

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve KAZAK

**TURUNÇGİLLERDE GÖVDE KÖPÜKLENMESİNİN
VİROİD HASTALIKLARI AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2023

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TURUNÇGİLLERDE GÖVDE KÖPÜKLENMESİNİN
VİROİD HASTALIKLARI AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

Merve KAZAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. GASSAN KÖKLÜ
ÜYE

.....
Dr.Öğr.Üyesi ORHAN BOZAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TURUNÇGİLLERDE GÖVDE KÖPÜKLENMESİNİN VİROİD HASTALIKLARI AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI

Merve KAZAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Yıl: 2023, Sayfa:59
Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Prof. Dr. Gassan KÖKLÜ
: Dr.Öğr.Üyesi Orhan BOZAN

Son yıllarda turunçgil yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Çukurova Bölgesi'nde farklı turunçgil anaçları kullanılmaya başlanmıştır. Bu anaçların kullanıldığı bahçelerde sıklıkla ağaçların geriye doğru kuruduğu ve aşı birleşme noktalarında şiddetli köpüklenme belirtileri gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmada Çukurova Bölgesi'nde C35 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* Osb. 'Ruby'], Carrizo (*C.sinensis* Osb. x *P.trifoliata* Raf. var "Carrizo"), C22 (*C.sunki* × *P.trifoliata*) ve FA5 [*C.resnyi* Tan. X *P.trifoliata* (L.) Raf.] gibi anaçlara aşılı turunçgil plantasyonlarında köpüklenme belirtisi gösteren ağaçlarda *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ve *Citrus cachexia viroid* (CCaVd)'inin varlığı ve enfeksiyon durumları araştırılmıştır. Köpüklenme belirtisi gösteren farklı turunçgil anaç ve çeşitlerinden örnekler alınarak CEVd ve CCaVd etmenleri RT-PCR yöntemiyle taranmıştır. İncelenen 49 izolattan 17 tanesinin CEVd ile bulaşık olduğu, 14 tanesinin de CCaVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Her iki viroid etmenin birlikte bulaşık bulunduğu ağaç sayısı ise 4'tür. Blast analizi ve NCBI gen bankasındaki CEVd ve CCaVd'nin referans genomları ile nükleotid dizilimlerinin %96-99 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca köpük hastalığı belirtisi gösteren bu ağaçların köpüklü kabuk dokusundan fungal ve bakteriyel etmenlerin durumunu araştırmak için izolasyonlar yapılmıştır. İzolasyonlar sonucunda; *Lasiodiplodia theobromae*, *Ilyonectria liriodendri*, *Fusarium pseudonygamai*, *Alternaria alternata* ve *Streptomyces* spp. tespit edilmiştir. Bu etmenlerden yapılan patojenite testi sonucu bitkilerde herhangi kuruma ve ölüm belirtisi görülmemiştir. Örnek alınan bahçelerde toprak yapısının kireçli ve pH'sının 7.5 ve üzeri olduğu toprak analizleri sonucunda belirlenmiştir. Özellikle Üç Yapraklı ve hibritlerinin yüksek pH'ya duyarlı olduğu ve bu nedenle turunçgil ağaçlarının stres sorunu yaşayabileceği ayrıca araştırılan iki hastalık etmeninin bir arada bulunma sayısının az olması nedeniyle sinerjistik reaksiyon olasılığının az olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, Köpük, CEVd, CCaVd, RT-PCR

ABSTRACT

MSC. THESIS

INVESTIGATION OF TRUNK FOAMING ON CITRUS IN TERMS OF VIROID DISEASES

Merve KAZAK

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Year: 2023, Page: 59
Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Prof. Dr. Gassan KÖKLÜ
: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN

In recent years, different citrus rootstocks have started to be used in Çukurova Region, where citrus is grown intensively. In the orchards where these rootstocks were used, severe foaming symptoms were observed at the bud union points and the trees were often dried backwards. In this study, the presence of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and *Citrus cachexia viroid* (CCaVd) in trees showing foaming symptoms in citrus plantations grafted on rootstocks such as C35 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* Osb. 'Ruby'], Carrizo (*C.sinensis* Osb. x *P.trifoliata* Raf. var “Carrizo”), C22 (*C.sunki* × *P.trifoliata*) and FA5 [*C.resnyi* Tan. x *P.trifoliata* (L.) Raf] in Çukurova Region were investigated. CEVd and CCaVd agents were screened by RT-PCR method by taking samples from different citrus rootstocks and cultivars showing foaming symptoms. It was determined that 17 of the 49 isolates were infected with CEVd and 14 of them were infected with CCaVd.

The number of trees in which both viroid factors are infected together is 4. Blast analysis and reference genomes of CEVd and CCaVd in the NCBI gene bank were determined to have 96-99% similarity in nucleotide sequences. In addition, isolations were made from the foamy bark tissue of these trees, which show symptoms of foam disease, to investigate the status of fungal and bacterial agents. As a result of the isolations; *Lasiodiplodia theobromae*, *Ilyonectria liriodendri*, *Fusarium pseudonygamai*, *Alternaria alternata* and *Streptomyces* spp. were detected. As a result of the pathogenicity test made from these factors, no signs of drying or death were observed in the plants. As a result of soil analysis, it was determined that the soil structure was calcareous and the pH was 7.5 and above in the sampled gardens. It has been determined that especially trifoliata and hybrids are sensitive to high pH and therefore citrus trees may experience stress problems.

Key Words: Citrus, Foamy bark., CEVd, CCaVd, RT-PCR

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller yaklaşık 143 milyon ton üretim ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur (FAO, 2019). Ekonomik anlamda turunçgil tarımını sınırlayıcı en önemli faktörlerden birisi de turunçgil virüs ve viroid kaynaklı oluşan hastalıklardır (Semancik ve Weathers, 1972; Semancik ve ark., 1988). Bu hastalıklara sebep olan etmenlerden *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ve *Citrus cachexia viroid* (CCaVd) önemli bir yere sahiptir. CEVd turunçgillerde Üç Yapraklı [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] ve hibritlerinde belirti oluşturmakla birlikte tüm turunçgil tür ve çeşitlerini enfekte edebilmektedir (Roistacher, 1991). CEVd dayanıklı turunçgil türlerinde symptom göstermeden, ağaçlarda bodurluğa neden olabildiği ve birçok tür ve çeşidin dayanıklı olmasına rağmen, bu çeşitlerin duyarlı anaçlara aşılandığında karakteristik simptomlarından biri olan anaçta kabuk kavlamaları ve zank oluşumları görüldüğü bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949).

CCaVd'i ise duyarlı turunçgil çeşitlerinin kalem kısmında aşu birleşme yerinden başlayarak yukarı primer dallara kadar ilerleyen floem renklenmesi ve zank oluşumları, odunda çukurluklar ve buna karşı gelecek şekilde kabuk kambiyal yüzeyinde zanklı çıkıntılar şeklinde belirtiler gösterdiği 1961 yılında Calavan ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Dünyada turunçgiller genel olarak tohum, çelik ve öteki vejetatif yöntemlerle kolaylıkla çoğaltılabilirse de, özellikle hastalıklardan korunma, iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilme, verim ve kaliteyi arttırma, bitki büyümesini kontrol edebilme gibi nedenlerden dolayı anaç kullanma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, turunçgillerde çekirdeksiz çeşitlerin tohumla çoğaltılmalarının olanaksızlığı, çeşit muhafazasında mutasyon eğilimleri gibi nedenlerden dolayı, turunçgil yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Çukurova Bölgesi'nde son yıllarda farklı turunçgil anaçları kullanılmaya başlamıştır (Biçen, 2008; Yeşiloğlu, 2017). Bu anaçların kullanıldığı bahçelerde sıklıkla ağaçların geriye doğru kuruduğu ve aşu birleşme noktalarında şiddetli köpüklenme simptomlarının görüldüğü üreticiler tarafından bildirilmektedir.

Yapılan bu tez çalışması da Çukurova Bölgesi'nde C35 ((*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* Osb. 'Ruby')), Carrizo (*C.sinensis* Osb. x *P.trifoliata* Raf. var "Carrizo"), C22 (*C.sunki* × *P.trifoliata*) ve FA5 (*C.resnyi* Tan. X *P.trifoliata* (L.) Raf) gibi Üç Yapraklı (*P. trifoliata*) hibritleri olan anaçlara aşılı turuncgil plantasyonlarında köpüklenme semptomu gösteren ağaçlarda CEVd ve CCaVd'nin durumunu araştırmak ayrıca köpüklenmeye neden olabilecek diğer nedenleri belirlemek amacı ile yürütülmüştür. Yürütülen bu çalışma sonucunda ağaçlarda genel bodurluk, aşı birleşme noktasında kabuk kavlaması ve aşı birleşim yerinden aşağıya doğru beyazımsı köpük akıntıları gözlenen en belirgin semptomlardır. Bölgedeki köpüklenme belirtisi gösteren 49 ağaçtan örnekler alınarak CEVd ve CCaVd etmenleri açısından RT-PCR yöntemiyle taranmıştır. Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda toplamda 49 ağaçtan 13 tanesinin CEVd, 10 tanesinin CCaVd ve 4 tanesinin de CEVd ve CCaVd ile birlikte bulaşık olduğu tespit edilmiştir. CEVd ve CCaVd için 4'er izolat sekans analizine gönderilmiştir. Filogenetik analiz çalışması için ise DNA dizileri Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA XI) programı kullanılarak "Neighbour joining" metodu ile sınıflandırılmıştır. Blast analizi ve NCBI gen bankasındaki CEVd ve CCaVd'nin referans genomları ile nükleotid dizilimlerinin %96-99 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca köpük hastalığı semptomu gösteren bu ağaçların köpüklü kabuk dokusundan fungal ve bakteriyel etmenlerin durumunu araştırmak için izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Köpüklü kabuk dokusundan fungal patojenlerin tespiti için gerçekleştirilen izolasyonlar sonucunda *Lasiodiplodia theobromae*, *Ilyonectria liriodendri*, *Fusarium pseudonygamai*, *Alternaria alternata* izolatları elde edilmiştir. Bu etmenlerden köpüklenme semptomunu yapabilecek ve turuncgillerde patojen olan *L. theobromae* ve *I. liriodendri*' nin patojenite testi için Üç Yapraklı hibriti olan C35 bitkilerine inokule edilmiştir. İnolukasyon sonucunda odun dokuda hafif düzeyde lezyon belirtisi oluşturmuştur.

Bitkilerde kuruma ve ölüm belirtisi gözlenmemiştir. Ayrıca köpüklü kabuk dokusundaki bakteriyel patojenleri belirlemek için yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda sadece *Streptomyces* spp. izole edilmiştir. Elde edilen *Streptomyces* spp. izolatu patojenite testi için tütün bitkisine inokule edilmiştir ancak tütünde herhangi bir semptom oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Köpüklü semptomlar gösteren ağaçların olduğu bahçelerden alınan toprak örneği analizi sonucunda toprak pH'ının 7.5 ve üzeri olduğu belirlenmiştir. Kireç yapısına baktığımızda ise hemen hemen tüm toprakların yüksek oranda kireç içerdiği görülmekte ve bu durum bölgemizin genel toprak yapısı ile benzerlik göstermektedir.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yönlendiren, bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek kısa sürede tezime adapte olmamı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nüket ÖNELGE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bakteriyel ve fungal izolasyon çalışmalarında bana laboratuvarını açan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Doç. Dr. D. Soner AKGÜL hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar ve arazi çalışmam sırasında her türlü konuda yardım ve desteklerinden dolayı Zir. Yük. Müh. S. Büşra FİDANCI AVCI'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her anında varlıkları ile güç bulduğum, akıl danıştığım, desteklerini hep arkamda hissettiğim en büyük şansım olan arkadaşlarıma,

Her türlü desteği en ufak bir çekince duymaksızın gösteren, sonsuz güvenleriyle beni cesaretlendiren ve sabırla hep yanımda olan başta annem Bediha KAZAK ve babam Ersoy KAZAK'a, tüm güçlükleri aşmama yardımcı olan canım abim Erhan KAZAK'a en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Çalışma Materyali	13
3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyal.	13
3.1.3. Moleküler Çalışmada Kullanılan Materyaller	14
3.2. Metod.....	14
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi.....	14
3.2.2. Moleküler Çalışmalar	16
3.2.2.1. RT-PCR (Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir	
Reaksiyonu) Çalışmaları.....	18
3.2.2.1.(1). Tamamlayıcı DNA sentezi (cDNA)	18
3.2.2.1.(2). PCR aşaması	19
3.2.3. Elektroforez çalışmaları ve örneklerin görüntülenmesi.....	20
3.2.4. Sekans analizi ve verilerin karşılaştırılması	21
3.2.4.1. Biyolojik indekslemede kullanılacak bitkilerin	
yetiştirilmesi	21
3.2.5. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları	22

