doku ekstraktları, *Spiroplasma citri* için ise aynı bitki materyallerinin yaprak sapı ve orta damar ekstraktları kullanılmıştır.

Serolojik bir tanı yöntemi olan DAS-ELISA Testlerinde; *Tristeza* ve *Spiroplasma citri*'ye spesifik ELISA kitleri, ELISA pleyti, tampon çözeltiler (Ek1) kullanılmıştır.

### 3.1.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyal

Moleküler bir tanı yöntemi olan PCR çalışmalarında ise, total nükleik asit ekstraktları, primerler, enzimler ve diğer PCR malzemeleri ve ELISA testinde kullanılan doku örnekleri kullanılmıştır.

PCR yönteminde, araştırmada kullanılan bitki materyallerinden elde edilen total nükleik asitler, RT enzimi, RT buffer, Taq polimerase enzimi, dNTPs, RNase inhibitör, çeşitli tampon çözeltiler, virüse spesifik primerler, agarose, ethidium bromide ve elektroforez aparatı materyal olarak kullanılmıştır. PCR çalışmaları, Çizelge 3,1; 3,2.'de belirtilen primerler kullanılarak yapılmıştır.

#### 3.1.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmalarında Kullanılan Materyal

*Tristeza* virüsü için bitki materyallerinin sürgün kabuk doku ekstraktları, *Spiroplasma citri* için ise aynı bitki materyallerinin yaprak sapı ve orta damar ekstraktları çalışma materyalini oluşturmuştur.

Total RNA ekstraksiyonu işleminde; steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler, eppendorf tüpleri ve MIKRO 22 R marka masa tipi soğutmalı santrifüj

kullanılmıştır. Total RNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan solüsyonlar Ek2’de yer almaktadır.

### 3.1.3.2. PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal

PCR yönteminde, total Nükleik Asit ekstraksiyonu çalışmaları sonunda, *Tristeza* olmayan üretime yönelik testlenen bitkilerden elde edilen total nükleik asit ekstraktları materyal olarak kullanılmıştır.

RT-PCR işlemi, Moloney Murine Leukaemia Virus’ den oluşan reverse transcriptase (MMLV-RT, 200U/μl, Fermentas, EP0441) enzimi ve reverse transcriptase reaksiyon tampon çözeltisi, Taq polymerase enzimi (Termostabil DNA polymerase enzyme, 5U/μl, Fermentas, EP0401) ve reaksiyon tampon çözeltisi, dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 25 mM, Fermentas), PCR buffer (Dream Taq Gren DNA Polymerase+MgCl<sub>2</sub> (10X)) RNase inhibitör (40U/μl Fermentas, EO0311), 1 kb DNA marker (Fermentas), çeşitli tampon çözeltiler, saf su, pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri ve Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.’de verilen *Tristeza* ve *Spiroplasma citri*’ ye spesifik primerler (10mM) kullanılarak yapılmıştır.

Ayrıca çalışmalarda, elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla ticari olarak temin edilen 2X PCR Master Mix (Fermentas)’ de kullanılmıştır. Virüsün ve viroidin genomu üzerindeki hedef bölgelerin çoğaltılması işlemi gerekliliği sıcaklıklar, TECHNE GENIUS marka Thermocycler aleti kullanılarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. *Tristeza* için kullanılan primerler ve sentezlenen bölgenin moleküler büyüklüğü

Primerler	Baz Dizilimi	Moleküler Büyüklüğü (bp)	Niblett ve ark., (2000)
CTV 1	ATGGACGACGAAACAAAGAA	1	
CTV 10	ATCAACGTGTGTTGAATTCC	653	

Çizelge 3.2. *Spiroplasma citri* için kullanılan primerler ve sentezlenen bölgenin moleküler büyüklüğü

Primerler	Baz Dizilimi	Moleküler Büyüklüğü (bp)	Yokomi ve ark., (2010a)
P58-4f P58-4r	CGGACAAATTAAGTAATAAAAGAGC GCACAGCATTGCCCAACTACA	.... 450	

### 3.1.4. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, total Nükleik Asit ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen *Tristeza* ve / veya *Spiroplasma citri*'ye ait total Nükleik Asit'ler ile PCR çalışmaları sonunda elde edilen PCR ürünleri materyal olarak kullanılmıştır.

PCR ürünlerinin molekül ağırlıklarının kontrolü için kullanılan 1 kb DNA marker Fermentas firmasından temin edilmiştir.

Agaroz jel elektroforez işleminde, agaroz, tampon çözeltiler, DNA elektroforez cihazı ve güç kaynağı (BIORAD), jel görüntüleme cihazı (Ultraviolet Transilluminator)'dan yararlanılmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Bitki Materyallerinin Muhafazası

3.1.1' de belirtilen bitkilerden sap, gövde, yaprak kısımlarından alınan örnekler plastik torbalara konularak, etiketlenip, 7-10 gün gibi kısa bir süre için +4°C'de, daha uzun süre için ise -20 °C'de muhafaza edilerek DAS-ELISA testi ve PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

### 3.2.2. Serolojik Çalışmalar

Yurt dışından yeni getirilen üretim materyallerinin, simptomotolojik olarak *Tristeza* ve / veya *Spiroplasma citri* ile bulaşık olup olmadığı araştırmak amacıyla öncelikle Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA ile testlenmiştir.

Yapılan ELISA testlerinde kullanılan pleytlerin her birinde, örnek tampon çözeltisi ve sağlıklı ağaçlardan alınan veya firmalardan ticari olarak temin edilen dokular ile hazırlanan ekstrakt olmak üzere iki farklı negatif kontrol ve *Tristeza* veya *Spiroplasma citri* ile bulaşık ticari olarak temin edilmiş bir pozitif kontrol karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. ELISA testlerinde kullanılan tampon çözeltiler ile bunların hazırlanması Ek1’de verilmiştir.

ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol için 405 nm’de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

#### 3.2.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

*Tristeza* ve *Spiroplasma citri* etmenlerinin belirlenmesinde DAS-ELISA testi Clark ve Adams (1977)’in belirttiği yöntemeye göre ve koşullarımıza uygun şekilde modifiye edilerek uygulanmıştır (Şekil 3.3). Tampon çözeltileri Ek1’de verilmiştir.



Şekil 3.3. ELISA çalışmalarından bir görünüm

ELISA testinin uygulanmasında izlen basamaklar sırasıyla:

**a.** Tristeza ve *Spiroplasma citri*'ye spesifik  $\gamma$ -globulin, firmanın bildirdiği prosedüre göre kaplama tamponu (EK 1) ile belirlenen oranda sulandırılıp, ELISA pleytinin her bir çukuruna 200  $\mu$ l eklenip, 37  $^{\circ}$ C de' 4 saat inkübe edilmiştir.

**b.** İnkübasyon sonrası yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu çözelti 3'er dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek pleyt boşaltılmıştır. Bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir.

**c.** Örnek tampon çözeltisinde 1/10 oranında sulandırılıp ekstrakte edilen örnekler, alt alta gelecek şekilde her bir çift çukura 200  $\mu$ l eklenmiştir. Ayrıca, testlenecek örnekler haricinde bir sağlıklı bitki ekstraktı, bir tampon çözelti kontrol ve birde pozitif örnek ekstraktı kontrol amaçlı konularak +4  $^{\circ}$ C' de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

**d.** İnkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu ile 2. madde de belirtildiği şekilde tekrar yıkanmıştır.

**e.** Konjugate tamponu ile optimum konsantrasyona göre sulandırılmış konjugat' dan her bir çukura 200  $\mu$ l konmuş ve pleyt 37  $^{\circ}$ C' de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

**f.** İnkübasyondan sonra pleytler yıkama tamponu tekrar yıkanmıştır.

**g.** Substrat tamponunda taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 200  $\mu$ l konmuş ve pleytler, 30-60 dk. veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.

**h.** İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için her bir çukura 50  $\mu$ l 3 M NaOH ilave edilmiştir.

**ı.** Ölçümler, ELISA okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

ELISA testlerinde, her bir pleytte pozitif kontrol, negatif kontrol ve tampon çözelti olmak üzere üç kontrol kullanılmıştır. Testin çalışıp çalışmadığı pozitif kontrol ve tampon çözeltini bulunduğu çukurlara bakılarak karar verilmiştir. Pozitif kontrolün yüksek absorbans değerli, tampon çözeltinin ise düşük absorbans değerli olduğu durumlarda testlerin çalıştığı kabul edilmiştir. Ayrıca testlerin değerlendirmesinde, negatif kontrolün bulunduğu çukurlardan elde edilen absorbans

değerlerinin ortalamasının iki veya üç katı değerler veren çukurlardaki örnekler hastalık ile bulaşık kabul edilmiştir (Bar-Joseph ve ark., 1979; Roistacher, 1991).

### 3.2.3. PCR Yöntemi

#### 3.2.3.1. Total Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi

ELISA testlerinde kullanılan bitkilerden alınan dokular total Nükleik asit (tNA) ekstraksiyonu çalışmaları için kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu çalışmalarından bir görünüm

Astruc ve ark., (1996)'nın önerdiği yönteme göre yapılmış olan tNA ekstraksiyonu için izlenen basamaklar sırasıyla;

**a-** Çalışmada kullanılacak her bir örnek için 1 gram alınıp sıvı azot yardımı ile havan-havaneli kullanılarak ezildikten sonra ekstraksiyon tampon çözeltisinde (100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA b-pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000)) 1:2 (w/v) oranında sulandırılarak ekstrakte edilmiş ve steril tülbentten süzölmüştür.