3.2.5.1. CEVd ve CCaVd'nin Etrog citron (<i>C.medica</i>) ve Mor kadife çiçeği (<i>G.aurantiaca</i>) bitkilerine İnokulasyonu.....	22
3.3 Köpük Simptomu Görülen Ağaçlardan Alınan Örneklerin Fungal Ve Bakteriyel Açidan İncelenmesi.....	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1 Arazi Gözlemleri	27
4.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma	28
4.2.1. RT-PCR Çalışmaları İle İlgili Bulgular	28
4.2.2. Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular	37
4.3. Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucu elde edilen bulgular.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Avustralya’ da yapılan bir çalışmada bazı anaçların özellikleri.....	7
Çizelge 3.1. Bahçelerden toplanan örneklerle ait bilgiler.....	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.....	20
Çizelge 3.3. Çalışmanın içeriği doğrultusunda modifiye edilen PCR koşulları	20
Çizelge 4.1. Köpük semptomu gözlenen ağaçlarda saptanan turuncuğil viroid hastalıkları	30
Çizelge 4.2. Köpük semptomu gözlenen ağaçlarda fungal ve bakteriyel etmenler	33
Çizelge 4.3. Kaliforniya'daki köpüklenme semptomu gösteren Fukumoto ağaçlarının kök ve sürgün örneklerinden elde edilen izolasyon sonuçları	34
Çizelge 4.4. Köpük semptomu gözlenen turuncuğil bahçelerinden alınan toprak örneklerinin analiz sonuçları	36
Çizelge 4.5. CEVd ve CCaVd’ nin indikatör bitkideki semptomları	45



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Örnek alınan bahçeler.	13
Şekil 3.2. Alınan örneklerin total nükleik asit ekstraksiyonu.	17
Şekil 3.3. Elektroforez küvetine yerleştirilmiş örnekler.	21
Şekil 3.4. Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerinin yetiştirilmesi.	22
Şekil 3.5. Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerine viroid inokulasyonu.	23
Şekil 3.6. Bakteriyel izolasyon çalışması ve tütün bitkisinde hipersensetive reaksiyon testi.	24
Şekil 3.7. C35 bitkisine <i>L.theobromae</i> ve <i>I.liriodendri</i> etmenleri inokulasyonu.	25
Şekil 4.1. Köpük hastalığı görülen ağaçlarda yaprak dökülmesi ve geriye doğru ölüm belirtileri.	27
Şekil 4.2. CEVd için yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5'lik agar jeldeki görüntüsü.	29
Şekil 4.3. CCaVd için yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5'lik agar jeldeki görüntüsü.	29
Şekil 4.4. C35 bitkisine <i>L.theobromae</i> ve <i>I.liriodendri</i> etmenleri patojenite testi sonucu.	33
Şekil 4.5. CEVd için nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi ve filogenetik analiz çalışmaları için yapılan BLAST analizi ekran görüntüsü.	40
Şekil 4.6. CCaVd için nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi ve filogenetik analiz çalışmaları için yapılan BLAST analizi ekran görüntüsü.	40
Şekil 4.7. Blast analizi sonucunda CEVd için ADA1, ADA3, ADA6, ADA8 izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları.	42
Şekil 4.8. Blast analizi sonucunda CCaVd için ADA1, ADA2, ADA3, ADA7 izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları.	43

Şekil 4.9. Mekanik inokulasyon sonrası viroidlerin indikatör bitkide oluşturduğu epinasti ve nekrozlar.	45
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
A	: Adenin
BLAST	: Basic Local Aligment Search Tool
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CCaVd	: <i>Citrus cachexia viroid</i>
CEVd	: <i>Citrus exocortis viroid</i>
cm	: Santimetre
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid fosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FW	: Forward
G	: Guanin
gr	: Gram
P +	: Pozitif Kontrol
N -	: Negatif Kontrol
l	: Litre
M	: Markör
mg	: Miligram

ml	: Mililitre
mM	: Milimolar:
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
Nt	: Nükleotit
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
RE	: Reverse
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Reverse Transcriptase
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
sp.	: Tür
sPAGE	: Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
spp.	: Türler
T	: Timin
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Taq	: Termostabil polimeraz enzimi
TE	: Tris-EDTA
TKM buffer	: Tris Tris-KCl-MgCl ₂)
TNA	: Total Nükleik Asit
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Turunçgiller; portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*C. reticulata*), greyfurt (*C. paradisi*), limon (*C. limon*) ve laym (*C. auratifolia*) gibi ekonomik değeri yüksek olan citrus cinsi meyve ağacı türlerini de içine alan bir bitki topluluğudur. Ilıman iklim kuşağında yetiştiriciliği yapılmakta olup anavatanı Çin ve Hindistan'dır. Çin toplam turunçgil üretiminin %25, 62 kısmını oluşturarak en büyük turunçgil üreticisi ülke iken, onu %11,27 oranı ile Brezilya ve %8,12 oranı ile Hindistan takip etmektedir. Ülkemiz ise toplam dünya üretimin %2,53'lik kısmını oluşturarak en çok turunçgil üreten ülkeler arasında 7. sırada yer almaktadır (FAO, 2019).

Turunçgil yetiştiriciliğini olumsuz etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden biri de virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleridir. Bu viral etmenlerden en önemlileri *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus chlorotic dwarf-associated virus* (CCDaV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ve *Citrus cachexia viroid* (CCaVd)'dir. Bu hastalık etmenlerinin etkisini azaltmak için farklı anaçlar turunçgil tarımında sıklıkla kullanılmaktadır. Dünyada kullanılan anaçlar arasında, Amerika ve Arjantin'de Üç Yapraklı (*Poncirus trifoliata*) ve hibritleri, Florida ve Brezilya'da kaba limon (*C. jambhiri* Lush.) ve Rangpur laymı (*C. limonia* Osbeck), Güney Afrika'da ise Kleopatra mandarini (*C. reshni* Tan.) ve melezleri yer almaktadır. Ülkemizde ise, turunçgil meyveleri üretiminin büyük bir bölümünün sağlandığı Akdeniz Bölgesinde en yaygın anaç turunçtur (*C. aurantium* L.). Kuzeydoğu Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde ise Üç Yapraklı en yoğun kullanılan anaç durumundadır (Tuzcu ve ark., 2001).

Son yıllarda Akdeniz Bölgesinde Üç Yapraklı hibriti olan C35 (*P. trifoliata* (L.) Raf. X *C. sinensis* Osb. 'Ruby') anacı ismi sıkça duyulan ve üreticilerin de tercih ettiği bir anaç haline gelmiştir (Yeşiloğlu, 2017). C35 anacı Kaliforniya' da 1987 yılında Kaliforniya Üniversitesi'nde geliştirilmiştir. Üç Yapraklı ile Rubby kan portakalı (*C. sinensis* Osb. Ruby)'nın bir hibritidir. C35

anacı *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus cachexia virus* (CCaVd), *Pytophthora* spp. ve nematodlara karşı dayanıklı bir anaçtır (Lacey ve ark., 2006). C35 soğuğa karşı dayanıklıdır ancak CEVd etmenine, yüksek toprak pH'sına ve kireçli topraklara karşı toleranslı değildir (Skewes, 2017).

CEVd turunçgillerde Üç Yapraklı ve hibritlerinde, rangbur laymında hastalık belirtileri oluşturmakla birlikte tüm turunçgil tür ve çeşitlerini enfekte edebilmektedir. Ancak Üç Yapraklı ve hibritleri dışındaki çeşitlerde latent olarak bulunmaktadır (Roistacher, 2004). CEVd'nin Üç Yapraklı anacının üzerindeki karakteristik belirtileri anaçta kabuk kavlaması, çatlaklar ve ağaçta bodurluk olduğu bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949, Vernière ve ark., 2006).

CCaVd mandarin ve mandarin hibritleri gibi duyarlı turunçgil çeşitlerinin kalem kısmında aşı birleşme yerinden başlayarak yukarı primer dallara kadar ilerleyen floem renklenmesi, odunda çukurluklar ve buna karşı gelecek şekilde kabuk kambiyal yüzeyinde zamklı çıkıntılar şeklinde belirtiler gösterdiği bildirilmektedir (Calavan, 1961).

CEVd ve CCaVd turunçgillerde bilinen, hastalık oluşturan ve dünyada turunçgil üretim alanlarında yaygın olarak bulunan hastalık etmenleridir. Ancak bu hastalık etmenlerinin oluşturduğu makroskobik belirtiler üretimde kullanılan anaç çeşitleri ile farklılıklar göstermektedir.

Turunçgil tarımının son 20 yılda hızla arttığı Çukurova Bölgesi'nde son yıllarda çeşit farklılıklarının yanı sıra üretimde anaç farklılıkları da gelişmeye başlamıştır. Üretime yeni giren anaçlarla birlikte özellikle turunçgil viroid etmenlerinin makroskobik belirtileri daha fazla görülür hale gelmiştir. Bununla birlikte bölgenin farklı toprak yapısı özellikleri nedeniyle bu anaçlardan bir kısmı bahçe tesis etmek amacıyla geçirildiği topraklara uyum sağlamamakta ve toprak yapısı nedeniyle ağaçlarda stres faktörleri gelişimi sonucunda gelişim farklılıkları ve verim kayıpları gözlenir duruma gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı Çukurova Bölgesi'nde Üç Yapraklı hibritleri üzerine aşılı turuncgil plantasyonlarında köpüklenme semptomu gösteren ağaçlarda CEVd ve CCaVd etmeninin varlığını, birlikte bulunurluğunu ve semptom gelişimini belirlemek ayrıca stres faktörü olabilecek etmenleri araştırmak amacıyla yürütülmüştür.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Turunçgiller genellikle tohum, çelik vb. yöntemler ile çoğaltılabilirse de, hastalıkla mücadele, değişen iklim ve toprak koşullarına adaptasyon, verim ve kalite gibi nedenlerden dolayı anaç kullanımı ortaya çıkmıştır. Ayrıca, turunçgillerde çekirdeksiz çeşitler, mutasyonlar, monoembriyonik çeşitlerin çok açılımlı bir genetiğe sahip olmaları, anaç kullanımı gerekliliğini ortaya çıkaran diğer faktörlerdir (Biçen, 2008).

Dünyada kullanılan anaçlar arasında, Amerika ve Arjantin'de Üç Yapraklı (*P.trifoliata*) ve melezleri, Florida ve Brezilya'da Kaba limon (*C.jamphiri*) ve Rangpur laymı (*C.limonia*), Güney Afrika'da ise Kleopatra mandarini (*C.resnyi* Tan.) ve melezleri yer almaktadır. Ülkemizde ise, turunçgil meyveleri üretiminin büyük bir bölümünün yapıldığı Akdeniz Bölgesinde en yaygın anaç turunçtur (*C.aurantium*). Kuzeydoğu Ege ve Doğu Karadeniz bölgelerinde ise Üç Yapraklı (*P.trifoliata*) kullanılan en yaygın anaç durumundadır. Son yıllarda Ege ve Akdeniz Bölgesinde Carrizo (*P.trifoliata* Raf. x *C.sinensis* Osb var. Carrizo) sitranjının portakal, mandarin ve altıntop türlerine anaç olarak kullanımı hızlı bir artış göstermiştir (Tuzcu ve ark., 2001).

C35 anacı Akdeniz bölgesinde son yıllarda ismi sıkça duyulan ve üreticilerin de tercih etmeye başladığı bir anaç haline gelmiştir (Yeşiloğlu, 2017). C35 anacı Kaliforniya'da 1987 yılında Kaliforniya Üniversitesi'nde geliştirilmiştir. Üç Yapraklı ile Rubby kan portakalının (*P.trifoliata* (L.) Raf. X *C. sinensis* Osb. 'Ruby') bir melezidir. C35 anacı *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus cachexia virus* (CCaVd), *Pytophthora spp.* ve nematodlara karşı dayanıklı bir anaçtır (Lacey ve ark., 2006). C35 soğuğa karşı dayanıklıdır ancak yüksek toprak pH'sına ve kireçli topraklara karşı toleranslı değildir (Skewes, 2017).

Turunçgillerde yapılan bir çalışmada aşı ve kalem uyumları incelenmiştir. C35 anacının Navelina portakalına uyumlu olmadığı aynı zamanda Hockey navel

portakalı, Summer Gold navel portakalı, Murcott tangor gibi çeşitlerde de bazı uyuşmazlıklara sebep olduğu bildirilmiştir (Skewes, 2017).

Yine yapılan farklı bir çalışmada C35 anacının mandarinler ile uyumlu olduğu bir diğer çalışmada ise; Murcott çeşidinin toprak türleri arasında performansında büyük farklılıklar olduğu çoğu ağacın kötü performans gösterdiği bildirilmiştir (Ferguson ve ark., 1990; Castle ve Baldwin, 2006).

Yapılan çalışmalarda C35 anacı üzerine aşılı Clemenules mandarini ve Fukumoto portakalının diğer anaçlara kıyasla daha fazla uyumsuzluk sorunlarına neden olduğu ve ağaçların geriye doğru ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2009).

Avusturalya da yapılan bir çalışmada bazı turuncgil anaçları farklı faktörlere göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede en iyi performans gösteren anaç 1, en kötü ise 5 olarak skalendirme yapılmıştır (Çizelge 2.1). C35 sitranjına bakıldığında; *Citrus tristeza virüs* (CTV)'ine, toprak kökenli bir fungus olan *Phthophthora* spp. ve turuncgil nematodlarına karşı daha iyi bir anaç olarak gözüksede kireçli ve tuzlu topraklara oldukça uyumsuz yani duyarlı bir anaç olduğu belirtilmiştir (Khurshid ve ark., 2021).