**b-** Bu bitki öz suyundan 1ml alınmış ve eppendorf tüpler içerisine konmuş ve örneklerin olduğu tüpler 3 dakika 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

c- Süpernatant (üst sıvı) üzerine % 20'lik Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)'den 50 µl ilave edilerek ve vortekste karıştırılmıştır.

d- Tüpler 65 °C'de 30 dakika su banyosunda inkube edilmiştir.

e- Daha sonra tüplere 250 µl potasium asetate (5M) ilave edilerek 20 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve daha sonra 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilecektir.

f- Süpernatant ikiye bölünerek, 300 µl'si yeni hazırlanmış eppendorf tüplerine konarak -70 °C' de saklanmıştır. Geriye kalan 500 µl süpernatant ise yeni hazırlanan eppendorf tüplerine konularak üzerine % 100'lük Ethanol'den 500 µl ilave edilerek 1ml'ye tamamlanmış ve vortekste karıştırılmıştır.

g- Sonra tüplere 50µl sodium asetate (3M) ilave edilmiş ve örnekler tekrar karıştırılarak -70 °C'de bir gece bekletilmiştir.

h- Ertesi gün 15 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

ı- Eppendorf tüpleri ters çevrilerek filtre kağıdı üzerinde 5 dakika süre ile kurutulmuş ve pellet üzerine 1ml ethanol (% 70) ilave edilmiştir.

i- Örnekler RNA'ları çöktürmek için 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve tüp içerisindeki ethanol atılarak eppendorf tüpleri kurutma kağıtları ile dikkatlice kurutulmuştur.

j- Elde edilen total Nükleik Asit'ler 50 µl RNase free distile su ile sulandırılarak, 15µl ve 35 µl olmak üzere ikiye bölünerek eppendorf tüpleri içerisinde -70 °C'de muhafaza edilmiştir.

Daha sonra Agaroz Jel Elektroforez yöntemiyle total Nükleik Asit'lerin varlığı kontrol edilmiştir.

### 3.2.3.2. PCR Çalışmaları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; PCR) 1980'li yıllardan itibaren in vitro ortamda spesifik bir DNA parçasının kopyalarının kısa zincirli oligonükleotid



primerler yardımı ile yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.

DNA molekülündeki dizisi bilinen iki bölge arasındaki spesifik DNA parçasını çoğaltmak için, çok az miktarda mRNA'dan cDNA'lar oluşturularak bitki patojenlerinin nükleik asit dizileri belirlenebilmektedir. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Nükleik asit materyali RNA olan bir hedef çoğaltılmak isteniyorsa, önce RNA'dan Reverse Transcriptase (RT) enzimi yardımıyla cDNA'lar elde edilmekte ve daha sonra bu cDNA'lar PCR işlemiyle çoğaltılmaktadır.

PCR çalışmaları, örnekleme yapılan bitkilerde *Tristeza* veya *Spiroplasma citri* etmenlerinin moleküler bir yöntem kullanılarak saptanması ve tanınması amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada PCR işlemi; total Nükleik Asit ekstraksiyonu ile elde edilen *Tristeza* ve *Spiroplasma citri*'ye nükleik asitleri üzerindeki belirli bölgelerin spesifik primerler kullanılarak uygun koşullar altında çoğaltılması amacıyla yapılmıştır.

### 3.2.3.2.(1). Nükleik Asitlerin Elde Edilmesi

Yurt dışından yeni getirilen üretim materyalleri Astruc ve ark., 1996' nın önerdiği yöntemle göre ekstrakte edilmiş total Nükleik Asit'ler 1/20 (V/V) oranında 1X TAE tampon çözeltisi ile sulandırılarak ve hedef nükleik asit olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu total Nükleik Asit'ler PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

### 3.2.3.2.(2). Primerlerin Oluşturulması

Tez çalışma konusu olan *Tristeza* ve *Spiroplasma citri*'nin genomları üzerindeki farklı bölgelere ait spesifik primerler, literatür taramaları sonucunda farklı araştırmacıların kullandığı ve spesifik olarak ortaya koydukları primer baz dizilimleri referans alınarak dizayn edilmiştir.

*Tristeza* virüsü için (CTV1) 5'-ATG GAC GAC GAA ACA AAG AA -3' ve (CTV10) 5'- ATC AAC GTG TGT TGA ATT TCC -3' primer çifti, *Spiroplasma citri*

için ise, (P58-6f) 5'- GCG GAC AAA TTA AGT AAT AAA AGA GC -3' ve (P58-4r) 5'- GCA CAG CAT TTG CCA ACT ACA -3' primer çifti kullanılmıştır.

Primerler ticari olarak sentezletirilmiş ve firmanın bildirdiği pmol değeri dikkate alınarak 10 µM çalışma konsantrasyonu olacak şekilde steril saf su ile sulandırılmıştır.

### 3.2.3.3. PCR

PCR çalışmalarında 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüpleri kullanılmıştır. *Spiroplasma citri* DNA'sının çoğaltılması için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; PCR) aşamasında 25µl son hacim kullanılmıştır.

*Tristeza* RNA'sının komplementer DNA'sı (cDNA) dönüştürülmesi için yapılan Reverse Transcriptase (RT) aşamasında 20µl son hacim, cDNA'nın çoğaltılması için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; PCR) aşamasında 25µl son hacim kullanılmıştır.

*Tristeza* ve *Spiroplasma citri*'ye spesifik primerlerden amplifikasyon sırasında her primer için pmol/µl konsantrasyonu ayarlanarak kullanılmıştır.

Viral RNA'nin cDNA'ya dönüştürülmesi amacıyla çalışmanın Reverse Transcription aşamasında kullanılan Reverse Transcriptase (M-MLV, stok 200U/ µl) enzimi son hacminde 10- 20U, M-MLV Buffer (stok 5X) son hacminde 1X, RNase inhibitörü (stok 40U/ µl) son hacminde 15U olacak şekilde kullanılmıştır (Cillo ve ark., 2004).

Çalışmada kullanılan ve 100'er mM olarak temin edilen deoksinükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lardan 20' şer µl alınarak 25 mM olan 80µl'lik dNTP karışımına 120µl ddH<sub>2</sub>O ilave edilmek suretiyle 200 µl ye tamamlanmıştır. Bu karışım sonucunda dNTP'ler 10 mM olarak elde edilmiş ve farklı araştırmacıların daha önceki çalışmalarına göre farklı miktarlarda kullanılmıştır (Monti ve ark., 1999).

Reverse Transcriptase çalışması sonucunda elde edilen komplementer DNA'nın (cDNA) PCR'da çoğaltılması sırasında kullanılan MgCl<sub>2</sub> (25 mM) solüsyonu çalışma hacminde 1,5 mM, Mg Free Buffer (10X) son hacimde 1X olacak konsantrasyonda, Taq DNA Polimeraz (5U/µl) enzimi çalışmalara göre farklı

miktarlarda (2,5-5U) ve son olarak ddH<sub>2</sub>O son hacmi tamamlayacak miktarda kullanılmıştır.

### 3.2.3.4. PCR Yönteminin Uygulaması

Total Nükleik Asit ekstraksiyonu çalışmalarında elde edilen preparatlar kullanılmıştır ve PCR işlemleri Hung ve ark., (2000); Nolasco ve ark., (2002)'nin yöntemleri modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.

#### 3.2.3.4.(1) *Tristeza* için RT-PCR

*Tristeza* virüsü için PCR işlemi iki aşamada yapılmıştır, RT (Reverse transcription) işlemi ile cDNA'lar elde edildi ve bu cDNA'larla PCR yapılmıştır.

RT aşamasında, 200 µl' lik PCR eppendorf tüpüne, 3 µl total RNA, 1 µl reverse primer (CTV10) 5'- ATC AAC GTG TGT TGA ATT TCC -3' (50 pmol/ µl) ve 8.5 µl ddH<sub>2</sub>O konularak Thermocycler aletinde 95 °C' de 3 dakika bekletilerek nükleik asitlerin denatüre olması ve düz bir iplik haline gelmesi sağlanmıştır. Tüpler Thermocycler'dan alınarak hemen buz içerisine konulmuştur. Bu sayede tüp içerisindeki Reverse primerin RNA üzerindeki hedef bölgeye yapışması sağlanmıştır. Daha sonra tüp içerisine 7.5 µl Reverse transcriptase karışımı (1µl ddNTP, 0.3 µl M-MLV enzimi, 4 µl RT buffer, 0.5 µl RNase inhibitörü, 1.7 µl ddH<sub>2</sub>O) ilave edilerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler 42 °C'de 1 saat inkube edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

PCR aşamasında ise, yukarıdaki işlemlerden elde edilen cDNA'dan 5 µl alınarak, üzerine 14.75 µl ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µl PCR buffer (Dream Taq Gren DNA Polymerase+MgCl<sub>2</sub> (10X)) 0.5 µl dNTPs (10 pmol), 1 µl primer (CTV1) 5'-ATG GAC GAC GAA ACA AAG AA -3' (10 pmol/ µl), 1 µl primer (CTV10) 5'- ATC AAC GTG TGT TGA ATT TCC -3' (10 pmol/ µl) ve 0.25 µl Taq polimeraz enzimi (5U/µl), ile karıştırılmış ve 25 µl'lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. Daha sonra PCR tüpleri;

94 °C' de 3 dakika ..... 1 döngü

94 °C' de 1 dakika .....

52 °C' de 1 dakika ..... 35 döngü

72 °C' de 1 dakika .....

72 °C' de 10 dakika ..... 1 döngü

şeklinde programlanmış Thermocyclers aletine yerleştirilmiştir. Çalışma sonunda çoğaltılan nükleik asitler 1X TAE de hazırlanan % 1'lik Agaroz Jelde kontrol edilmiştir.

Çalışmada kullanılan farklı sıcaklıklar ve bunların neden kullanılacakları aşağıda verilmiştir:

**a.** 42 °C' de 1 saat; Amplifikasyonu yapılacak olan turuncgil *Tristeza* virüsü (CTV) RNA'sından komplementer DNA (cDNA) elde etmek amacıyla kullanılmıştır. 42 °C CTV reverse transcriptase enziminin çalışma sıcaklığıdır.

**b.** 94 °C' de 3 dakika; Virüsün RNA'sına komplementer olarak elde edilmiş olan cDNA' yı virüse ait olan RNA'dan ayırmak amacıyla ayarlanmıştır. Çift iplikli nükleik asitteki zincirler 94 °C'de birbirinden ayrılmaktadır. PCR aşamasında bu cDNA çoğaltılmıştır.

**c.** 94 °C' de 1 dakika; Amplifikasyonda b'deki programın çalıştırılması sırasında birbirinden ayrılmayan RNA ve cDNA'ların ayrılması ve daha sonra oluşacak çift ipliklerin sürekli birbirinden ayrılması için ayarlanmıştır.

**d.** 52 °C' de 1 dakika; Kullanılan primerlerdeki G, C, A ve T baz miktarları göz önünde bulundurularak  $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$  formülü ( $T_m = \text{melting temperature} = \text{erime ısı}$ ) ile ayarlanmıştır ve bu sıcaklıktan 2°C aşağısı kullanılmıştır. Bu programdaki sıcaklık seviyesi; primerlerin, çoğaltılması hedeflenen nükleik asitte bulunan ve primerlere spesifik yerlere bağlanması için gerekli olan sıcaklıktır.