Çizelge 2.1. Avustralya’da Yapılan Bir Çalışmada Bazı Anaçların Özellikleri

Turunçgil anaçları	Turunçgil nematodu	Phytophthora spp.	Tristeza virüs	Kireç	Tuzluluk
Benton Sitranj	?	2	1	4	4
C35 Sitranj	2	2	1	4	3
Carrizo Sitranj	3	2	1	4	3
Kleopatra mandarin	4	3	1	1	1
Citrus macrophylla	4	3	5	2	2
Poncirus trifoliata	1	1	1	5	5
Rough limon	4	4	2	3	4
Portakal	4	5	2	4	3
Swingle citrumelo	1	2	1	5	2
Troyer Sitranj	3	2	1	4	3
Citrus volkameriana	4	4	1	3	2

1 = Listelenen anaçların en iyisi;
5 = Listelenen anaçların en kötüsü.

(Khurshid ve ark., 2021)

Turunçgillerin tuzluluğa olan toleransı iklim, toprak tipi, sulama sistemi, anaç kalem kombinasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Çimen ve Yeşiloğlu, 2016). Tuzlu sulama suyu turunçgillerin büyümesini ve verimi etkilediğinden dolayı turunçgiller tuza duyarlı bitkiler olarak sınıflandırılmıştır (Prior ve ark., 2007; Córdoba ve ark., 2018; Alqahtani ve ark., 2019; Colmenero-Flores ve ark., 2020).

Kaliforniya’da yapılan bir çalışmada ise C35 anacı üzerine aşılı Fukumoto navel portakal ağaçlarında ciddi kayıpların olduğu bildirilmiştir ve bu kayıpların olduğu ağaçlarda köpük şeklinde akıntılar gözlenmiştir. Ağaçlardaki bu köpüklenmeden dolayı hastalık ‘köpüklü kabuk hastalığı (foamy bark rot)’ olarak adlandırılmıştır. Köpük hastalığı görülen ağaçlarda var olan patojenlerin değerlendirilmesi yapılmış başta *Phytophthora citrophthora* olmak üzere çeşitli fungal ve bakteriyel etmenlerin varlığı belirlenmiştir (Adesemoye ve ark., 2011).

Kaliforniya’da yapılan başka bir çalışmada meşe ağaçlarında *Ambrosia beetle* [*Trypodendron* sp., *Gnathotrichus* sp., *Xyleborus* sp. (Curculionidae: Scolytinae), *Platypus* sp. (Curculionidae: Platypodidae)] tarafından taşınan bir fungusun (Botryosphaeriaceae; *Diplodia corticola*, *Dothiorella iberica* ve *Diplodia agrifolia* sp. nov.) meşe ağaçlarında kırmızımsı ve krem renkli köpüklenme, gövde ve yan dallarda krem renkli köpüklenme ve kırmızımsı özsu belirtileri oluşturduğu belirlenmiştir (Eskalen ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalara göre, viroidlerin dünyada yaygın olarak bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Birçok bitki türlerinde örneğin patates, üzüm, turunçgil, hindistancevizi, şerbetçiotu, domates, avokado, şeftali, elma, armut, patlıcan ve krizantemde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu saptanmıştır (Hadidi ve ark., 2003).

Viroidlerin ölümcül, şiddetli, orta gibi değişken zarar biçimlerine sahip olduğu saptanmış, ürün ve kalite kaybına önemli şekilde yol açabileceği tespit edilmiştir (Randles, 2003).

Ülkemizde turunçgil viroidlerinin varlığı ilk kez yabancı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. FAO uzmanı olarak ABD’den gelen Norman ülkemiz turunçgillerinde farklı virüs hastalıklarının yanı sıra exocortis ve cachexia hastalıklarının varlığını da bildirmiştir (Norman, 1963). Turunçgil cüceleşme hastalığının Türkiye’de var olduğunu bildiren bir diğer araştırmacı da Moreira (1965) olmuştur.

Turunçgil cüceleşme hastalığına neden olan CEVd ilk olarak Kaliforniya’da yapılan bir çalışmada Üç Yapraklı anacı üzerinde tanımlanmış ve viroidin aşısı gözü ile taşındığı belirlenmiştir (Fawcett ve Klotz, 1948). Başlangıçta Scaly butt hastalığı olarak adlandırılan CEVd dünyada turunçgil yetiştirilen birçok bölgeden rapor edilmiştir (Benton ve ark., 1949; Moreira, 1965; Wallace, 1978; Norman, 1963; Duran Vila ve Semancik, 2003). Etmen 371-410 nm uzunluğunda tek iplikçikli, sirkular formda, yaklaşık 105.000 dalton ağırlığında olup zayıf ve

şiddetli hastalık belirtileri geliştiren çok sayıda ırkı olduğu bildirilmiştir (Semancik ve ark., 1987).

CEVd'nin Üç Yapraklı anacının üzerindeki karakteristik belirtileri toprak üstü kısımlarında kabuk kavlamaları, çatlamları, soyulmalar ve bodurluk olduğu bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949).

CEVd turunçgillerde Üç Yapraklı ve hibritlerinde, rangbur laymında hastalık belirtileri oluşturmakla birlikte tüm turunçgil tür ve çeşitlerini enfekte edebilmektedir. Ancak Üç Yapraklı ve hibritleri dışındaki çeşitlerde latent olarak bulunmaktadır (Roistacher, 1991).

CEVd'e dayanıklı turunçgil türlerinde semptom göstermeden, ağaçlarda bodurluğa neden olabildiği ve birçok tür ve çeşidin dayanıklı olmasına rağmen, bu çeşitlerin duyarlı anaçlara aşılandığında karakteristik belirtilerinden biri olan anaçta kabuk kavlamaları görüldüğü bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949).

Viroid etmeninin ekonomik anlamda bitkiye zararı ağacın veriminin azalması ve ömrünün kısalması nedeni ile olmaktadır. CEVd turunçgil ağaçlarının gelişimini engelleyip, küçültürken meyve kalitesine herhangi bir etkisi yoktur. Bunun yanı sıra ağaç tacının küçülmesine bağlı olarak elde edilen ürün miktarının azaldığı bildirilmiştir (Broadbent ve ark., 1988).

CEVd ile enfekteli ağaçlarda erken meyve oluşumu gözlemlendiği ancak Rangpur laymının CEVd'inin şiddetli ırkı ile enfekteli olduğunda ağacın verim oranının %40-60 oranında azaldığı bildirilmiştir (Salibe ve Moreira, 1968).

CEVd ile enfekteli Üç Yapraklı anacı üzerinde aşılı Satsuma mandarin de gerçekleştirilen bir çalışmada, sürgün uzunluğunun ve gövde çapının kontrol bitkilere oranla %10 ile %40 oranında küçük olduğu rapor edilmiştir (Yamada ve Tanaka, 1972).

Antalya Turunçgiller Araştırma Enstitüsünde turunçgil virüs ve benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla yürütülen bir çalışmada mandarin ağaçlarının %30'unun cachexia, %72'sinin ise exocortis viroid hastalıklarıyla enfekteli olduğunu bildirmişlerdir (Hızal ve Güral, 1987).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Navel grubu portakallarda ve Satsuma mandarinler ile yürütülen bir çalışmada ise satsuma mandarin ağaçlarının %37 oranında cachexia hastalığı, portakal ağaçlarından yapılan indeksleme çalışmasında ise %83,3'nün exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Güllü, 1989).

Turunçgil Gözenekleşme hastalığı ilk kez 1950 yılında Childs adlı araştırmacı tarafından bulunmuş ve Latincede kötü koşul anlamına gelen 'Cachexia' olarak adlandırılmıştır (Childs, 1950).

Etmenin Orlando tanjelo (*C.paradisi* X *C.reticulata*)'nun floem dokularında oluşturduğu renk bozulmaları, kahverengileşme ve zamklanma ile birlikte gözlenen kabuk çatlamaları ve odun çöküntülerinin tanılanmak amacıyla belirlendiği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra Orlando tanjelo (*C.paradisi* Macf. X *C.reticulata* Blanco)' da görülen belirtiler Filistin tatlı laymında (*C.limettiodos*) gözlenmiş ve hastalık 'xyloporosis' olarak adlandırılmıştır (Reichert ve Perlberger, 1934).

İspanya ve Kaliforniya Üniversitesi'nin ortak yapmış olduğu çalışmalar sonucunda Cachexia hastalığının özellikle CVD-IIb tarafından oluşturulduğunu ve bu nedenle hastalık etmeni için Turunçgil Cachexia Viroidi (CCaVd) teriminin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir (Semancik ve Roistacher, 1991).

Mandarin ve mandarin hibritlerinin aşı birleşme noktasında floemde renk bozulması ve zamklanma belirtileri ile karakterize edilen bu hastalık etmeninin *Citrus Cachexia Viroid* (CCaVd)' i tarafından oluşturulduğu ve 299 nükleotide sahip olduğu 1988 yılında Semancik ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (Semancik ve ark., 1988).

Cachexia hastalığının duyarlı turunçgil çeşitlerinin kalem kısmında aşı birleşme yerinden başlayarak yukarı primer dallara kadar ilerleyen floem renklenmesi, odunda çukurluklar ve buna karşı gelecek şekilde kabuk kambiyal yüzeyinde zamklu çıkıntılar şeklinde belirtiler gösterdiği saptanmıştır (Calavan ve ark., 1961).

Turunçgil gözenekleşme hastalığı başta ABD, Çin, Avusturalya, İspanya olmak üzere Turunçgil yetiştirilen tüm ülkelerde bulunmaktadır (Duran-Vila ve ark., 1993; Sano ve ark., 1992; Gillings ark., 1991; Palacio ve Duran-Vila, 2000).

Gözenekleşme hastalığının ülkemizdeki varlığı farklı araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalar ile simptomolojik olarak belirlenmiştir (Reichert, 1959; Norman, 1963; Moreira, 1965).

Ege bölgesinde Özalp ve Azeri (1967) tarafından Ege bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada incelenen turunçgil ağaçlarının %23'ünün CCaVd ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Doğu Akdeniz bölgesinde Satsuma mandarinlerinde yapılan bir çalışmada sörvey gerçekleştirilen alanda ağaçların %37 oranında CCaVd ile enfekteli olduğu saptanmış ve yapılan biyolojik indeksleme çalışmaları ile de hastalığın tanılması gerçekleştirilmiştir (Güllü, 1989).

Önelge (1994) tarafından Doğu Akdeniz bölgesinde mandarinlerde gerçekleştirilen farklı bir çalışma da ise CCaVd'nin varlığı ve bu grupta yer alan diğer viroidleri (CVd-IIa, CVd-IIb ve CVd-IIc) sPAGE (Önelge, 1994) ve RT-PCR yöntemleriyle moleküler olarak tanılanmıştır (Önelge, 1996; Önelge ve ark., 2002).

Turunçgil gözenekleşme hastalığının etmeni olan CCaVd' i bulaşık aşı materyalleri, budama aletleri ve bitki özsuğu ile mekanik yollar ile taşınabilmektedir. Vektör ve tohumla taşınım konusunda herhangi bir bildirim yoktur (Roistacher, 1991; Eiras ve ark., 2009; Pethybridge ve ark., 2008).

Etmen özellikle mandarin ve hibritlerinde yaygın olup dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelerde bulunmaktadır. Cachexia (gözenekleşme) hastalığı nedeni ile ağaçların tamamen verimden düşüp geriye doğru ölümlerin yaşandığı bildirilmiş ve oluşan kayıpların cüceleşme hastalığına oranla çok daha fazla olduğu saptanmıştır (Reichert ve Bental, 1957).

Cachexia hastalığının duyarlı çeşitler üzerinde oluşturduğu kayıpların %75'in üzerinde olduğu ve bu derece yaygın olmasının çeşit değiştirme

işlemlerinde duyarlı çeşitlerin enfekteli ağaçlara aşılmasının büyük rol oynadığı belirtilmektedir (Semancik, 1987).

Turunçgil gözenekleşme viroidi hastalığının ülkemizdeki varlığı yabancı araştırmacılar Reichert (1959), Norman (1963) ve Moreira (1965) tarafından düzenlenen raporlarla simptomolojik olarak bildirilmiştir.

Bulaşık bitkinin aşı yerinde kabukta kahverengi lekeler ve şişlikler, yapraklarda ise küçülme ve sarı benek oluşumu meydana gelir. Türkiye’de bu viroidin varlığı Özalp ve Azeri (1967) tarafından İzmir ilinde Satsuma mandarini ağaçlarında tespit edilmiş, daha sonra diğer araştırmacılar bu konuda çok sayıda çalışma yapmıştır. Ege Bölgesi’nde 1964-1965 yılları arasında yapılan çalışmada, yaklaşık 2,5 milyon turunçgil ağacının bulunduğu bu bölgede ağaçların %23’ünün cachexia hastalığı ile bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Özalp ve Azeri, 1967).

Doğu Akdeniz Bölgesindeki bir araştırmada ise Satsuma mandarinlerinin %37 oranında gözenekleşme hastalığı ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Güllü, 1989).