**e.** 72 °C' de 1 dakika; DNA Taq polimeraz enziminin çalışma sıcaklığı olup, d'deki programın çalışması ve spesifik bölgelere bağlanan primerlerin uzaması için ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta DNA Taq polimeraz enzimi dNTP'leri kullanarak amplifikasyonu gerçekleştirir.

c, d ve e'deki programlar 35 defa çalışacak şekilde ayarlanmıştır.

f. 72 °C' de 10 dakika; Amplifikasyon sonunda çoğaltılan nükleik asit ipliklerinde tamamlanmayan bölgelerin tamamlanması amacıyla ayarlanmıştır.

#### 3.2.3.4.(2) *Spiroplasma citri* için PCR

Stubborn için PCR işlemi, nükleik asit materyali DNA' lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. PCR işleminde; her 200 µl' lik PCR eppendorf tüpüne, 1 µl DNA, üzerine 18.75 µl ddH<sub>2</sub>O, 2.5 µl PCR buffer (10X) (Dream Taq Gren DNA Polymerase +MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µl dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP), 1 µl primer (P58-6f) 5'-GCG GAC AAA TTA AGT AAT AAA AGA GC -3' (50 pmol/ µl), 1 µl primer (P58-4r) 5'- GCA CAG CAT TTG CCA ACT ACA -3' (50 pmol/ µl) ve 0.25 µl Taq polimeraz enzimi (5U/µl) ile karıştırılmış ve 25 µl' lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. Daha sonra PCR tüpleri;

94 °C' de 3 dakika ..... 1 döngü

94 °C' de 45 saniye .....

53 °C' de 45 saniye ..... 35 döngü

72 °C' de 1 dakika .....

72 °C' de 1 dakika ..... 1 döngü

şeklinde programlanmış Thermocycler aletine yerleştirilmiştir. Çalışma sonunda çoğaltılan nükleik asitler 1X TAE de hazırlanan % 2'lik Agaroz Jelde kontrol edilmiştir.

#### 3.2.4. Agaroz Jel Elektrophorez Çalışmaları

PCR işlemlerinin sonuçları aşağıdaki şekilde hazırlanmış Agaroz jel elektrophorez yöntemine tabi tutulmuştur. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanması Ek.3' de verilmiştir.

Gallitelli ve Minafra (1994)'e göre uygulanan yöntemde;

a. Agaroz miktarı çalışmalara göre (% 1 için 300 mg; olacak şekilde) 30 ml 1X TAE tampon çözeltisi (4.84 gr Tris, 2 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, 1.142 ml Glucial

Asetic Acid/lt) içerisine konulmuş ve karışım mikrodalga fırında eritildikten sonra son hacim 30 ml olacak şekilde tampon çözeltiden ilave edilmiştir.

**b.** Agaroz TAE karışımı elektroforez aparatında jel hazırlana kısma boşaltılarak tarak takılmıştır ve bir süre soğumaya bırakılmıştır.

**c.** Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Daha sonra jel'in üzerini 1–2 mm kadar kaplayıncaya kadar tank içerisine 1X TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir.

**d.** 8 µl PCR ürünü üzerine 2 µl 6x Loading buffer (yükleme tamponu) ilave edildikten sonra toplam 10 µl karışım jel deki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura (8 µl H<sub>2</sub>O + 2 µl Loading buffer + 2 µl marker) konulmuştur.

**e.** Yüklem tampon içerisindeki turuncu rengin (orange G) jelin sonuna gelmesine bir veya iki parmak kalana kadar jel tankına 30V elektrik akımı verilmiştir.

**f.** Jel, işlemi sonunda, oda sıcaklığında 10 dk. Süre ile 100 ml H<sub>2</sub>O + 30 µl (10mg/ml saf su) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırmaya kadar 5 dakika saf su içerisinde tutulmuştur.

**g.** Yıkama işleminden sonra jel, UV Transilluminatör üzerine konularak, UV ışıkta ortaya çıkan bantlar gözlenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Turunçgillerin en önemli sorunlarından olan virüs hastalıklarından TTV ve hücre duvarsız bakterilerden *Spiroplasma citri*'yi saptamak ve tanılamak amacıyla serolojik (ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler kullanılmaktadır.

Turunçgil yetiştiriciliğini tehdit eden en büyük sorunlardan birisi Turunçgil *Tristeza* hastalığı'dır. *Tristeza* hemen hemen turunçgil tarımının yapıldığı tüm ülkelerde mevcuttur.

Akdeniz ülkelerinde özellikle Türkiye ve Suriye'de geniş alana yayılan (Attard, 2004) ve üretimle ilgili sorunların başında yer alan *Spiroplasma citri*, portakallar başta olmak üzere greyfurt çeşitlerini de tehdit eden önemli bir hastalık etmenidir. Tüm diğer virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile %100 taşınmasına karşın, *Spiroplasma citri* % 10–15 oranında taşınabilmektedir. Bunun nedeni ise hastalığın ağaçlarda homojen dağılmamasıdır. Dışarıdan getirilen turunçgil üretim materyallerinin mutlaka virüs, virod ve prokaryotik hastalık etmenleri yönünden testlenmesi gerekmektedir.

Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Seralarında kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitleri bu tez çalışması kapsamında TTV ve *Spiroplasma citri* bulaşıklığı yönünden testlenmiştir.

##### 4.1. Simptomotolojik Gözlem

Turunçgil *Tristeza* virüsü hastalığı ile bulaşık ağaçlarda belirtiler genel olarak, bodurluk, hızlı gelişen ani ölüm (Şekil 4.1) veya ani solgunluk, yapraklarda damar açılması, çöğür sarılığı ve gövde çukurlaşması, küçük meyve oluşumu (Şekil 4.2; 4.3) şeklindedir. Arazide gözlemlerinde bu tip belirtileri gösteren ağaçların hastalık ile bulaşık olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından (Salibe, 1986; Baloğlu, 1988; Güllü, 1989; Korkmaz ve ark., 2008b) bildirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan bitkilerde, pozitif kontrol olarak kullanılan 24 numaralı örnekte slow decline belirtisi görülmüş olup diğer örneklerde herhangi bir belirtiler görülmemiştir.





Şekil 4.1. *Tristeza* ile bulaşık bitkide görülen hızlı gelişen ani ölüm (quick decline)



Şekil 4.2. *Tristeza* ile bulaşık bitkilerden bir görünüm (A: Çiçeklenme, B: Küçük meyveli bitki)

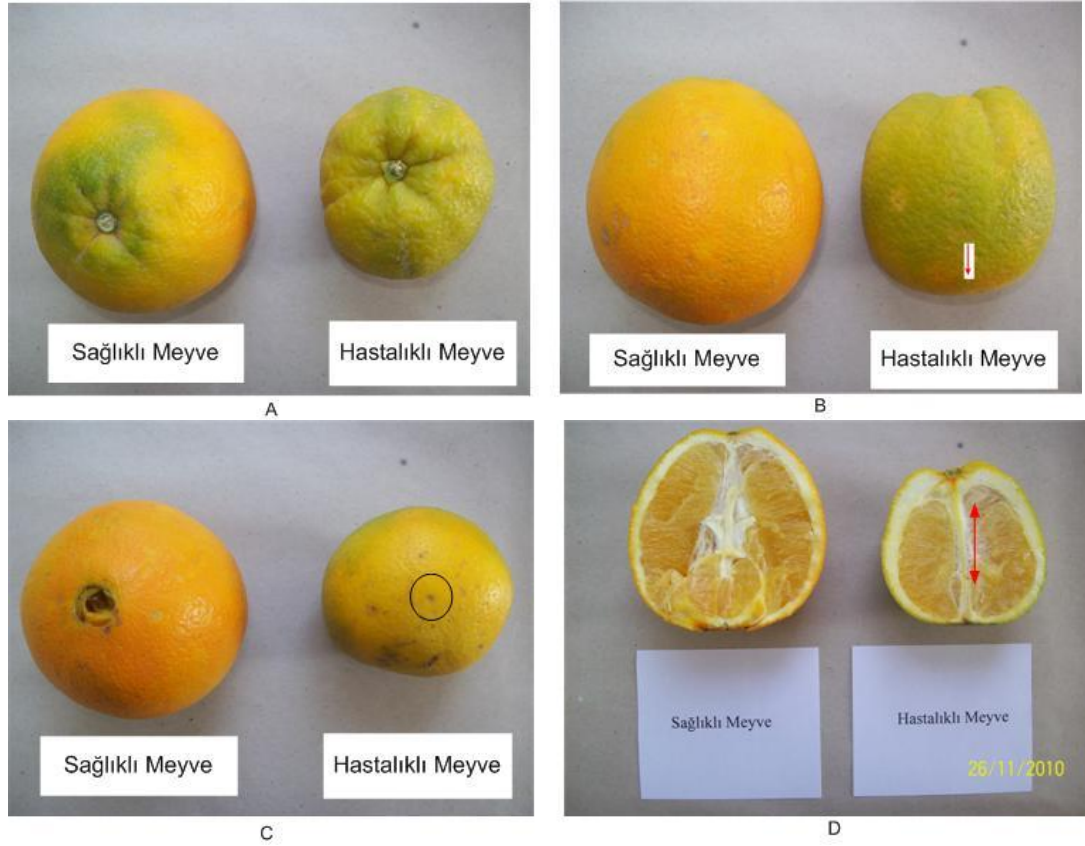


Şekil 4.3. *Tristeza* ile bulaşık hastalıklı meyve ve sağlıklı meyve görünüm

Aynı zamanda bu bitkilerde, Yediverenleşme hastalığına ait olan hafif ve şiddetli derecede sürgün oluşumu ve oluşan sürgünlerde belirgin bir şekilde yukarı doğru rozet şeklinde olması, boğum aralarında görülen kısaltmalar (Şekil 4.4) ve çok sayıda yan göz oluşumu, meyve renginin normalden açık sarı veya sapa yakın kısmının diğer kısma göre daha yeşil renkte (Şekil 4.5) olması gibi belirtilerin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Hastalığın arazi gözlemlerinde sadece belirtilere bakılarak hastalık hakkında karar vermenin zor olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından (Olson, 1969; Carpenter ve Calavan, 1969; Mello ve ark., 2010a) bildirilmiş olup çalışmalarda kullanılan bitkilerde *Spiroplasma citri*'nin neden olduğu Yediverenleşme hastalık belirtileri gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. *Spiroplasma citri* ile infekteli turunçgil ağaçlarında sürgün oluşumu (rozetleşme), kaşık şeklinde yaprak oluşumu (A) ve boğum aralarının kısaltması (B) görünümü



Şekil 4.5. *Spiroplasma citri* ile infekteli ve sağlıklı meyvelerden bir görünüm (A: Üstten görünüş, B: Meyvede iki farklı renk oluşumu, C: Göbeğin kaybolması, C: Eksen çarpıklığı).