Önelge (1994), gözenekleşme hastalığının mandarin ağaçlarında varlığını ve bu grupta yer alan diğer viroidleri (CVd-IIa CVd-IIb CVd-IIc) sPAGE ve RT-PCR yöntemleriyle tespit etmiştir (Önelge ve ark., 1997; Önelge ve ark., 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali

Çalışmada kullanılacak olan bitkiler Çukurova bölgesinde Üç Yapraklı (*Poncirus trifoliata*) hibritlerinden C35 (*P.trifoliata* (L.) Raf. X *C.sinensis*. Osb. 'Ruby'), Carrizo, C22 ve FA5 gibi anaçlar üzerinde aşılı turuncgil çeşitlerinden (mandarin, limon vb.) alınmıştır. Aşı birleşim yerinden aşağıya doğru beyazımsı köpük belirtileri gösteren turuncgil ağaçlarından alınan yapraklar ve aşı birleşim yerinden alınan bitki dokusu çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Örnek alınan bahçeler.

3.1.2. Biyolojik İndeksleme Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Yürütülen biyolojik indeksleme çalışmalarında CEVd ve CCaVd'nin tanımlanması için indikatör bitki olarak tohumdan yetiştirilen Etrog citron (*C.medica*) ve Mor kadife çiçeği (*Gynura aurantiaca*) bitkisi kullanılmıştır.

Fungal etmenlerin tespiti için ise; C35 (*P.trifoliata* L. Raf. X *C.sinensis*. Osb. 'Ruby') anacı, bakteriyel etmenin patojen olup olmadığını belirlemek için ise tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada, hassas terazi, mikrosantrifüj cihazı, CTAB buffer (PVP-40, Tris HCL, EDTA, NaCl, β -Mercaptoethanol), havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, %2'lik hipoklorit, kurutma kağıdı, 1,5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, derin dondurucu, vorteks ve santrifüj cihazı, kloroform: izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi, saf su cihazı gibi çeşitli materyaller ile laboratuvar aletlerinin sterilizasyonu amacıyla da otoklav ve etüv gibi ekipmanlar kullanılmıştır. Ayrıca PCR çalışmalarında CEVd ve CCaVd'ine spesifik primerler, TAE tampon, agar jel, elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 1000 ve 100 bp DNA markörü materyal olarak kullanılmıştır.

Tüm jellerin görüntülenmesi aşamasında UV transillüminatör cihazı ve jel yıkama tamponu olarak saf su ile seyreltilmiş etidyum bromür ve fotoğraflama aleti kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Çalışmada Kullanılan Örneklerin Elde Edilmesi**

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri Çukurova bölgesinde Üç Yapraklı hibritleri (*P.trifoliata*) üzerinde aşılı turuncgil çeşitlerinin (mandarin, limon, greyfurt) yetiştirildiği bahçelerden aşı birleşim yerinden aşağıya doğru beyazımsı köpük semptomu gösteren ve kontrol amacıyla köpük semptomu göstermeyen bitkilerden örnekler alınmıştır. Örnekler seçilen her bir ağacın farklı yönlerinden olmak üzere üçer adet dal ve yaprak kısımlarından alınmış ve etiketlenerek naylon torbalara yerleştirilerek buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turuncgil Virüsleri Laboratuvarı'na getirilmiş ve indeksleme ve moleküler tanı çalışmalarında kullanılmak üzere +4C°'de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Bahçelerden Toplanan Örneklere Ait Bilgiler

KONUM	ÖRNEK NO	ANAÇ	ÇEŞİT
Akdam	ADA1	C35	ROBINSON
Köylüoğlu	ADA2	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA3	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA4	C35	ROBINSON
Akdam	ADA5	C35	ROBINSON
Akdam	ADA6	C35	ROBINSON
Köylüoğlu	ADA7	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA8	C35	ROBINSON
Akdam	ADA9	C35	ROBINSON
Akdam	ADA10	C35	ROBINSON
Akdam	ADA11	C35	ROBINSON
Akdam	ADA12	C35	DOBASHİ BENİ
Akdam	ADA13	C35	DOBASHİ BENİ
Akdam	ADA14	C35	STAR RUBY
Akdam	ADA15	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA16	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA17	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA18	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA19	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA20	CARRİZO	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA21	CARRİZO	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA22	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA23	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA24	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA25	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA26	C35	W.MURCOT

Çizelge 3.1. devamı

Akdam	ADA27	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA28	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA29	C35	TANGO
Köylüoğlu	ADA30	FA-5	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA31	FA-5	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA32	FA-5	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA33	C22	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA34	C22	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA35	C22	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA36	C22	ENTERDONATO
Köylüoğlu	ADA37	C35	TANGO
Köylüoğlu	ADA38	C35	TANGO
Köylüoğlu	ADA39	C35	TANGO
Akdam	ADA40	C35	ROBINSON
Akdam	ADA41	C35	ROBINSON
Akdam	ADA42	CARRİZO	TANGO
Akdam	ADA43	CARRİZO	TANGO
Köylüoğlu	ADA44	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA45	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA46	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA47	C35	W.MURCOT
Köylüoğlu	ADA48	C35	W.MURCOT
Akdam	ADA49	C35	W.MURCOT

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

Köpüklenme hastalığı gösteren Üç Yapraklı hibritlerine aşılı turunçgil çeşitlerinde bulunan viroidlerin tanınması için CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tampon çözeltisi kullanılarak total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları Murray ve Thompson (1980)'e göre modifiye

edilerek uygulanmıştır. Çalışmalar Çukurova Üniversitesi Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri laboratuvarında yürütülmüştür.

Toplanan bitkilerden viroid saflaştırılması her bir örnek için aşağıda verilen protokole göre yapılmıştır (Şekil 3.2) .



Şekil 3.2. Alınan örneklerin total nüklei asit ekstraksiyonu.

- Bitki örneklerinin yapraklarından 300 mg miktarında alınarak 1:10 m/v CTAB ortamı eklenmiş ve homojen bir görüntü oluşana kadar ezilmiştir.
- Ezilen örneklerin öz suları 2 ml'lik tüplere 2 ml miktarında olacak şekilde alınmıştır.
- Örnekler 65°C'de 60 dakika boyunca sıcak su banyosunda ısıtılmıştır. Isıtılırken her 15 dakikada bir örnekler çalkalanmıştır.
- Isıtılan örnekler 10.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında tüpte iki faz oluşmuştur. Bu fazlardan bitki dokusu içermeyen üst bölgeden 1ml alınarak 2 ml'lik başka bir tüpe aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 1 ml Kloroform: İzamil alkol (24:1) eklenmiş iyice çalkalanmıştır.

- Örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra 750 µl üst fazdan alınarak 1,5 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Üzerine 450 µl soğuk 2-isopropanol eklenip kibarca 2 defa karıştırılmıştır. Sonrasında örnekler -20°C'ye alınmış ve 30-60 dakika inkübe edilmiştir.
- Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpten sıvı kısım dikkatli bir şekilde çöpe boşaltılmıştır.
- Tüpün tabanına çöken katı fazın üzerine %70'lik etanol eklenmiştir ve 13.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında dikkatli bir şekilde %70'lik etanol boşaltılmıştır.
- Örnekler hava yolu ile kurutulmuştur ve katı kısım 100 µl 1XTE ortamı ile çözdürülmüştür (Şekil 3.2).
- Elde edilen TNA ekstraksiyonları derindondurucuda -20°C' de kullanılanana kadar saklanmıştır.

3.2.2.1. RT-PCR (Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmaları

3.2.2.1.1. Tamamlayıcı DNA Sentezi (cDNA)

Çalışmanın ilk aşamasında tek iplik RNA yapısında olan viroidlerin RT enzimi yardımıyla cDNA sentezlemesi yapılmıştır. Bu sentezleme aşağıdaki Revers 1 ve Revers 2 aşamalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Revers 1

- ✓ 200 µl'lik tüplere her bir örnek için;
- ✓ 1µl dNTP,
- ✓ 1µl Random Primer\Revers Primer,
- ✓ 6µ ddH₂O ve

- ✓ 4µl Total Nükleik asit örneği eklenmiştir.
- ✓ Thermo cycle cihazında 95°C'de 3 dakika çalıştırılmış ardından örnekler 10 dakika buzda bekletilmiştir.

Revers 2

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

3.2.2.1.2. PCR Aşaması

- ✓ Buz üzerindeki steril 200µl'lik tüp içerisine her bir örnek için;
- 1µl Revers Primer (Çizelge 3.2)
- 1µl Forward Primer (Çizelge 3.2),
- 8,5µl ddH₂O ve
- 12,5µl Dream Taq eklenmiş ve kısa santrifüj yapılmıştır. Daha sonra üzerine 2 µl cDNA eklenerek hacim 25µl'ye tamamlanmıştır
- ✓ Kısa santrifüj yapılarak karıştırılan ürünler thermocycle cihazına yerleştirilmiştir.
- ✓ Kullanılan primerlerin, bağlanma sıcaklıklarına uygun PCR koşulları (Çizelge 3. 3) ayarlandıktan sonra sentez işlemi başlatılmıştır.
- ✓ Elde edilen tüm PCR ürünleri, elektroforez çalışmalarına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri

Primer	Primer dizilimi	Ürün boyutu (bp)
CEVd R	5'-CCGGGGATCCCTGAAGGACTT-3'	371 bp (Gross et al., 1982)
CEVd F	5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG-3'	
CEVd R	5'-ACCACAGGAACCTCAAGAAAG3'	371 bp (Önelge, 1997)
CEVd F	5'-GTGCTCACCTGACCCTGCAGG3'	
HSVd R	5'-TGCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGT-3'	302 bp (Sano et al., 1988)
HSVd F	5'-ACTCTTCTCAGAATCCAGCGAG-3'	
HSVd R	5'-CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT-3'	
HSVd F	5'-GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC-3'	

Çizelge 3.3. Çalışmanın İçeriği Doğrultusunda Modifiye Edilen PCR Koşulları

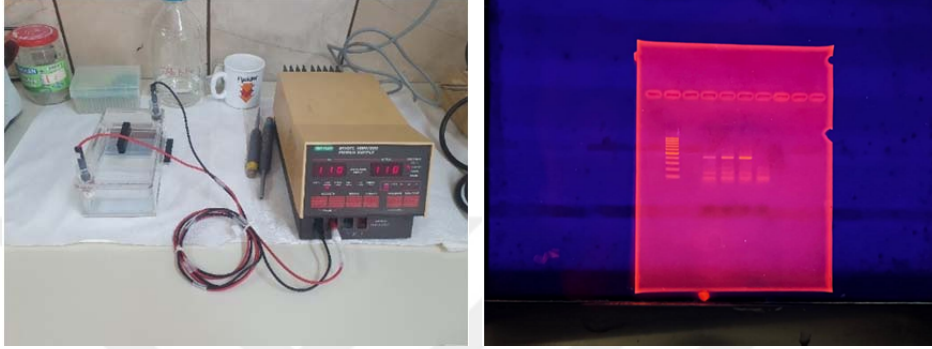
Ayrılma Sıcaklığı	94 °C	3 dakika	1 döngü
Bağlanma Sıcaklığı	94 °C	30 saniye	35 döngü
	57-60°C	30 saniye	35 döngü
	72 °C	1.5 dakika	35 döngü
Uzama Sıcaklığı	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.2.3. Elektroforez Çalışmaları ve Örneklerin Görüntülenmesi

Bu çalışma Önelge (1997)'ye göre yapılmıştır. Çalışma agar jelin hazırlanması, elektroforez cihazında jel yüklemesi ve etidyum bromürde bekletilen jelin UV de görüntülenmesi aşamalarından oluşmuştur. %1,5'lik agar jel aşağıda verilen yönteme göre hazırlanmıştır.

100ml 1 XTAE ortamı çözeltisi üzerine 1,5 mg toz agar eklenerek karışım homojen bir görüntü alınca kadar mikrodalga fırında çözdürülmüştür. Eritilen agar jel karışımı pleytlere dökülmüş ve jel donduğunda 1X TAE ortamı bulunan elektroforez küvetine yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Jel üzerinde bulunan kuyucuklara elde edilen ürünler ve marker yüklenmiştir. Elektroforez cihazı 886 Volt ve 110 Miliamperde 30-40 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Elektroforez işlemi bittikten

hemen sonra agar jel etidyum bromür çözeltisi içerisinde 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra UV ışını yardımı ile jel görüntülemesi yapılmış ve fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3.3. Elektroforez kuvetine yerleştirilmiş örnekler.

3.2.4. Sekans Analizi ve Verilerin Karşılaştırılması

Jel görüntülemesi sonucunda viroid etmeninin varlığının kesinleştiği PCR ürünleri aynı koşullarda PCR uygulanarak 50 µl hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örneklerin saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla firmaya gönderilmiştir.

Sekanslama işlemi tamamlanan tüm örneklerin baz dizilimleri Finch TV programı kullanılarak görüntülenip, mevcut baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında BLAST yöntemiyle kayıtlı ilgili organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri MEGA 11 VERSION (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak Neighbour Joining metodu ile sınıflandırılmıştır (Kumar ve ark., 2018).

3.2.4.1. Biyolojik İndekslemede Kullanılacak Bitkilerin Yetiştirilmesi

Biyolojik indeksleme çalışmalarında Etrog citron (*C.medica*) ve Mor kadife çiçeği (*G.aurantiaca*) bitkileri kullanılmıştır. Etrog citron bitkileri tohumdan

yetiştirilerek, mor kadife çiçeği bitkisi ise çelikleme yöntemi ile elde edilmiştir (Şekil 3.4). Etrog citron bitkileri 10 cm boyuna geldiğinde şaşırtılarak saksılara alınmıştır (Şekil 3.4). Bitkilerin gelişimi ve indeksleme çalışmaları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı İklimlendirme odasında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerinin yetiştirilmesi.

3.2.5. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları

3.2.5.1 CEVd ve CCaVd'nin Etrog Citron (*C.medica*) ve Mor Kadife Çiçeği (*G.aurantiaca*) Bitkilerine İnokulasyonu

Tohumdan yetiştirilen Etrog ve Mor kadife çiçeği bitkilerine agar jel üzerinde bant oluşturan CEVd ve CCaVd ile bulaşık olduğu belirlenen toplam 8 izolat inokule edilmiştir. İnokulasyon için TKM ortamı ile izolatların TNA çözeltilisi 1/1 oranında karıştırılmış ve iğne yardımıyla indikatör bitkilerin gövdesine çizik atılarak inokulasyon işlemi gerçekleştirilip gövdenin nemini koruması için gövde parafinle sarılmıştır (Şekil 3.5). Her bir izolat için 1 Etrog bitkisi inokule edilmiş ayrıca 1 bitki pozitif olarak inokule edilirken sadece TKM çözeltilisinin kullanıldığı 1 etrog bitkisi de negatif kontrol olarak çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerine viroid inokulasyonu.

3.3 Köpük Simptomu Görülen Ağaçlardan Alınan Örneklerin Fungal ve Bakteriyel Açıdan İncelenmesi

Bakteriyel açıdan incelenmesi için genel bir besi yeri olan tryptic soy agar (TSA) kullanılmıştır.

Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonunun belirlenmesi: Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına testlenecek izolatların 108 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir

(Şekil 3.6). 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).



Şekil 3.6. Bakteriyel izolasyon çalışması ve tütün bitkisinde hipersensitive reaksiyon testi.

Patojenite çalışmalarında fungusların PDA ortamında yetiştirilen 10 günlük kültürleri kullanılmıştır. Fidan gövdesinden mantar delici ile çıkarılan 5mm çaplı kabuk dokusunun yerine aynı büyüklükte kesilen patojenin 10 günlük miseliyel diski yerleştirilerek kabuk dokusu tekrar kapatılmıştır. İnokulasyon bölgesi ıslak pamuk alüminyum folyo ile kapatılarak fidanlar 20-25°C arasında klima odasında simptom oluşumuna kadar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. C35 bitksine *L.theobromae* ve *I.liriodendri* etmenleri inokulasyonu.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Arazi Gözlemleri

Adana ilinde Üç Yapraklı hibritleri üzerine aşılı turunçgil bahçelerinde köpüklenme hastalığı belirtileri gösteren plantasyonlar gezilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi bu plantasyonlardan köpük belirtisi gösteren 25 ağaç ve kontrol amaçlı köpük belirtisi göstermeyen 24 ağaç olmak üzere toplam 49 ağaçtan bitki dokusu ve yaprak örnekleri alınmıştır. Köpüklenme belirtisi gösteren ağaçların genellikle 10 yaş ve üzeri olduğu gözlenmiştir. Bu ağaçlara bakıldığında genel bodurluk, geriye doğru kurumalar ve aşı birleşme yerinde kavlamalar ve çatlamlar, anaç-kalem uyuşmazlığı belirtileri ve aşı birleşim yerinden aşağıya doğru beyazımsı köpürmeler gözlenmiştir (Şekil 4.1) .



Şekil 4.1. Köpük hastalığı görülen ağaçlarda yaprak dökülmesi ve geriye doğru ölüm belirtileri.

Ayrıca örnek almak için yapılan süreyde turunçgil bahçelerinde çoğunlukla Üç Yapraklı hibritlerinin (Carrizo, C35, C22 ve FA5) anaç olarak tercih edildiği gözlenmiştir. Bu anaçlar içinde en fazla tercih edilen anaçların Carrizo anacı ve C35 anacı olduğu gözlenmiştir.

Turunçgil bahçelerinde yapılan araştırmalar sonucunda bazı ağaçlarda görülen bodurluk, geriye doğru kurumalar, aşı birleşim yerindeki kavlamalar ve çatlamaların turunçgil viroid hastalıklarından CCaVd ve CEVd'i belirtilerine benzer olduğu belirlenmiştir.

Bu ağaçların gövde ve aşı birleşim yerindeki makroskobik semptomlarına bakıldığında özellikle CEVd'nin makroskobik semptomlarının varlığı belirlenmiştir. Ayrıca CCaVd ile ilgili olabilecek zamklanma belirtilerine de rastlanmıştır.

Gözlenen bu makroskobik semptomlar literatürde CEVd ve CCaVd için belirtilen makroskobik semptomlara benzerdir (Childs, 1950; Calavan, 1961; Semancik, 1988). Ayrıca bölgemizde daha önce yürütülmüş olan çalışmalarda turunçgil bahçelerinde CEVd ve CCaVd'nin varlığı araştırmacılar tarafından bildirilmiş (Reichert, 1959; Norman 1963; Moreira, 1965; Özalp ve Azeri, 1967) ve bu çalışmada gözlenen semptomların benzer olduğu belirlenmiştir.

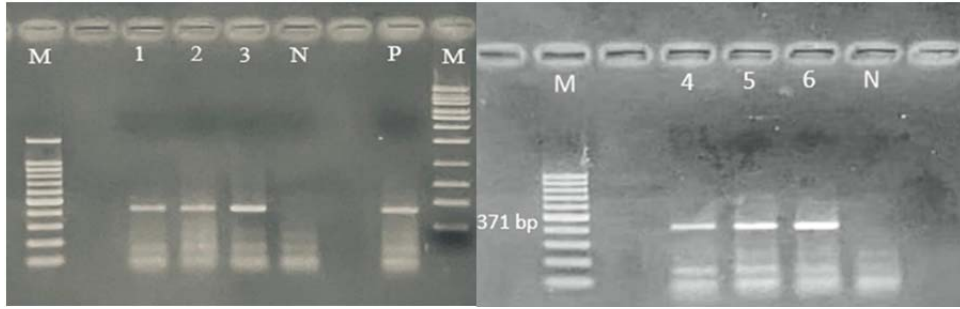
4.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Bulgular ve Tartışma

4.2.1. RT-PCR Çalışmaları İle İlgili Bulgular

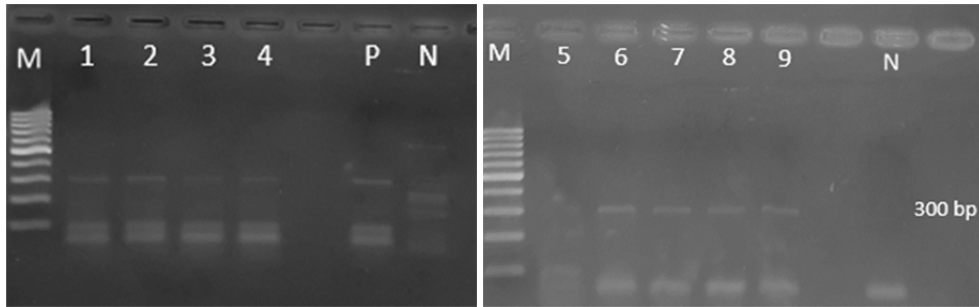
Adana ili turunçgil bahçelerinden Üç Yapraklı ve hibritlerinin anac olarak kullanıldığı köpük semptomu gösteren ve göstermeyen ağaçlardan alınan sürgün ve yaprak örneklerinde turunçgil viroid hastalıklarından CEVd ve CCaVd varlığının belirlenmesi için RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki etmenin turunçgil ağaçlarında varlığını belirlemek amacıyla toplam 49 adet örnek araziden alınmıştır. Alınan örneklerin 23 adedi W.Murcott mandarini (*C.reticulata* X *C.sinensis* (L.) Osbeck), 10 adedi Robinson mandarini, 7 adedi Enterdonato limonu (*C.limon* (L.) cv. *Interdonato*), 6 adedi Tango mandarini (*C.reticulata* Tango), 2 adedi Dobashi Beni mandarini (*C.reticulata* Blanco) ve 1 adet Star Ruby greyluft çeşididir (Çizelge 3.1). Alınan örneklerden 38 adedi C35, 4 adedi Carrizo, 4 adedi C22 ve 3 adedi FA5 anacı üzerine aşıdır (Çizelge 3.1).

Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda 49 örnekten 17 tanesinin 371 bp seviyesinde bant oluşturduğu ve bu ağaçların CEVd ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Şekil 4.2’de %1,5’luk agar jelde oluşan CEVd ile bulaşık örneklerin 371 bp seviyesindeki bant oluşumu gösterilmiştir.

CCaVd hastalığının varlığının belirlenmesi için gerçekleştirilen RT-PCR çalışmasında ise 49 örnekten 14 tanesinin ise 300 bp seviyesinde bant oluşturduğu belirlenmiştir. %1,5’luk agar jelde oluşan 300 bp seviyesindeki bant oluşumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Elde edilen bulgular CEVd ve CCaVd için daha önce yapılan çalışmalarla uygun baz seviyesindedir (Semancik 1988; Duran-Vila ve Semancik, 2003).



Şekil 4.2. CEVd için yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5’lik agar jeldeki görüntüsü.



Şekil 4.3. CCaVd için yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1,5’lik agar jeldeki görüntüsü.

RT-PCR çalışmalarında 4 ağaçta CEVd ve CCaVd birlikte aynı ağaç içinde karışım halinde bulunduğu belirlenmiştir. Turunçgil ağaçlarında hastalık etmeni olan CCaVd ve CEVd etmenleri köpük belirtisi gözlenen ağaçlarda çok az oranda karışım halinde bir arada bulunmuştur. Bu nedenle genel olarak hastalık etmenlerinin bir arada bulunması nedeniyle oluşabilecek sinerjistik reaksiyon oluşturma durumu köpük hastalığı için bu çalışmada söz konusu olmadığı RT-PCR çalışmaları sonucu ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.1. Köpük Belirtisi Gözlenen Ağaçlarda Saptanan Turunçgil Viroid Hastalıkları

KONUM	ÖRNEK NO	ANAÇ	ÇEŞİT	KÖPÜK	CEVd	CCaVd
Akdam	ADA1	C35	ROBINSON	+	+	+
Köylüoğlu	ADA2	C35	W.MURCOT	+	-	+
Köylüoğlu	ADA3	C35	W.MURCOT	+	+	+
Akdam	ADA4	C35	ROBINSON	+	+	-
Akdam	ADA5	C35	ROBINSON	+	+	-
Akdam	ADA6	C35	ROBINSON	+	+	-
Köylüoğlu	ADA7	C35	W.MURCOT	+	-	+
Akdam	ADA8	C35	ROBINSON	+	+	-
Akdam	ADA9	C35	ROBINSON	+	-	-
Akdam	ADA10	C35	ROBINSON	-	-	-
Akdam	ADA11	C35	ROBINSON	+	-	-
Akdam	ADA12	C35	DOBASHİ BENİ	-	-	-
Akdam	ADA13	C35	DOBASHİ BENİ	-	-	-
Akdam	ADA14	C35	STAR RUBY	-	+	-
Akdam	ADA15	C35	W.MURCOT	-	-	-
Akdam	ADA16	C35	W.MURCOT	-	-	-
Akdam	ADA17	C35	W.MURCOT	-	-	+
Akdam	ADA18	C35	W.MURCOT	-	+	+
Köylüoğlu	ADA19	C35	W.MURCOT	+	-	-
Köylüoğlu	ADA20	CARRİZO	W.MURCOT	-	-	-
Köylüoğlu	ADA21	CARRİZO	W.MURCOT	-	-	-
Köylüoğlu	ADA22	C35	W.MURCOT	+	-	+
Köylüoğlu	ADA23	C35	W.MURCOT	+	-	-

Çizelge 4.1. devamı

Köylüoğlu	ADA24	C35	W.MURCOT	+	-	-
Köylüoğlu	ADA25	C35	W.MURCOT	-	+	-
Akdam	ADA26	C35	W.MURCOT	-	+	-
Akdam	ADA27	C35	W.MURCOT	+	+	-
Köylüoğlu	ADA28	C35	W.MURCOT	+	-	-
Akdam	ADA29	C35	TANGO	-	+	-
Köylüoğlu	ADA30	FA-5	ENTERDONATO	-	-	+
Köylüoğlu	ADA31	FA-5	ENTERDONATO	-	-	-
Köylüoğlu	ADA32	FA-5	ENTERDONATO	-	+	+
Köylüoğlu	ADA33	C22	ENTERDONATO	-	-	+
Köylüoğlu	ADA34	C22	ENTERDONATO	-	-	+
Köylüoğlu	ADA35	C22	ENTERDONATO	-	-	+
Köylüoğlu	ADA36	C22	ENTERDONATO	-	-	-
Köylüoğlu	ADA37	C35	TANGO	+	-	-
Köylüoğlu	ADA38	C35	TANGO	+	-	+
Köylüoğlu	ADA39	C35	TANGO	-	-	+
Akdam	ADA40	C35	ROBİNSON	+	-	-
Akdam	ADA41	C35	ROBİNSON	+	-	-
Akdam	ADA42	CARRİZO	TANGO	-	-	-
Akdam	ADA43	CARRİZO	TANGO	-	-	-
Köylüoğlu	ADA44	C35	W.MURCOT	+	-	-
Köylüoğlu	ADA45	C35	W.MURCOT	+	-	-
Köylüoğlu	ADA46	C35	W.MURCOT	-	+	-
Köylüoğlu	ADA47	C35	W.MURCOT	+	+	-
Köylüoğlu	ADA48	C35	W.MURCOT	+	+	-
Akdam	ADA49	C35	W.MURCOT	+	+	-