Simptomotolojik gözlemlerle virüsün kesin tanısı mümkün olmadığından, çalışmalarda örnekler *Tristeza* ve Yediverenleşme hastalıkları için DAS-ELISA ve PCR yöntemleriyle testlenmiştir.

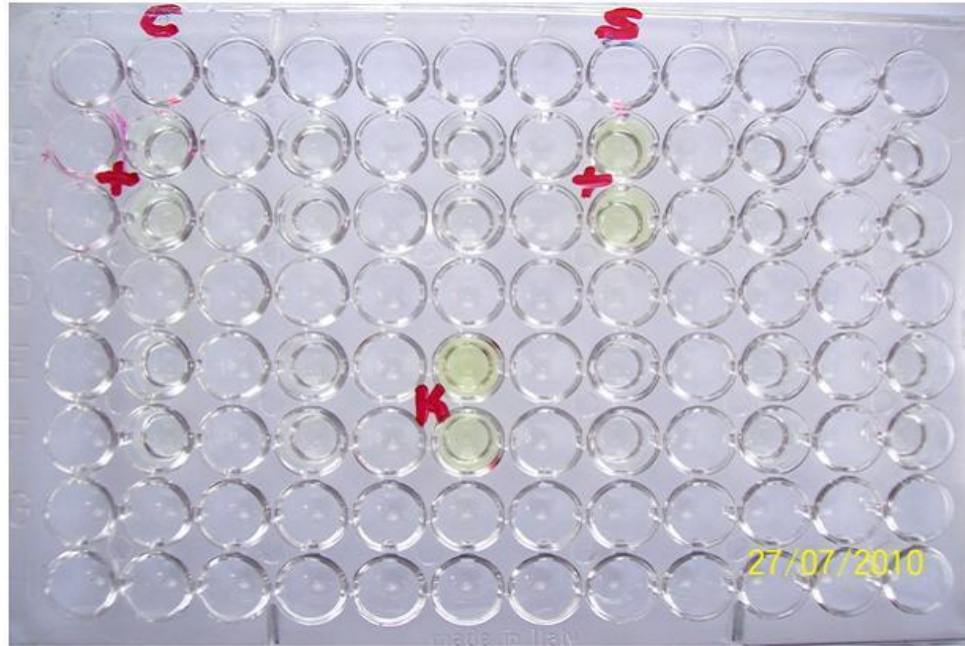
## 4.2. Serolojik Çalışmalar

### 4.2.1. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

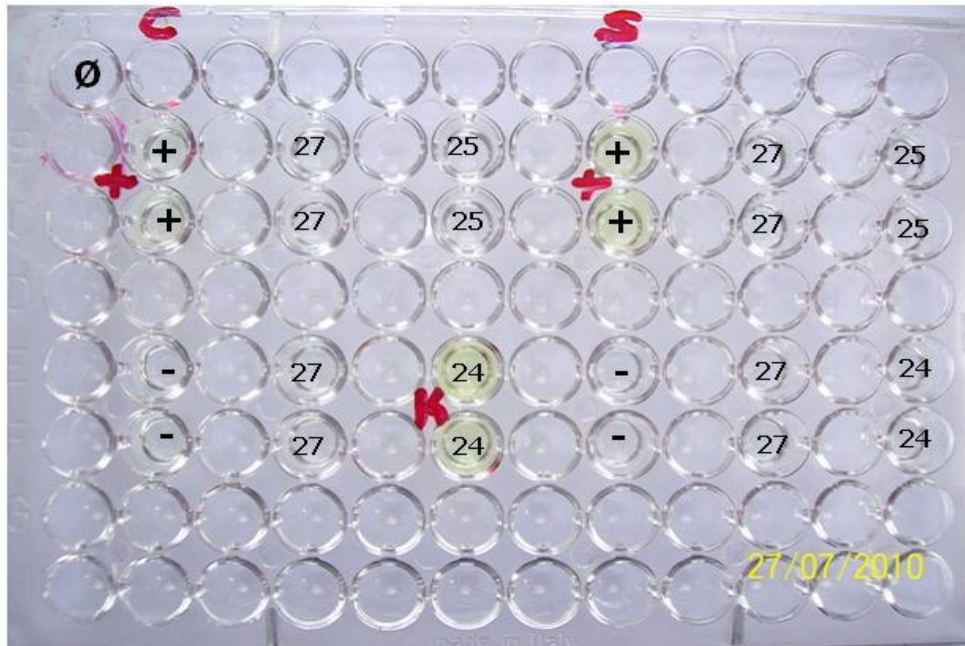
Yapılan DAS-ELISA testlerinde, 6 portakal, 6 mandarin, 5 altıntop ve 6 limon çeşidinden alınan örnekler *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* hastalık etmenlerine karşı anti serumlar kullanılarak test edilmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol için 405 nm’de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı ve daha

fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

Hızlı ve güvenilir bir yöntem olan ELISA'nın bitki materyallerindeki Turunçgil *Tristeza* Virüsü'nü saptamak için başarılı sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Clark ve ark., 1977; Ghazanfari ve Dods, 1994; Korkmaz, 2001). ELISA çalışmaları sonucunda testlenen 28 bitki örneğinden sadece pozitif kontrol olarak kullanılan 24 numaralı örnek *Tristeza* hastalığına karşı pozitif bulunmuş olup diğer 27 örnek negatif bulunmuştur. ELISA yöntemi ile bitki materyallerinde *Spiroplasma citri*'nin saptanmasında başarılı olduğu Clark ve ark., (1978) ve Çağlayan ve Çınar, (1990) tarafından bildirilmiştir. Yediverenleşme hastalığına karşı yapılan ELISA çalışmaları sonucunda testlenen 28 örneğin tamamı negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



A



B

Şekil 4.6. ELISA testi sonucu meydana gelen sarı renk oluşumu, negatif ve pozitif kontroller ve hasta (pozitif kontrol, K) örnek görünümü (A: ELISA sonuçları, B: Örnek numaraları) C: *Tristeza* S: *Stubborn* K: Pozitif Kontrol

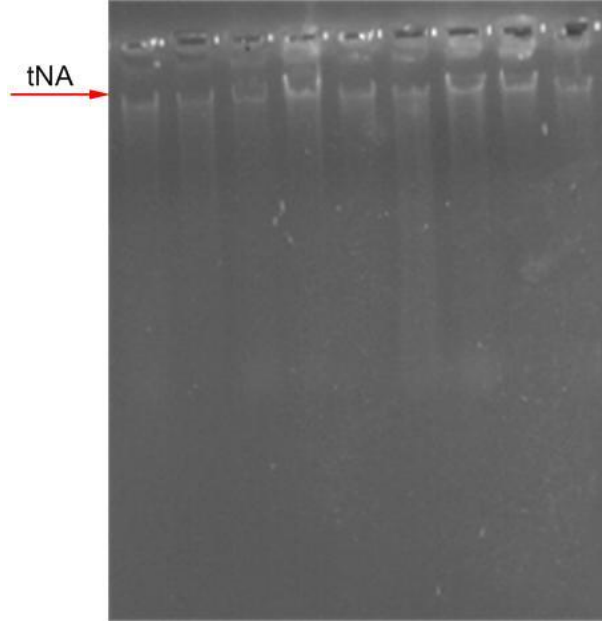
Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Seralarında kontrollü koşullarda bulunan, serolojik testlerle (DAS-ELISA) sağlıklı olduğu saptanmış olan turuncuğil üretim materyalleri PCR yöntemleriyle testlenmiştir.

### 4.3. PCR Yöntemi

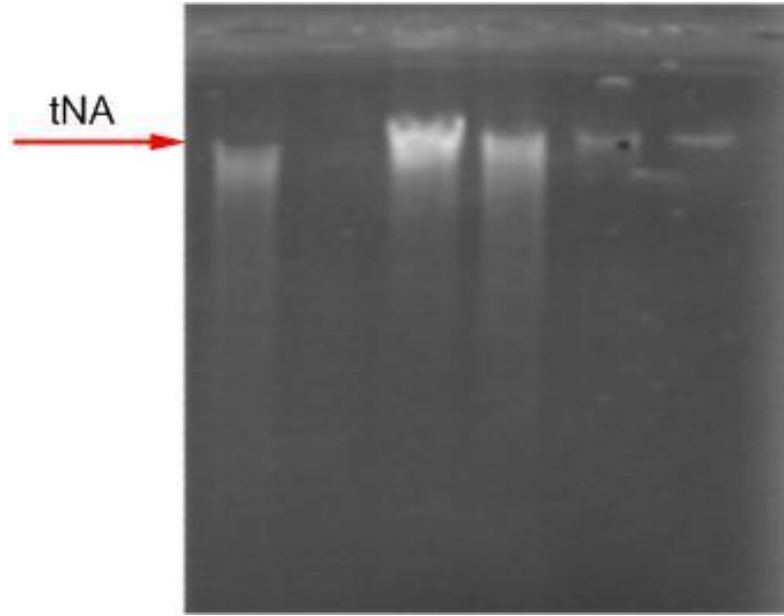
#### 4.3.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyon Çalışmaları

PCR işlemlerinde kullanılacak olan total Nükleik Asit'ler, *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* için ELISA testlerine tabii tutulan turunçgil örneklerinden saflaştırılmış ve TAE tampon çözeltisinde hazırlanan % 1'lik agaroz jel (CTV için) ve %2'lik agaroz jel (*Spiroplasma citri* için) kullanarak elektroforez yöntemi ile testlenmişlerdir.

Agaroz jelde yapılan koşum işlemi sonucunda, Ethidium bromid ile boyanan jel üzerinde virüs (*Tristeza*) ve virüs benzeri hastalıklardan âri turunçgil üretim materyallerinden elde edilen total Nükleik Asit (tNA)'ler gözlenmiştir (Şekil 4.2; 4.3).