Ayrıca köpük hastalığı simptome gösteren bu ağaçların köpüklü kabuk dokusundan fungal ve bakteriyel etmenlerin durumunu araştırmak için izolasyonlar yapılmıştır. İzolasyonlar sonucunda köpüklü kabuklardan izole edilen fungal etmenler *Lasiodiplodia theobromae*, *Ilyonectria liriodendri*, *Fusarium pseudonygamae*, *Alternaria alternata* olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Bu etmenlerden patojen olabileceği düşünülen *L.theobromae* ve *I.liriodendri* etmenleri patojenite testine alınmıştır (Şekil 4.4). Üç Yapraklı hibriti olan C35bitkisine bu patojen olabilecek etmenlerden inokulasyonlar yapılmış ve

inokulasyon sonucunda odun dokusunda hafif düzeyde lezyon belirtileri oluşturmuştur. Bitkilerde kuruma ve ölüm belirtisi gözlenmemiştir. Bakteriyel izolasyon çalışmalarında ise *Streptomyces* spp. izole edilmiştir. Bu etmen için patojenite testi gerçekleştirilmiş ve bütün bitkilerine inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyon sonucunda herhangi bir simptomla karşılaşılmamıştır. Literatürde turunçgillerde köpük hastalığı ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmadan bir tanesinde Kaliforniya’da turunçgil alanlarında gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bu çalışmada C35 anacı üzerine aşılı Fukumoto navel portakal ağaçlarında ciddi kayıpların olduğu bildirilmiştir ve bu kayıpların olduğu ağaçlarda köpük şeklinde akıntılar gözlenmiştir. Ağaçlardaki bu köpüklenmeden dolayı hastalık ‘köpüklü kabuk hastalığı (foamy bark rot)’ olarak adlandırılmıştır. Köpük hastalığı görülen ağaçlarda var olan patojenlerin değerlendirilmesi yapılmış başta *Phytophthora citrophthora* olmak üzere çeşitli fungal ve bakteriyel etmenlerin varlığı belirlenmiştir (Adesemoye ve ark., 2011) (Çizelge 4.3). Endonezya’da yapılan bir başka çalışmada ise bu çalışmada izole edilen fungal patojen olan *L. theobromae* (sinonimi: *Botryodiplodia theobromae*) turunçgil bahçelerinde ıslak diplodia (Wet Diplodia) olarak adlandırılan belirtiler oluşturup turunçgil ağaçlarının gövdesinde köpüklü akıntılar meydana getirdiği bildirilmiştir (Dwiastuti ve Aji 2021). Bizimde çalışmamızda elde ettiğimiz bu etmenlerden *L.theobromae*; Endonezya’daki, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. ve *Streptomyces* spp. ise Kaliforniya’daki izolasyon çalışmalarında elde edilen etmenlerle benzer olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. C35 bitkisine *L.theobromae* ve *I.liriodendri* etmenleri patojenite testi sonucu.

Çizelge 4.2. Köpük Simptomu Gözlenen Ağaçlarda Fungal ve Bakteriyel Etmenler

Fungal Etmenler
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Botryosphaeriaceae)
<i>Ilyonectria liriodendri</i> (Nectriaceae)
<i>Fusarium pseudonygamai</i> (Nectriaceae)
<i>Alternaria alternata</i> (Pleosporaceae)
Bakteriyel Etmenler
<i>Streptomyces</i> (Actinomycetota)

Çizelge 4.3. Kaliforniya'daki Köpüklenme Simptomu Gösteren Fukumoto Ağaçlarının Kök ve Sürgün Örneklerinden Elde Edilen İzolasyon Sonuçları

Organizma	Izole sayısı
Bakteri	
<i>Acinetobacter</i>	3
<i>Bacillus</i> spp.	6
<i>Pantoea</i> sp.	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	5
Total bacteria species:	15
Fungus	
<i>Aternaria citri</i>	1
<i>Alternaria</i> spp.	2
<i>Botryosphaeria</i>	3
<i>Fusarium solani</i>	12
<i>Fusarium oxysporum</i>	4
<i>Fusarium</i> sp.	2
<i>Fusarium equiseti</i>	3
Toplam fungus türü:	27
Oomycete	
<i>Phytophthora citrophthora</i>	1

Araştırmacılar köpük simptomsu gözlenen ağaçlarda bazı bakteriyel ve fungal hastalıkları incelemişler ancak viroid grubu patojenler açısından bu ağaçlarda herhangi bir araştırma yapmamışlardır. Bu çalışmada ele alınan viroid etmenleri (CEVd ve CCaVd) turunçgil ağaçlarında yaygın olarak bulunan iki hastalıktır. Bu hastalıklar bugüne kadar yetiştiricilikte kullanılan diğer anaçlarda herhangi bir köpük oluşumuna neden olmazken yeni geliştirilen C35 anacında köpük simptomsu oluşturması anacın gerek toprak yapısıyla gerekse iklim koşulları gibi fizyolojik nedenlerle veya ağaçlarda bulunan farklı patojenlerin yarattığı stres nedeniyle köpük oluşturabileceği düşünülmektedir.

Turunçgil viroid hastalıklarının dünya üzerinde dağılımına baktığımızda tüm turunçgil yetiştiricilik alanlarında var olan etmenler olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Salibe, 1986; Roistacher, 1991; Futch ve Bransky, 2004). Ancak özellikle sertifikalı ve turunçgil hastalıklarına karşı testlenmiş fidanların kullanılmadığı ülkelerde bu hastalıkların daha yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir (Fidancı ve ark., 2018). Ülkemizde sertifikalı turunçgil fidanı ile üretim yok denecek kadar azdır. Bu nedenle arazide bulunan ağaçların büyük bir bölümü özellikle mekanik olarak ta taşınan bu hastalıklarla bulaşmıştır. Bu çalışmada da görüldüğü gibi RT-PCR çalışmasında toplam 49 izolattan sadece 11 adedinde viroid etmenlerine rastlanmamıştır. Yüzde olarak ele aldığımızda incelenen isolatların %77,5'i viroid etmenleriyle bulaşık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu rakam oldukça büyüktür. Bu sonuç bize bölgemizde bu hastalıkların oldukça yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda araştırmacılar her iki viroid hastalığının bölgemizde yoğun olarak kullanılan turunç üzerine aşılı turunçgil ağaçlarında da yaygın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Son yıllarda bölgemizde yaygın olarak kullanılan anaçlarda özellikle CEVd'nin makroskobik belirtileri yoğun olarak görülmeye başlamıştır. Oysa bölgemizde yoğun olarak kullanılan turunç anacı etmenin semptomsuz taşıyıcısıdır. Bu nedenle özellikle 10 yaş ve üzeri ağaçlarda gözlenen kabuk kavlamaları bölge üreticisini tedirgin etmektedir. Son yıllarda laboratuvarımıza bu viroid hastalığı ile bulaşık pek çok örnek gelmiştir. Turunçgil üreticilerinin çeşit farklılığına gitmelerindeki esas neden *Turunçgil tristeza virüs* (CTV) hastalığıdır. CTV hastalığı özellikle turunç anacı üzerindeki ağaçları daha fazla etkilemekte ve etmenin şiddetli ırkları ağaçlarda ölüme neden olabilmektedir. Bu nedenle üretici özellikle hastalığın daha az etkilediği Üç Yapraklı ve hibritlerini anaç olarak kullanma eğilimine geçmiştir.

Bölgemiz turunçgil yetiştiricilik alanlarına baktığımızda toprak yapısının oldukça kireçli ve pH'sının yüksek olduğunu görmekteyiz (Çizelge 4.4). Yürütülen bu çalışmada örnek alınan ve köpük simptomsu gösteren izolatların toprak yapısını incelediğimizde 11 bahçede toprak pH'sının 7,5 ve üzerinde olduğu kireç oranının ise %18,3 olduğu görülmektedir. Bu nedenle özellikle Üç Yapraklı ve hibritlerinin anaç olarak kullanılması bu pH ve kirece uygun olmadığı pek çok ülkede yürütülen çalışmalarla ortaya konmuştur (Khurshid ve ark., 2021). Çizelge 3.1' de görüldüğü gibi Carrizo ve C35 anaçlarına baktığımızda yüksek pH ve kireç içeriğine sahip topraklarda sorun oluşturduğu belirtilmektedir. Bu toprak yapısında bitkiler strese girmekte ve yeterli verim alınamamaktadır. Avusturalya'da yapılan bir çalışmada bölgemizde de köpük simptomsunun görüldüğü C35 anaçlarının bu ülkede de sorun yarattığını ve benzer şekilde 10 üzeri ağaçlarda aşı birleşme noktalarında köpük simptomlarının ortaya çıktığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Turunçgil tarımının yapıldığı ve C35 anacının kullanıldığı Avusturalya plantasyonlarında pH'nın yüksek olduğu Khurshid ve arkadaşları (2021) tarafından belirtilmiş ve C35 anacı üzerindeki ağaçların söküldüğü bildirilmiştir. Bu verilere baktığımızda bölgemizde yaşanan sorunun benzer olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Köpük Simptomsu Gözlenen Turunçgil Bahçelerinden Alınan Toprak Örneklerinin Analiz Sonuçları

Arazi	Anaç	pH (6.5-7.5)	Konum	Tuz % (0.0-0.15)	Kireç % (5-15)	Organik Madde % (3-4)
1	C35	8,04	Akdam, Yüreğir 1	0,431	13,65	1,52
2	C35	7,68	Akdam, Yüreğir 2	0,01	21,11	1,33
3	C35	7,73	Akdam, Yüreğir 3	0,039	25,18	1,03
4	C35	7,62	Akdam, Yüreğir 4	0,032	19,39	0,5
5	C35	7,69	Akdam, Yüreğir 5	0,014	19,71	1,22
6	C35	7,67	Akdam, Yüreğir 6	0,013	23,62	1,1
7	C35	7,65	Akdam, Yüreğir 7	0,052	16,27	0,85
8	C35	7,64	Akdam, Yüreğir 8	0,03	12,98	1,41
9	C35	7,9	Köylüoğlu, Seyhan 1	0,7	16,26	1,92
10	C35	7,5	Köylüoğlu, Seyhan 2	2,6	14,3	2,21
11	C35	7,8	Köylüoğlu, Seyhan 3	1	19,77	1,63

4.2.2. Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analiz İle İlgili Bulgular

RT-PCR çalışması gerçekleştirilerek pozitif olarak belirlenen izolatlardan 8 izolatı için 50 µl hacminde çoğaltma işlemi yapılmış ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla firmaya gönderilmiştir. Bu firmadan alınan nükleotid dizilimleri fasta formatında aşağıda verilmektedir.

CCaVd

>ADA7 CCaVd

CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCAAGCAAAGAAAAACAAG
GCAGGGAGGAGACTTACCTGAGAAAGGAGCCCCGGGGCAACTCTTCTC
AGAATCCAGCGAGAGGCGTAGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTA
GAGGCTTCTTGCTTCGAAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTTACCTT
CTCCTGGCTCTTCGAGTGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTC
GTCTTCCAACCTGCTTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTC
TTGAGCCCCT

>ADA3 CCAVd

AACCCGGGGCAACCCTTCTCAGAATCCAGCGAGAGGCGTAGGAGAGAG
GGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTTCTTGCTTCGAAACACCATCGAT
CGTCCCTTCTTCTTTTACCTTCTCCTGGCTCTTCGAGTGAGACGCGACGG
GTGGCATCACCTCTCGGTTCGTCTTCCAACCTGCTTTTTGTCTATCTGAG
CCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCTCTGGGGAATTCTCGAGTTG
CCGCATGGGCAAGCAAAGAAAAACAAGGCAGGGAGGAGACTTACCT
GAGAAAGGAGCCCCGGGT

>ADA1 CCaVd

CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCAAGCAAAGAAAAACAAG
GGCAGGAGAGACTTACCTGAGAAAGGAGCCCCGGGGCAACTCTTCTCA
GAATCCAGCGGGGGCGTGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAG
GCTTCTAGCTTCGAAACACCAACGATCGTCCCTTCTTCTTTACCTCCTTC
TGGCTCTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTCGTCC

GACCTGCCTCTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGC
CCCT

>ADA2 CCaVd

CTTGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCAAGCAAAGAAAAACAAG
GGCAGGAGAGCCTTACCTGAGAAAGGAGCCCCGGGGCAACTCTTCTCA
GAATCCAGCGGGGGCGTGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAG
GCTTCTAGCTTCGAAACACCAACGATCTTCCCTTCTTCTTTACCTCCTTC
TGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTCTGCC
GACCTGCCTCTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGG
CCCT