Şekil 4.7. *Tristeza*'nin Agaroz Jeldeki Total Nükleik Asit Bandları



Şekil 4.8. *Spiroplasma citri*'nin Agaroz Jeldeki Total Nükleik Asit Bandları

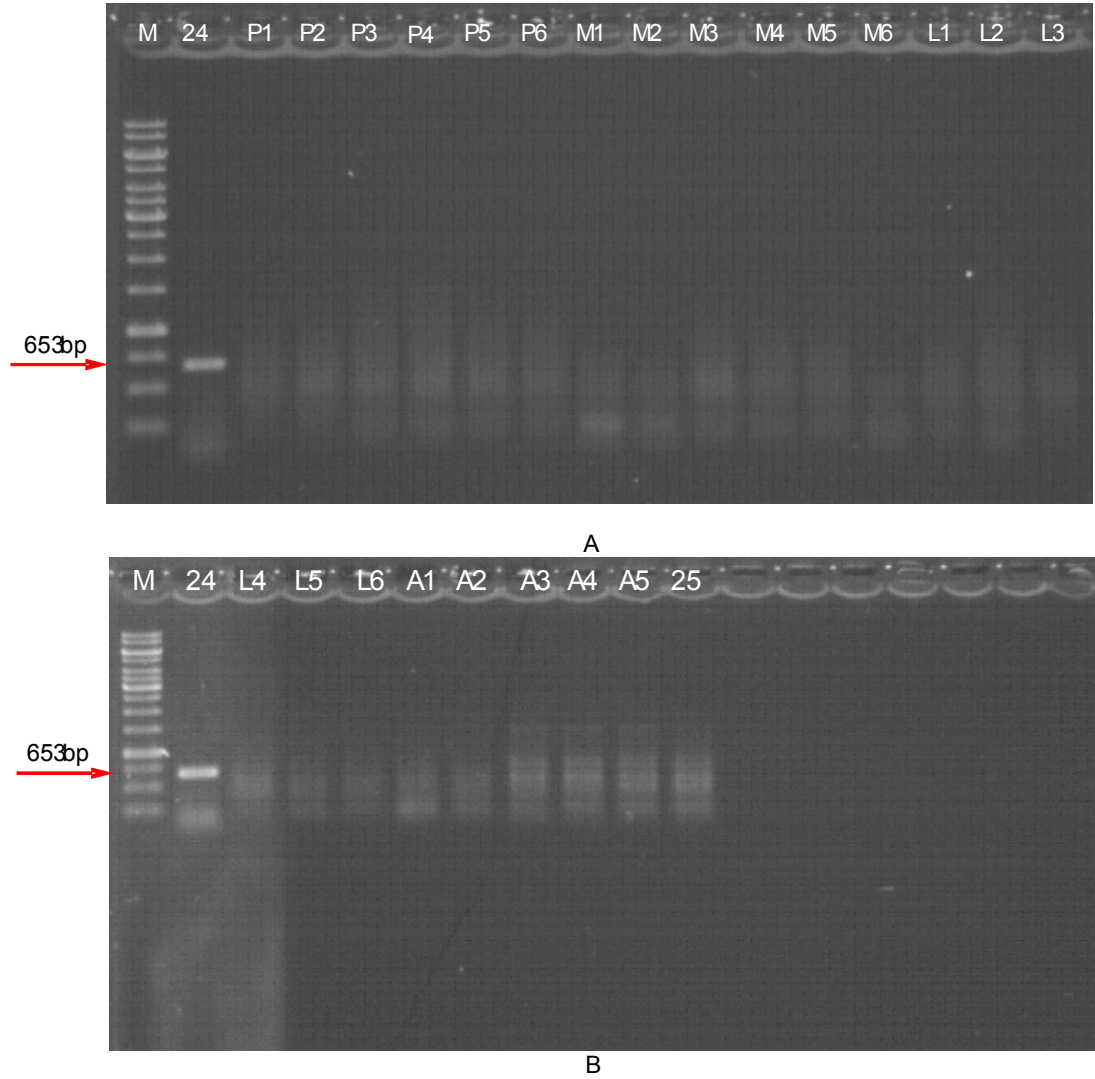
#### 4.3.2. PCR Çalışmaları

Moleküler yöntemlerden biri olan PCR, *Tristeza* veya Yediverenleşme hastalıklarının saptanması ve tanınması çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmalarında, *Tristeza* için CTV1 ve CTV10 kodlu primer çifti 653 bp'lik, *Spiroplasma citri* için ise P58-4f ve P58-4r kodlu primer çifti 450 bp'lik bölgeyi çoğaltmak amacıyla kullanılmıştır.

Turunçgil örneklerinden elde edilen total Nükleik Asit'ler ile yapılan RT (Reverse Transkriptase) çalışmaları sonucunda cDNA'lar elde edilmiş ve bu cDNA'lar RT-PCR için çalışmalarında kalıp olarak kullanılmıştır. PCR çalışması sonucunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde koşularak DNA boyaması yapılmış ve sonuçlar görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler Markır aracılığıyla elde edilen DNA amplifikasyon materyalinin büyüklüğü ölçülmüş ve beklenen boyutlarda amplifiye materyal elde edilmiştir.

Niblett ve ark. (2000)'nin *Tristeza* hastalığının ırk ayırımı üzerine yaptıkları çalışmada kullandıkları CTV1 ve CTV10 primer çifti 653 bp'lik mesafeleri çoğaltmak amacıyla bu çalışmada kullanılmıştır. Bu araştırmada pozitif kontrol

olarak kullanılan 24 numaralı örnekte 653 bp'lik band çoğaltılmıştır. Ancak diğer 27 örnek için yapılan PCR çalışması sonucunda elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde kontrol edilmiş ve herhangi bir band gözlenememiştir (Şekil 4.4).



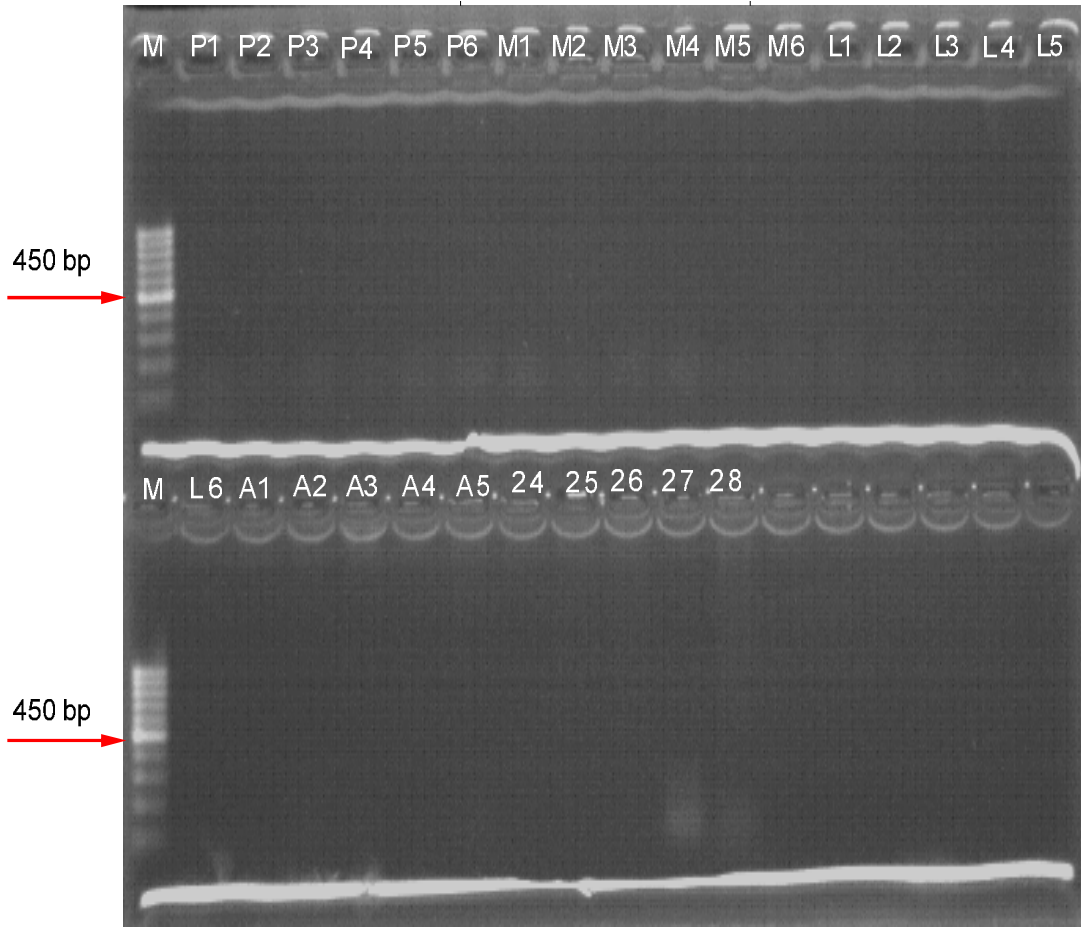
Şekil 4.9. PCR Marker, 1 kb' lik (M) ve pozitif kontrol (24: numaralı örnek; A, B) (A: P1-P6, M1-M6 ve L1-L3 örnekleri; B: L4-L6, A1-A5 ve 25 numaralı örnek)

Ayrıca, ELISA testleri sonucu *Spiroplasma citri* ile bulaşık olmadığı saptanan turunçgil örneklerinden nükleik asit materyali DNA'lar kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. PCR çalışması sonucunda elde edilen *Spiroplasma citri* amplifikasyon materyali %2'lik agaroz jelde koşularak DNA boyaması yapılmış ve sonuçlar görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler Markır aracılığıyla elde edilen DNA



amplifikasyon materyalinin büyüklüğü ölçülmüş ve beklenen boyutlarda amplifiye materyal elde edilmiştir.

Yokomi ve ark. (2010a)'nın Yediverenleşme hastalığının yaygınlığının araştırılmasına yönelik yaptıkları çalışmada kullandıkları P58-4f ve P58-4r primer çifti 450 bp'lik mesafeleri çoğaltmak amacıyla kullanılmış ve turunçgil üretim materyallerinde beklenen büyüklüğü sahip bandlar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.10. PCR Marker (M) ve 450 bp' lik Stubborn, (P1-P6, M1-M6, L1-L6, A1-A5, 24, 25, 26, 27, 28 numaralı örnekler)

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemiz toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak Akdeniz, Ege ve Doğu Karadeniz bölgesinde turunçgil yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölgelerde, turunçgil yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda kalite ve kantite parametrelerinin düşmesinde virüs ve virüs benzeri etmenlerin ayrı bir önemi vardır.