CEVd

>ADA3 CEVd

GGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCCGGGGGGGTACAGCTGCTTCGGTCG
CCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGACTCCTTCC
TTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCACGCCCCCT
CGCCCGGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCTT
CAACCCCAAACCGCTTTTCTTATATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGG
TGAAAGCCCTCGGAACCCTAGATTGGGTCCCTCGGGATCTTTCTTGAGG
TTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAAAGAGG
CGGGCGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCCGG

>ADA6 CEVd

CGGAATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCCACCTGACCCTGCAGGCAG
AAAAAGAAAAAGATGGCGGGTGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCC
GGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCCGGGGGGAGCTTCTGCCTCGGTC
GCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGGGCTCGACTCCTTC
CTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCACCCC
TCGCCCTGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACCTGAAGCT
TCAACCCCAGTACCGCTTTTCTTGATCTCTACTGCTCTCCGGGCGAGGG
TGAAAGCCCTCGGAACCCTAGGTCCCT

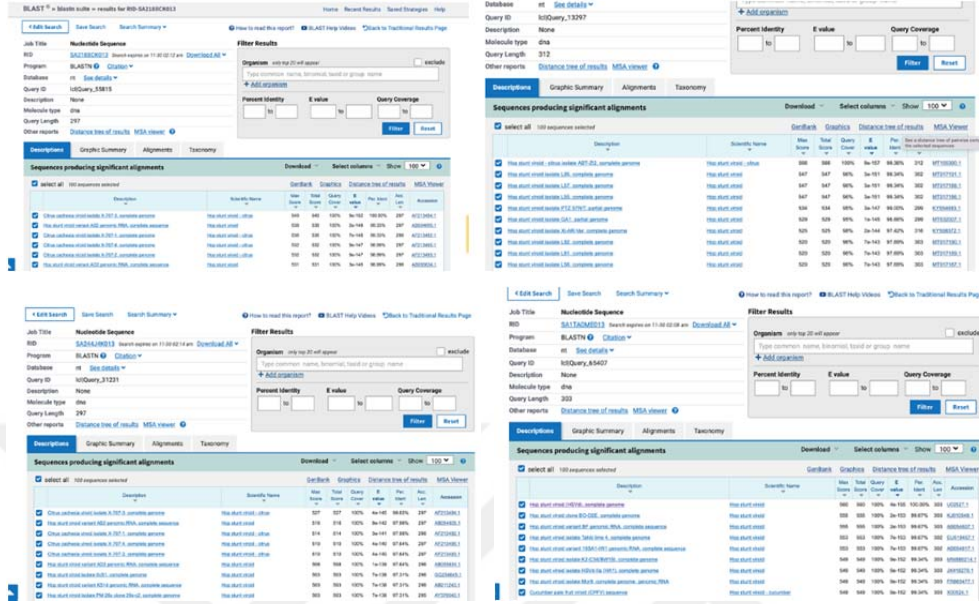
>ADA8 CEVd

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAG
AAAAAGAAAAAGATGGCGGGTGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCC
GGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCGGGGGGAGCTTCTGCCTCGGTC
GCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGTCTCCTTC
CTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGGGTTGCCACCCC
TCGCCCCGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACTGAAGCT
TCAACCCAGTACCGCTTTTCTTGATCTCTACTGCTCTCCGGGCGAGGG
TGAAAGCCCTCGGAACCCTAGAGTGGGTCCCT

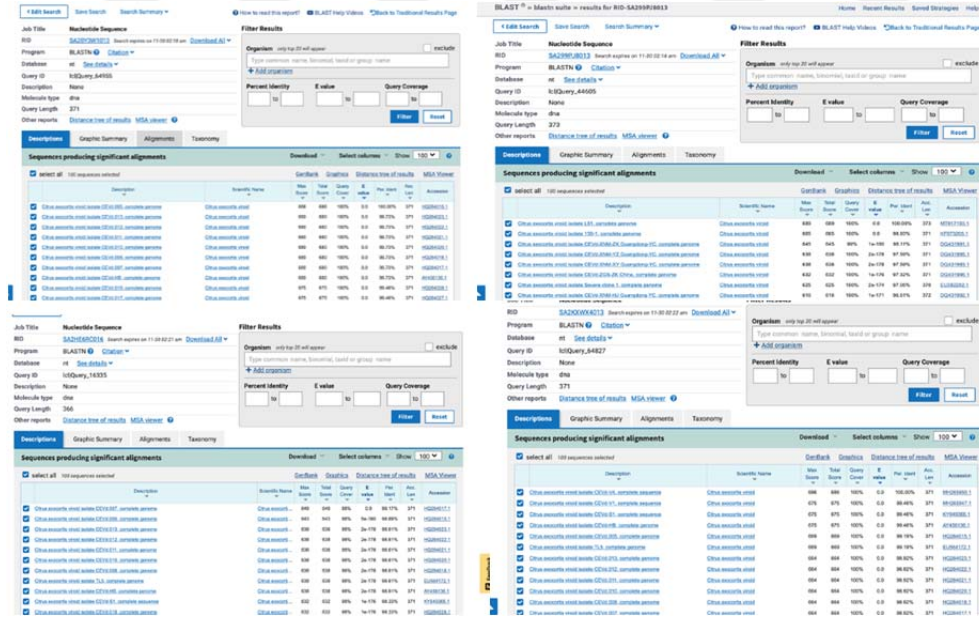
>ADA1 CEVd

CGGGATCTTTCTTGAGGTTCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAG
AAAAAGAAAAAGATGGCGGGTGGGGAAGAAGTCCTTCAGGGATCCCC
GGGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCGGGGGGAGCTTCTGCCTCGGTC
GCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGACTCCTTC
CTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAGGCGTCGCCACCCC
TCGCCCCGAGCTTCTCTCTGGCTACTACCCGGTGGATACAACTGAAGCT
TCAACCCAGTACCGCTTTTCTTGATCTCTACTGCTCTCCGGGCGAGGG
TGAAAGCCCTCGGAACCCTAGAGTGGGTCCCT

Görüntülenen baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak bu bankada kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Firmadan alınan sekans sonuçları NCBI gen bankasında bulunan kayıtlar ile karşılaştırılmasının sonucunda alınan ekran görüntüleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. NCBI ile gerçekleştirilen blast analizi sonucunda nükleotid dizilimi elde edilen ve farklı limon izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile %96 - %99 oranında benzerlik oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. CEVd için nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi ve filogenetik analiz çalışmaları için yapılan BLAST analizi ekran görüntüsü.

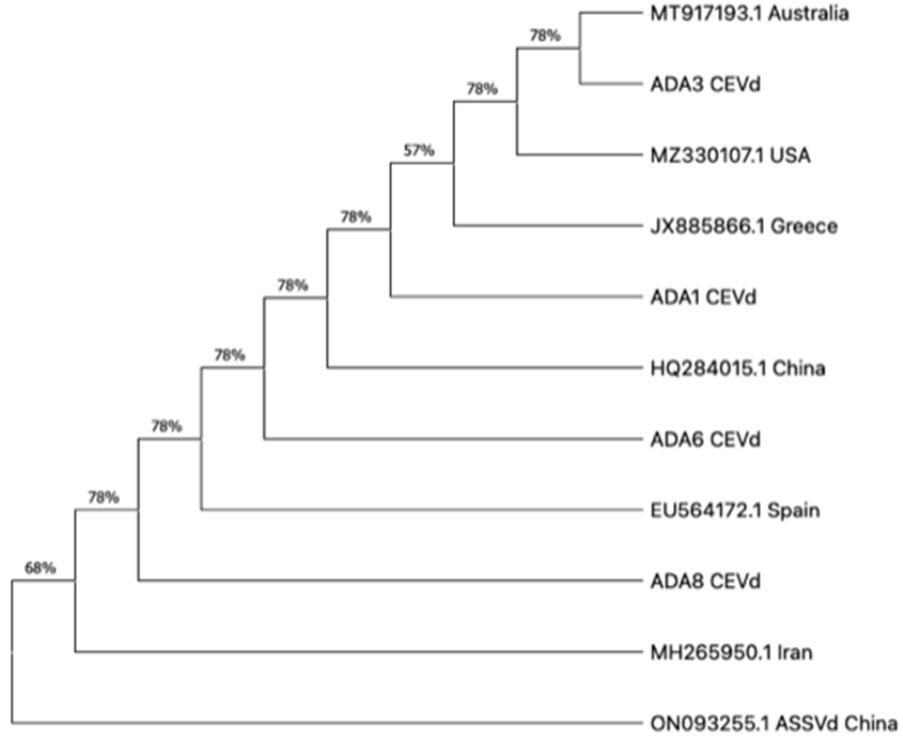


Şekil 4.6. CCoVd için nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi ve filogenetik analiz çalışmaları için yapılan BLAST analizi ekran görüntüsü.

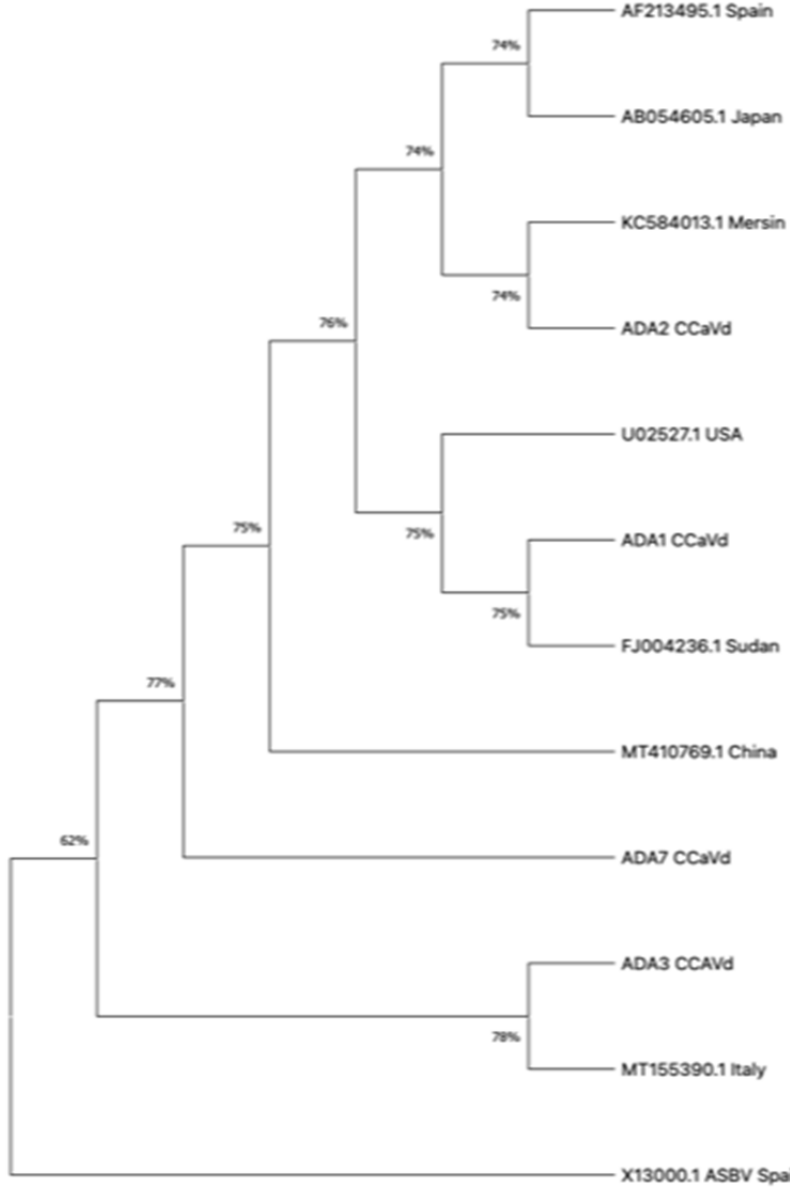
Mega 11 programı kullanılarak sekansı elde edilen izolatların filogenetik analiz yöntemiyle soyağacı elde edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Jel görüntüleme işlemi sonucu pozitif bulunan 8 adet izolat seçilmiş ve aynı koşullarda PCR ile çoğaltılıp saflaştırıldıktan sonra, nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla firmaya gönderilmiştir.

Elde etmiş olduğumuz nükleotid dizilimleri sonucu BLAST analizi yapılmış NCBI da kayıtlı bulunan diğer izolatlarla ile karşılaştırma yapıldığında CCaVd izolatları yaklaşık %98 oranında benzerlik göstermişlerdir. Bizim izolatlarımız kendi aralarında 2 farklı gruba ayrılmıştır. ADA7 ve ADA3 İtalya izolatıyla aynı grupta yer almış ve %98 oranında benzerlik göstermişlerdir. ADA1 ve ADA2 izolatlarımız diğer izolatlardan farklı bir gruba ayrılıp yaklaşık %96-98 oranında İspanya, Japonya ve farklı bir Mersin izolatıyla benzerlik gösterdiği filogenetik olarak ortaya konulmuştur (Şekil 4.8).