Bu hastalık etmenleri, bitkiden bitkiye mekanik yollarla kolaylıkla bulaşabilmeleri, aşı gözüyle ve vektör böcekler aracılığıyla taşınabilmelerinden dolayı çok geniş alanlara kısa sürede yayılabilmekte ve büyük kayıplara yol açmaktadır. Bunlara karşı kullanılacak etkili bir kimyasal mücadele yönteminin bulunmaması önemini daha da artırmaktadır.

*Tristeza* (Göçüren) ve *Spiroplasma citri* (Yediverenleşme) etmenler hemen hemen turunçgil tarımının yapıldığı tüm ülkelerde görülmektedir. Bu nedenle yurt dışından getirilmiş turunçgil üretim materyalleri mutlaka Göçüren ve Yediverenleşme hastalıklarına neden olan etmenler yönünden serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmesi gerekmektedir.

Ayrıca, ülkemizde daha çok eski sayılabilecek çeşitlerin üretimde hakim olması ve bu çeşitlerle hala bahçe kurulmaya devam edilmesi ve buna bağlı bilinçsiz şekilde yeni tesislerin oluşturulması dış pazarda rekabet gücünü zayıflatmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, iç tüketim ve dış ticarete talep ve rekabet koşullarını artırıcı yeni çeşitlerin üretimi ön plana çıkmaktadır. Bu bağlamda üzerinde durulması gereken önemli konulardan birisi de, ülkemiz ekolojik koşullarına uygun, verim ve kalite bakımından üstün nitelikler taşıyan yurt dışından yeni turunçgil üretim materyallerinin getirilmesi ve modern tekniklerle testlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarında kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş olan bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitlerinin *Spiroplasma citri* (Palamutlaşma) ve *Tristeza* (Göçüren) hastalıkları yönünden serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemlerle testlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Seralarında kontrollü koşullarda bulunan, yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitleri bu tez çalışmasında simptomotolojik olarak Göçüren ve Yediverenleşme hastalık belirtileri gözlemlenmemiştir.

Merkez seralarda kontrollü koşullardaki üretim materyalleri DAS-ELISA ile testlenmiştir. ELISA testlerinde, pozitif kontrol amaçlı kullanılan bitkiler hariç, negatif kontrol bitkilerinde ve diğer üretim materyallerinde *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* enfeksiyonlarına rastlanmamıştır.

ELISA testleri sonucu *Tristeza* ve *Spiroplasma citri* ile bulaşık olmadığı saptanan turunçgil örneklerinden saflaştırılmış ve TAE tampon çözeltisinde hazırlanan *Tristeza* amplifikasyon materyali için %1'lik agaroz jel, *Spiroplasma citri* amplifikasyon materyali için ise %2'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile gözlenmişlerdir.

Total RNA preparasyonları RT-PCR çalışmalarında kullanılmış ve *Tristeza* için CTV1 ve CTV10 kodlu primer çifti 653 bp'lik DNA bandı agaroz jelde gözlenmiştir. *Spiroplasma citri* için ise, P58-4f ve P58-4r kodlu primer çifti 450 bp'lik DNA bandı görülmüştür. PCR çalışması sonucunda, pozitif kontrol olarak kullanılan bitki (24 numaralı örnek, *Tristeza*) hariç turunçgil üretim materyallerinde beklenen büyüklüğü sahip bantlar gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, turunçgil yetiştiriciliğini sınırlayan ve etkin mücadele yöntemi bulunmayan CTV ve *Spiroplasma citri* hastalık etmenlerinin bu çalışmada kullanılan çeşitler ile bulaşık olmadığı serolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya çıkarılmıştır.

Ülkemiz turunçgil tarımı için önemli katkıları olan Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi turunçgil yetiştiriciliğinde biyoteknolojik yöntemlerden faydalanmakta ve her yıl 150.000–200.000 hastalıklardan arı turunçgil fidanı üretilip üreticilere vermektedir. Bu çalışma ile Merkez seralarında yurt dışından üretime yönelik olarak getirilmiş bazı portakal, mandarin, altıntop ve limon çeşitleri *Tristeza* ve Yediverenleşme hastalıkları yönünden serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmiştir ve ülkemiz turunçgil üreticilerinin hizmetine sunulmuştur.

Yurt dışından getirilmiş bu çeşitler ile üreticilerin yeni turunçgil bahçeleri oluşturmaları verim ve kaliteyi olumlu yönde etkileyecek ve turunçgil üreticisinin iç tüketim ve dış pazarda rekabet koşullarını da artıracaktır. Böylelikle, turunçgil üreticisinin gelir düzeyini arttıracak ve dolayısıyla da üniversite ve ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

- AKBULUT, M., BALOĞLU, S., MOMOL, E.A., PAPPU, S.S., FEBRES, V.J., YILMAZ, M.A., LEE, R.F., and NIBLETT, C.L., 1996. Comparison of the Capsid Protein Gene Sequences of Five Turkish Isolates of *Citrus tristeza virus*. In: Proc. 13th Conf. IOCV., IOCV, Riverside.
- ANONYMOUS, 2006. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Citrus Fruit Fresh and Processed Annual Statics 2006. p6.
- ANONYMOUS, 2010. Foreign Agricultural Service/USDA.  
<http://www.fas.usda.gov>
- ARCHER, D.B., TOWNSEND, R., and MARKHAM, P.G., 1982. Detection of *Spiroplasma citri* in plants and insect hosts by ELISA. *Plant Pathology*. 31: 299–306.
- ASTRUC, N., MARCOS, J.F., MACQUARIE, G., CANDRESSE, G.T., and VICENT, P., 1996. Studies on the Diagnosis of Hop Stunt Viroid in Fruit 60 Trees: Identification of New Host and Application of a Nucleic Acid Extraction Procedure Based on Non-Organik Solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 837–846.
- ATTARD, D., 2004. Case Studies on quarantine diseases present in europe affecting Stone fruits and citrus. Plant Health Department Diagnosis and Control Unit.
- BALOĞLU, S., 1988. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerde Zararlı *Tristeza* Virüs Hastalığının Tanılanması, Arıtılması, Özellikleri ve Serolojik Yöntemlerle (ELISA ve SDS-Immunodiffision Testleri) Saptanması. Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 188 s.
- BARBA, M., and RICCIONI, L., 1993. Improvement of Diognostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. *Agriculture*, 139- 141.
- BARBA, M., and RICCIONI, L., 1995. Virus and virus like disease of citrus in the Near East region. *FAO Rome*. 518p.
- BARBAROSSA, L., POTERE, O., CASTELLANO, M.A., and SAVINO, V., 2005. Serological and molecular diagnosis of *Citrus tristeza virus*: an Apulian experience. Gruppo Calderini Edagricole Srl.

- BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S.M., ve GONSALVES, D., 1979. The closteroviruses: A distinct group of elongated plant viruses. *Advances in Virus Research*. 25: 93–168.
- BAR-JOSEPH, M., MARCUS, R., ve LEE, R.F., 1989. The continuous challenge of citrus *Tristeza* virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 291–316.
- BAR-JOSEPH, M., and LEE, R.F., 1989. Citrus *Tristeza* virus *In: AAB description of plant viruses*. Warwick U.K.: 353p.
- BAR-JOSEPH, M., ve LEE, R.F., 1990. Citrus *Tristeza* virus. *Description of Plant Viruses*. No. 353. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists. Kew, Surrey, UK.
- BARZEGAR, A., SOHI, H.H., and RAHIMIAN, H., 2006. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates in northern Iran. *J Gen Plant Pathol.*, 72:46–51.
- BATISTA, L., PEÑA, I., LÓPEZ, D., CASÍN, J.C., VELÁZQUEZ, K., TORRES, M.C., and LEÓN, Y., 2005. Management Program for Citrus *Tristeza* in Cuba. *In: Proc. 16th Conf. IOCV*, Riverside, CA.
- BERTOLINI, E., MORENO, A., CAPOTE, N., OLMOS, A., LUIS, A., VIDAL, E., PÉREZ-PANADÉS, J., and CAMBRA, M., 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol.* 120:177–188.
- BITANCOURT, A.A., 1940. A doença dos citrus no vale do Paraíba. *O Biologico* 6, 268–269.
- BOVE, J.M., 1986. Stubborn and its Natural Transmission in the Mediterranean Area and the Near East. *FAO Plant Protec. Bull.* 34 (1): 15–23 pp.
- CALAVAN, E.C., 1966. Effect of Stubborn Disease on Various Varieties of Citrus Trees Israel. *J. Bot.* 15: 121-132.
- \_\_\_\_\_, 1968. A Review of Stubborn and Greening Disease of Citrus. *In: 'Proc. 4 th. Conf. IOCV'*. (Childs, J.F.L., eds), 105-117. pp. Univ. Fla. Press, Gainesville.
- CAMBRA, M., HERMOSO DE MENDOZA, A., MORENO, P., ve NAVARRO, L., 1981. Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). For detection of citrus *Tristeza* virus (CTV) in different aphid species. *In: International Citrus Congress Organizing Committee. (eds). Proceeding of*

- the International Society of Citriculture*. Japan Chapter ISC, Okitsu, Shimizu, Shizuoka, Japan: 444–448.
- CAMBRA, M., CAMARASA, E., GORRIS, M.T., GARNSEY, S.M., and CARBONELL E., 1991. Comparison of Different Immunosorbent Assays for Citrus *Tristeza* Virus (CTV) Using CTV- Specific Monoklonal ve Polyclonal Antibodies. P 38-45. In; Proc. 11<sup>th</sup> Conf. IOCV. IOCV, Riverside.
- CAMBRA, M., CAMARASSA, E., GORRIS, M.T., GARNSEY, S.M., and CARBONELL, E., 1991. Comparison of different immunosorbent assays for citrus *Tristeza* virus (CTV) using CTV specific monoclonal and polyclonal antibodies. In: Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologist (Eds.: Brlansky, R.H., Lee, R.F., and Timmer, L.W.), Riverside, CA, pp. 38-45.
- CARRERA, C., 1933. Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los citros de Bela Vista (Corrientes) Argentina. Min. Agr. Bol. 37, 15–37.
- CARPENTER, J.B. ve CALAVAN, E.C., 1969. Effect of Stubborn Virus on Young Valencia Orange Trees. In “Proc. First. Intern. Citrus Symp. Vol. III. 1505-151 pp.
- CENGİZ, A., 1965. Güney Bölgesi Turunçgillerinde Stubborn Hastalığı Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 5 (4): 163-169 S.
- CENGİZ, A., ve NAS, Y.Z., 1976. Akdeniz Bölgesinde Turunçgil Virüs Hastalıkları Üzerinde Araştırmalar. 16(2):63-76.
- CHAPOT, H., 1959. First Studies on the Stubborn Disease of Citrus in Some Mediterranean Countrius. In.’Citrus Virus Diseases’ (WALLACE, J.M. eds) 109–119 pp. Unif. Calif. Div. Agri.Sci. Berkeley.
- CHILDS, J.F.L., and CARPENTER, J.B., 1961. Observation on Stubborn and Other Disease of Citrus in Morocco. The Citrus Industry, August, 1961, 5-6, 12-13 pp.
- CLARK, M., ADAMS, A.N., 1977. Characteristics of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. I. Gen. Virol. 34: 475–438.



- CLARK, M., FLEGE, C.L., BAR-JOSEPH, M., ROTTEM, S., 1978. The Detection of *Spiroplasma citri* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) *Phytopathol.* 2. 92: 332-337.
- CILLO, F., FINETTI-SIALER, M. M., PAPANICE, M. A., and GALLITELLI, D., 2004. Analysis of Mechanisms Involved in the Cucumber Mosaic Viruses Satellite RNA-Mediated Transgenic Resistance in Tomato Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 17 (1), p. 98-108.
- ÇAĞLAYAN, K., ÇINAR, A., 1990. Studies of symptomatology and detection of *Spiroplasma citri*, a causal agent of Stubborn disease, observed on citrus trees in the East Mediterranean area. *Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi* 14 (2), 1990,58-70.
- ÇINAR, A., ve ÖNELGE, N., 1992. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerinde Crinkly Leaf (Buruşuk Yapraklılık) Virüs Hastalığı. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi*, 1992, 7 (4): 43-50.
- ÇINAR, A., KERSTING, U., ÖNELGE, N., KORKMAZ, S., and SAS, G., 1993. Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. In: Moreno, P., da Graca, J.V., and Timmer, L.W. (eds.), Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside, CA, USA, pp:397–400.
- DAVINO, M., CATARA, A., RUSSO, F., TERRANOVA, G., and CARBONE.G., 1983. A survey for citrus *Tristeza* virus in Italy by the use of enzyme linked immunosorbent as-say. *In Proc. 9<sup>th</sup> conf. of IOCV*, IOCV Riverside: 66–69.
- DELUCHI, V.L., 1964. “Maladies, Troubles et Ravageurs des Agrumes au Maroc, Institut National de la Recherche Agronomique, Rabat” 359 pp.
- DICKSON, C.R., FLOCK, R.A., and JOHNSON, M.M., 1951. Viruses of Tropical Plants. *Calif. Citrogr.* 36: 135.
- D'ONGHIA, A.M., SAADE, P., KHOURY, W., CASTELLO, M.A., and SAVINO, V., 1998. Occurrence and distribution of citrus *Tristeza* virus in Lebanon. *Phytopath. Medit.*, 37: 75-78.
- FAO, Statistical database 2007.  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>

- FAWCETT, H.S., PERRY, J.C., and JOHNSTON, J.C., 1944. The Stubborn Disease of Citrus Calif. Citrograph. 29: 146-147.
- FAWCETT, H.S., and WALLACE, J.M., 1946. Viruses of Tropical Plants. Calif. Citrogr. 32: 50
- FAWCETT, H.S., and KLOTZ, L.J., 1948. Citrus Disease ve Their Control (BATCHELOR, L.D., and WEBBER,H.J.). The Citrus Industry ‘Vol 2. Production of the Crop. University of California Press Berkley, Los Angles, 495–596 p.
- FERNANDEZ VALIELA, M.V., 1963. Principales enfermedades de virus de los citrus. Delta del Parana: Invest. Agr. Campana (Argentina) 3 (3), 39–47.
- FUTCH, S.H., and BRLANSKY, R.H., 2004. Field Diagnosis of *Citrus Tristeza virus*, Citrus Industry Magazine 85(7):22-23.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, Adana-Turkey, 89-99p.
- GARNSEY, S.M., GUMPF, D.J., ROISTACHER, C.N., CIVEROLO, E., LEE, R.F., YOKOMI, R.K., and BAR-JOSEPH. M., 1987. Toward a standard evaluation of the biologicaly properties of Citrus *Tristeza* virus. Phytophylactica. 19: 151-157.
- GARNSEY, S.M., BRLANSKY, R.H., CIVEROLO, E.L., YOKOMI, R.K., GUMPF, D.J., HARTUNG, J.S., PAUL, C., HILF, M.E.,and LEE, R.F., 2005. Biological Characterization of an International Collection of *Citrus Tristeza virus* (CTV) Isolates. In: Proc. 16th Conf. IOCV., IOCV, Riverside.
- GHAZANFARI, J., and DODDS, J.A., 1994. Optimitizing Tissue Sampling for Detection of CTV in field Growing Citrus Trees. Phytopathology, Vol: 84, No. 10, 1105 (Abst.).
- GÜLLÜ, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel Grubu Portakal ve Satsuma Mandarin Ağaçlarında Yaygın Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Sürveyi ve İndekslemesi Üzerinde Çalışmalar. Doktora Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Adana. 266s.

- HARTLI-MUSINOV, D., HANCEVIC, K., ROSIN J., and GATIN, Z., 2006. Citrus *Tristeza* virus Indexing ve elimination from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Kuno. Pomologia Croatica Vol. 12-2006.,br.4.
- HELGUERA, P.R., DOCAMPO, D.M., NOME, S.F. and DUCASSE, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by Immucapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). J. Phytopathology 150, 94–96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- HUNG, T.H., WU., SU, H.J., 2000. A rapid method based on the one step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *citrus tristeza virus*. J. Phytopathol. 148:469–475.
- IGWEGBE, K., and CALAVAN, E.C., 1970. Occurrence of Micoplasma like Bodies in Phloem of Stubborn-Infected Citrus Seedlings Phytopathology. 60:1525-1526.
- JARRAR, S., DJELOUAH, K., D'ONGHIA, A.M., and SAVINO, V., 2000. First record of citrus *Tristeza* virus in Palestine. *Journal of Plant Pathology*.
- KAMBEROĞLU, M.A., 2000. Turunçgil *Tristeza* virüs (CTV) ırklarına spesifik monoklonal Antibody' lerin Üretilmesi ve CTV ırklarının Tanılanmasında Kullanılması. Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 93 s.
- KE, C., GARNSEY, S.M., and TSAI, J.H., 1984. A Survey of Citrus *Tristeza* Virus in China by Enzyme- Linked Immunosorbent Assay. P 70-75. In; Proc. 9<sup>th</sup> Conf. IOCV. IOCV, Riverside.
- KERSTING, U., ŞENGONCA, C., 1992. Detection of insect vectors of the Citrus Stubborn Disease pathogen, *Spiroplasma citri* Saglio ve ark., in the Citrus growing area of South Turkey.
- KERSTING, U., BAŞPINAR, H., ÇINAR, A., ŞENGONCA, Ç., and UYGUN, N., 1993. New Findings on the Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the East Mediterranean Region of Turkey. In. 'Proc. 12<sup>th</sup> Conf. IOCV' Univ. Flo. Pres, Gainesville. 336–341 p.

- KORKMAZ, S., 2001. Application of Direct Tissue Blot Immunoassay In Comparison with DAS-ELISA for Detection Turkish Isolates of Citrus *Tristeza* Closterovirus (CTV). Turk J. Agric. Forestry 26 (2002) 203–209.
- KORKMAZ, S., ÇEVİK, B., ÖNDER S., and KOÇ, N.K., 2006. First report of the presence of *Citrus Tristeza virus* in the eastern Black Sea region of Turkey. J. Plant Path. 88 (3, Supplement): 69.
- KORKMAZ, S., ve ÖNDER, S., 2008a. Edremit Körfez Bölgesi'ndeki Satsuma Owari Mandarinlerinde Yaygın Olan Virüs ve Viroid Hastalıklarının Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması. Journal of Tekidag Agricultural Faculty.
- KORKMAZ, S., ÇEVİK, B., ÖNDER S., KOÇ, N.K., and BOZAN, O., 2008b. Detection of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) from *Satsuma owari* mandarins (*Citrus unshiu*) by direct tissue blot immunoassay (DTBIA), DAS-ELISA and biological indexing. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. Vol. 36: 239-246.
- KORKMAZ, S., ÇEVİK, B., ÖNDER, S., KOÇ, N.K., 2008c. Ülkemizin Farklı Turunçgil Üretim Bölgelerinden Elde edilen Turunçgil *Tristeza* Virüsü İzolatlarının Biyolojik, Serolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Turk Journal Agricultural Forestry (2008) 369-379.
- KRANZ, J., SCHMUTTERER, H., and KOCH, W., 1977. Diseases, pests and weeds in tropical crops. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg. 666 p.
- KITAJIMA, E. W., SILVA, D. M., OLIVEIRA, R. A., MULLER, G. W., and COSTA, A. S., 1964. Nature, Lond. 201: 1011.
- KUBAA, R., SAPONARI, M., DJELOUAH, K., YOKOMI, R.K., EL-KHATEEB, A., and JAMAL, M., 2009. Molecular Detection of *Spiroplasma citri* Associated with Stubborn Disease in Citrus Orchards in Syria. Arabian Journal of Plant Protection. 27(V57):93.
- KYRIAKOU, A., POLYCARPOU, D., EFSTATHIOU, A., and HANDJINICOLI, A., 1993. Citrus *Tristeza* virus in Cyprus. In : *Proc. 12<sup>th</sup> conf. of IOCV*, India 1992: 69-72.

- LBDIA, B., BENNANI, A., SERRHINI, M.N., and ZEMZAMI, M., 2005. Biological, Serological ve Molecular Characterization of three Isolates of Citrus trizteza Closterovirus introduced into Morocco. OEPP/EPPO Bulletin 35, 511-517
- LEE, R.F., and ROCHA-PENA, M.A., 1992. *Citrus Tristeza virus*. In: Plant Diseases of International Importance. Vol. III. (Eds.: Mukhopadhyay, A.N., Chaube, H.S., Kumar, J., and Singh, U.S.). Prentice Hall, NJ, pp. 226-249.
- LIU, H.Y., GUMPF, D.J., OLDFIELD, G.N., and CALAVAN, E.C., 1983. Transmisson of *Spiroplasma citri* by *Circulifer tenellus*. Phytopath. 73: 582-585.
- LOVISOLO, 1993. Agro-ecology and centres of origin of graft-transmissible diseases of citrus. In: 12<sup>th</sup> Proc. IOCV, IOCV Riverside: 406-411.
- MELLO, A.F.S., YOKOMI, R.K., MELCHER, U., CHEN, J.C., WAYADANDE, A.C., and FLETCHER, J., 2008. Genetic diversity of *Spiroplasma citri* strains from different regions, hosts, and isolation dates. Phytopathology 98:960-968.
- MELLO, A.F.S., YOKOMI, R.K., MELCHER, U., CHEN, J., and FLETCHER, J., 2009. Citrus Stubborn Severity is Associated with *Spiroplasma citri* Titer but Not with Bacterial Genotype. Plant Disease. 94:75-82.
- MELLO, A.F.S., YOKOMI, R.K., MELCHER, U., CHEN J., CIVEROLO, E., WAYADANDE, A., and FLETCHER, J., 2010a. New perspectives on the epidemiology of citrus stubborn disease in California orchards. Online publication, (DOI:10.1094/PHP-2010-0526-04-SY).
- MELLO, A.F.S., YOKOMI, R.K., PAYTON, M., and FLETCHER, J., 2010b. Effect of Citrus Stubborn Disease on Navel Orange Production in a Commercial Orchard in California. Plant Pathology. 92:429-438.
- MENEGHINI, M., 1946. *Biologico* 12: 285.
- MONTI, M.M., VALANZUOLO, S., CASSANI, G. and COLOMBO, M., 1999. Transgenic Tomatoes Expressing A Cucumber Mosaic Virus Satellite RNA; Field Testing and Analysis of Satellite RNA Spread. Journal of Plant Pathology, 81(2): 113-122.

- NAS, Y.Z., ve TEKİNEL, N., 1973. Limon Kabuk Çöküntüsü Üzerinde Araştırmalar. Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı, No. 7,S.89.
- NIBLETT, C.L., GENÇ, H., ÇEVİK, B., HALBERT, S., BROWN, L., NOLASCO, G., BONACALZA, B., MANJUNATH, K.L., FEBRES, V.J., PAPPU, H.R., and LEE, R.F., 2000. Progress on strain differentiation of Citrus *Tristeza* virus and its application to the epidemiology of Citrus *Tristeza* disease. *Virüs Research* 71:97-106.
- NOLASCO, G., BLAS, C., TORRES, V., and PONZ, F., 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods.* 45: 201-218.
- NOLASCO, G., SEQUEIRA, Z., SOARES, C., MANSINHO, A., BAILEY, A.M., and NIBLETT, C.L., (2002). Asymmetric PCR ELISA: Increased Sensitivity and Reduced Costs for the detection of plant viruses. *European Plant Pathology*, 108(4): 293-298.
- NORMAN, P.A., and GRANT, T.J., 1956. *Proc. Fla Stn hort Soc.* 69: 38.
- \_\_\_\_\_,1963. Report to government of Turkey on citrus virus diseases. FAO Report Rome No:1641. 16 p.
- OLSON, E.D., 1969. Mottled-leaf symptom on index Plants Graft Inoculated from Citrus Trees Showing Various Symptoms of Stubborn Diseas. In ‘Proc. First Inter. Citrus. Symp.’ Vol.3: 1413-1420 pp.
- ÖZALP, O., ve AZERİ, T., 1967. Ege Bölgesi turunçgil virüs hastalıkları sürveyi. *Bitki Koruma Bülteni.* 7: 167-187.
- PLOETZI, R.C., 2003. Diseases of tropical fruits crops. CABI Publish.
- ROISTACHER, C.N., 1991. Graft-transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. International Organization of Citrus Virologists (IOCV) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Publ. Div., FAO, Rome, Italy, 286 pp.
- ROCHA-PENA, M.A., and LEE, R.F., 1991. Serological technique for detection of *Citrus Tristeza virus*. *J. Virol. Methods.* 34: 311-331.

- ROCHA-PENA, M.A., LEE, R.F., LASTRA, R., NIBLETT, C.L., OCHOA-CORONA, F.M., GARNSEY, S.M., and YOKOMI, R.K., 1995. Citrus *Tristeza* virus and its aphid vector *Toxoptera citricida* threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* 79: 437- 445.
- ROY, A., ANANTHAKRISHNAN, G., and BRLANSKY, R., 2009. Simultaneous detection and differentiation of *Citrus tristeza virus* genotypes using a hexaplex reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction assay. *Phytopathology* 99:S111.
- SAILLARD, C., DUNEL, J., GARCIA-JURADA, O., NHAMI, A., BOVE, J.M., 1978. Detection de *Spiroplasma citri* dans les agrumes et les Pervenches par la Technique Immunoenzymatic (ELISA) C.R. Acad. Sci. 286:1245-1248.
- SALIBE, A.A., 1986. A. Programme of Citrus Improve and Protection in Turkey.Report to Government of Turkey, FAO.Rome.
- SCHNEIDER, H., 1966. South Africa's Greening Disease and Morocco's Stubborn Disease. *Calif. Citrograph.* 51: 299-305
- STAMO, B., and D'ONGHIA, A.M., 1998. Detection of CTV in a citrus collection of Albania by immunoprinting In: Proceedings of the Mediterranean network on certification of citrus. *Options Méditerranéennes Serie B 21, CIHEAM Publications:* 125-128.
- VOGEL, R., and BOVE, J.M., 1974. Studies of Stubborn Disease in Corsica In 'Proc. 6th.Conf. 10 CV' (Weathers, L.G., Cohen, M.) 23-25 p. Univ. Calif. Div. Agri. Sci. Berkeley.
- YOKOMI, R.K., MELLO, A.F.S., SAPONARI, M., and FLETCHER, J., 2008. Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with Citrus Stubborn Disease. *Plant. Dis.* 92:253-260.
- YOKOMI, R.K., SAPONARI, M., METHENEY, P., POLEK, M., and VIDALAKIS, G., 2009. Genetic diversity of *Citrus Tristeza virus* isolates collected recently in California. *Phytopathology* 99:S147.

- YOKOMI, R.K., MELLO,, A.F.S., FLETCHER, J., and SAPONARI,, M., 2010a. Estimation of Citrus Stubborn Disease Incidence in Citrus Groves by real-time PCR. Conference of International Organization of Citrus Virologists.
- YOKOMI, R.K., POLEK, M., GRAFTON-CARDWELL, B., VIDALAKIS, G., O'CONNELL, N., and SAPONARI, M., 2010b. Assessment of the *Citrus tristeza virus* isolates detected in spring 2007 at the Lindcove Research and Extension Center, Exeter, California. International Organization of Citrus Virologists Proceedings. Available: <http://www.ivia.es/iocv/>
- YOKOMI, R.K., SAPONAI, M., and SIEBURTH, P.J., 2010c. Rapid Differentiation and Identification of Potential Severe Strains of Citrus tristeza Virus by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Phytopathology*. 100:319–327.





## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Adana'nın Tufanbeyli ilçesinde doğdu. İlkokulu Kayseri, orta ve lise öğrenimini ise Mersin'de tamamladı. 2006 yılında Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nın Yüksek Lisans öğrencisi olarak kaydoldu. 2007–2008 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Yabancı Diller Eğitim Yüksekokulu (YADİM)'nda İngilizce eğitimi aldı. 2009–2010 yılları arasında yapmış olduğu Yüksek Lisans çalışmasını tamama aşamasındadır.

## **EKLER**

### **Ek 1.**

#### **ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler**

##### **1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)**

8.0 gr	NaCl
0.2 gr	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2.9 gr	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O veya
	2.3 gr Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	1.44. gr Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O
	1.15 gr Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhdrous)
0.2 gr	KCl
0.2 gr	NaN <sub>3</sub>

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C de saklanmıştır.

##### **2. Coating buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)**

1.59 gr	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
2.93 gr	NaHCO <sub>3</sub>
0.2 gr	NaN <sub>3</sub>

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve 4 °C de saklanmıştır.

##### **3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)**

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

##### **4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)**

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

### **5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)**

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

### **6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)**

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra 0.2 gr NaN<sub>3</sub> konmuş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.

## **Ek 2.**

### **Total RNA Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler**

#### **1. Ekstraksiyon bufferı**

(100mM Tris-HCl pH.8.0, 50mM EDTA pH.7.0, 500mM NaCl, 10mM 2. mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl	2.4228 gr
EDTA	3.7224 gr
NaCl	5.844 gr

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

#### **2. % 20 Sodium Dodecyl Sülfate (SDS)**

20 gr sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

#### **3. Potasium asetat (CH<sub>3</sub>COOK) (5M)**

49.075 gr potasium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

#### **4. Sodium asetat CH<sub>3</sub>COONa(3M)**

40.824 gr sodium asetat 60 ml su içerisinde çözülmüş ve volum 100 ml ye tamamlanmıştır.

#### **5. % 70 lik Ethanol**

70 ml %99' luk ethanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70 lik ethanol hazırlanmıştır.

**6. 1X TE Tampon Çözeltisi (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8,0)**

0.157 gr Tris-HCl ve 0.037 gr EDTA 80 ml saf su içerisinde eritilmiştir.

Çözeltinin pH'sı 8,0 olarak ayarlanıp sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

## **EK 3**

### **Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**

#### **1. TAE Tampon Çözeltisi (10mM Tris, 5mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA) (pH: 8.3)**

1X TAE buffer hazırlamak için 1.211 gr Tris-Base, 0.680 gr sodium acetate ve 0.186 gr EDTA 900 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH' sı 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

#### **3. Farklı konsantrasyonlarda agaroz jel hazırlamak için;**

- % 1' lik agaroz jel için 300mg agaroz 30 ml 1x TAE içerisinde
- % 2' lik agaroz jel için 600 mg agaroz 30 ml 1x TAE içerisinde

#### **4. Ethidium Bromide**

10 mg ethidium bromide 1 ml saf su içerisinde ependorf tüpünde eritilmiştir. Daha sonra bu ana stoktan 30 µl alınarak 100 ml saf su içerisine ilave edilmiştir.