Exocortis viroidi için yapılan BLAST analizi sonucunda ise, NCBI da kayıtlı bulunan diğer izolatlar ile elde ettiğimiz izolatlar karşılaştırma yapıldığında yaklaşık %99 oranında benzerlik belirlenmiştir. Dizilimlerini elde ettiğimiz izolatlar birbirinden farklı gruplarda yer almışlardır. Ayrıca ADA8 izolatı İran izolatı ile %98 oranında benzerlik göstermişlerdir. ADA6 izolatı ise İspanya izolatı ile yakın bir homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir ve yaklaşık %98 oranında İspanya izolatı ile benzerlik göstermiştir. ADA1 izolatı Yunanistan izolatı ile %98 oranında benzerlik göstermiştir. Son olarak ADA3 izolatı Avusturalya izolatı ile aynı grupta yer almıştır ve benzerlik oranının %99 oranında olduğu ve diğer izolatlardan ayrıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Blast analizi sonucunda CEVd için ADA1, ADA3, ADA6, ADA8 izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları.



Şekil 4.8. Blast analizi sonucunda CCAVD için ADA1, ADA2, ADA3, ADA7 izolatlarının NCBI gen bankası verileri ile karşılaştırılması ve benzerlik oranları.

4.3. Biyolojik İndeksleme Çalışmaları Sonucu Elde Edilen Bulgular

Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda, CEVd ve CCaVd ile enfekteli olduğu saptanan örneklerin total nükleik asitleri kullanılarak indikatör bitki olan Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkileri üzerine mekanik inokulasyon gerçekleştirilmiştir. ADA1 ve ADA3 nolu izolatlar CEVd pozitif, ADA2 ve ADA7 nolu izolatlar CCaVd pozitif ve ADA45 nolu izolat ise CEVd ve CCaVd için negatif kontrol olarak biyolojik indeksleme çalışmasına alınmıştır (Çizelge 4.5).

İndikatör bitkilerdeki semptomlar inokulasyondan yaklaşık 2 ay sonra semptom gelişimi açısından gözlemlenmeye başlamıştır. CEVd' nin Mor kadife çiçeği bitkilerinde ilk gözlenen semptomlar ADA1 ve ADA3 nolu izolatları için yaprak kıvrıcıklığı ve epinasti semptomları olmuştur (Şekil 4.9). Daha sonra bu semptomların şiddeti artarak yaprak kıvrılmaları daha belirgin bir hal almıştır. Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi bitkilerde şiddetli bir bodurluk gözlenmiştir. Bodurluk, bitkilerin boğum aralarındaki kısalmalar nedeniyle CEVd'nin karakteristik belirtisi olarak gelişmiştir. Bu hastalık belirtileri Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerinde ortak semptomlar olarak gelişmiştir. Ayrıca Etrog citron yapraklarının arka yüzeyinde damarlarda nekroz oluşumları gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerden elde edilen TNA' lar ile inokule edilen bitkilerde herhangi bir semptom gelişimi gözlenmemiştir. Gerek ülkemizde gerekse dünyada turuncgil viroidleri ile yürütülen çalışmalarda Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerine yapılan inokulasyonlar sonucunda bu çalışmada gözlenen semptomlara benzerdir (Roistacher ve ark., 1977; Duran-Vila ve ark., 1988a,b). CEVd için yürütülen RT-PCR çalışmaları da bu çalışmada elde edilen bulguları desteklemiş ve agar jel üzerinde CEVd ait 371nt uzunluğunda bantlar elde edilmiştir. Mor kadife çiçeği bitkisi sadece CEVd'nin indikatör bitkisidir. CCaVd bu bitkide herhangi bir çiçeği semptom geliştirmemektedir. Etrog bitkisi ise tüm turuncgil viroidlerinin genel replikatör bitkisidir. Ancak bu bitki CCaVd için spesifik bir semptom geliştirmemekle birlikte diğer viroidlerle birlikte bulunduğu genel bir bodurlaşma boğum arası kısalma ve yaprak ucu nekrozu geliştirebilmektedir.

Yürütülen bu çalışmada da ADA1 nolu ve ADA2 nolu izolatları benzer belirtiler geliştirmiş yaprak uçlarında hafif nekroz (Şekil 4.7) ve genel bir bodurluk belirtisi gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. CEVd ve CCaVd'nin indikatör bitkideki belirtileri

İndikatör bitki	Etmen	Bodurluk	Epinasti	Nekroz oluşumu
Etrog citron	ADA1 (CEVd)	+	+	-
Etrog citron	ADA3 (CEVd)	+	+	-
Etrog citron	ADA2 (CCaVd)	-	-	+
Etrog citron	ADA7 (CCaVd)	-	-	+
Etrog citron	ADA45 (Negatif K.)	-	-	-
Mor kadife	ADA1(CEVd)	+	+	-
Mor kadife	ADA3 (CEVd)	+	+	-
Mor kadife	ADA2 (CCaVd)	-	-	-
Mor kadife	ADA7 (CCaVd)	-	-	-
Mor kadife	ADA45 (Negatif K.)	-	-	-



Şekil 4.9. Mekanik inokülasyon sonrası viroidlerin indikatör bitkide oluşturduğu epinasti ve nekrozlar.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Çukurova Bölgesinde Üç Yapraklı ve hibritleri üzerine aşıllı farklı turuncgil plantasyonlarında köpüklenme semptomu gösteren ağaçlarda CEVd ve CCaVd etmeninin varlığını, iki etmenin birlikte bulunma durumları ve semptom gelişimleri araştırılmıştır. Ayrıca köpüklenme semptomunu oluşturabilecek diğer nedenler incelenmiştir.

1. İncelenen 49 izolattan 17 tanesinin CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatlardan 14 tanesinin de CCaVd ile bulaşık olduğu yapılan analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Testlenen 49 izolatdan 4 tanesinin ise hem CEVd hem de CCaVd ile birlikte enfeksiyon oluşturduğu RT-PCR çalışmaları sonucu elde edilmiştir.
2. Elde edilen izolatlardan yapılan biyolojik indeksleme çalışmasıyla Etrog citron üzerinde CEVd'nin semptomları gözlenmiş CCaVd'nin ise hafif yaprak ucu nekrozu semptomlarına rastlanılmıştır.
3. Fungal ve bakteriyel etmenlerin durumunu araştırmak için yapılan izolasyonlar sonucunda tespit edilen fungal etmenler; *Lasiodiplodia theobromae*, *Ilyonectria liriodendri*, *Fusarium pseudonygamai*, *Alternaria alternata*'dır.
4. Bakteriyel izolasyon çalışmalarında ise *Streptomyces* spp. izole edilmiştir ve patojenite testi için tütün bitkisine inokulasyon yapılmıştır ve herhangi bir semptomla karşılaşmamıştır.
5. Fungal ve bakteriyel etmenlerin durumunu araştırmak için yapılan izolasyonlar sonucunda tespit edilen fungal etmenlerden Endonezya'daki izolasyon çalışmalarıyla ortak bulunan *L.theobromae*'nin patojen olabileceği düşünülmüş ve patojenite testine alınmıştır. Patojenite testi sonucu bitkilerde kuruma ve ölüm belirtisi gözlenmemiştir.

6. Yapılan bu çalışma sonucunda köpüklenme simptomlarına CEVd ve CCaVd etmenlerin neden olmadığı yürütülen moleküler çalışmalar ile ortaya konulmuştur ancak bölgemizdeki toprak yapısının son yıllarda artan farklı turunçgil anaçları ile uyumlu olmaması, anaç-kalem ve toprak uyumsuzlukları nedeniyle abiyotik bir hastalık olabileceği düşünülmektedir.
7. Turunçgil tarımının son 20 yılda hızla arttığı Çukurova Bölgesi'nde son yıllarda çeşit farklılıklarının yanı sıra üretimde anaç farklılıkları da gelişmeye başlamıştır. Üretime yeni giren anaçlarla birlikte özellikle turunçgil viroid etmenlerinin makroskobik belirtileri daha fazla görülür hale gelmiştir.
8. Çukurova'da turunçgil türlerinde C35, Carrizo, C22, FA5 gibi Üç Yapraklı hibriti olan anaçların CTV'ye karşı alternatif olarak kullanılabileceği üreticiler tarafından düşünülmektedir. Fakat bu anaçların çok tuzlu ve yüksek pH gösteren yerlerde turunç kadar başarılı olamadığı gözlenmiştir.
9. Bölgemiz toprakları genellikle kireçli ve tuzlu bir yapıya sahiptir. Bu nedenle yurt dışında geliştirilen ve bölgemizde de yeni yetiştirilmeye başlanan anaçların toprak ve pH isteklerinin iyi incelenmesi özellikle son yıllarda gelişen iklimsel faktörlerinde göz önünde bulundurularak bahçe dikimlerinin yapılması stres faktörlerinin yaratacağı sorunları azaltacağı düşünülmektedir.

Bölgemizin bitkisel ürün çeşitliliği ve ürün verimliliği oldukça yüksektir. Bitkisel üretimde verimliliği ve elde edilecek ürün miktarını etkileyen birçok olumsuz faktör bulunmaktadır. Tür ve çeşit seçiminde bahçe kurulacak yerin toprak ve iklim özellikleri doğrultusunda hastalıklardan arındırılmış, sertifikalandırılmış fidanları tercih edilmelidir. CEVd'i özellikle Üç Yapraklı ve hibritlerinde makroskobik belirtiler sergilemektedir. Bu nedenle Üç Yapraklı ve hibritlerinin anaç olarak kullanıldığı plantasyonlarda bu hastalık açısından dikkatli olunmalı ve hastalığa karşı testlenmiş üretim materyali kullanılmalıdır.

Turunçgil viroid hastalıklarının tümü mekanik olarak aşı bıçağı ve makaslarla taşınabildiğinden yetiştiricilik açısından gerekli hijyen kurallarına uyulması ve %2'lik sodyum hipoklorit ile temizlenmesi gerekmektedir.





KAYNAKLAR

- Adesemoye, A., Eskalen, A., Mayorquin, J., Roper, C., Wang, P., Vidalakis, G., ... & O'Connell, N., 2011. Understanding 'foamy bark rot' of Fukumoto navel. CRB Funded Research Reports, 26-28.
- Alqahtani M, Roy SJ, Tester M. 2019. Increasing Salinity Tolerance of Crops. In: Savin R., Slafer G. (eds) Crop Science. Encyclopedia of Sustainability Science and Technology Series. Springer, New York, NY.
- Amy, M. B., Igor, A. Y., & Steven, H. S., 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biology, 4, 14. doi:10.1186/1471-2229-4-14.
- Benton, R. J., Bowman, F.T., Fraser, L., and Kebby, R.G., 1949. Selection of Citrus Budwood to Control Scally Butt in Trifoliata Rootstock. Agric.Gaz. N.S. Wales 60, 31-34
- Bernad L., Duran-Vila N., 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Molecular Cell Probes 20:105-113.
- Biçen, B., 2008. Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Eksplant Kaynağı ve Besi Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi s: 87. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. Yüksek Lisans Tezi. s, 104.
- Bove, J.M., 1995. Virus and virus-like disease of citrus in the Near East Region. FAO, Rome eds: 518 p.
- Broadbent, P., Nicholls, P., and B. Freeman, 1988. Effect of Graft Transmissible Dwarfing Agents in Lemons. pp. 204-211, In. Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- Calavan, E. C., Christiansen, D. W., and Weathers, L. G., 1961. Comparative Reaction of Orlando Tangelo and Palestine Sweet Lime to Cachexia and Chlyporosis. pp. 150-158. In. Proc. 2nd Conf. IOCV. Univ. Of Fla. Pres, Gainesville

- Childs, J.F.L., 1950. The cachexia disease of Orlando tangelo. *Plant Dis. Rep.* 34, 295–298.
- Cimen B, Yesiloglu T. 2016. Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in citrus. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen.
- Colmenero-Flores JM, Arbona V, Morillon R, GómezCadenas A. 2020. Salinity and water deficit. In *The Genus Citrus* (pp. 291-309). Woodhead Publishing.
- Córdoba F, López-Pérez AJ, Navarro-García N, PérezTorner O. 2018. Mutant citrus rootstocks tolerant to salinity: in vitro assessment of the growth changes produced by salt. In *IV International Symposium on Citrus Biotechnology* 1230 (pp. 59-66).
- Diagnosis, 15- 30 October 1994. Adana- Turkey. Page: 89- 99.
- Duran-Vila, N., Cambra, M., Pina, J.A., Ballester, J.F., Navarro, L., 1988. Virus content and growth patterns of callus cultured in vitro from healthy and virus infected citrus species. In: Timmer LW, Gamsey SM, Navarro L. eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, Riverside: IOCV, s.310-21.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballester, J.F., Juarez J., Roistacher, C.N., Rivera Bustamante, R., Semancik, J.S., 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. In: Timmer LW, Gamsey SM, Navarro L, eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* Riverside IOCV, s.152-64.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., Semancik, J.S., 1988. Identification of citrus viroid Biological diversity of CRSV isolates 357 groups and their relationship to the exocortis disease. *Journal of General Virology* 69: 3069-80.
- Duran-Vila, N., Semancik, J. S., 2003. Citrus viroids, *Viroids*. s.178-194.

- Dwiastuti, M. E., & Aji, T. G. (2021, April). Citrus stem rot disease (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl) problem and their control strategy in Indonesia. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 752, No. 1, p. 012030). IOP Publishing.
- FAO, 2019. Web Sitesi: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/> Erişim tarihi:15.01.2022.
- Futch, S.H. and Brlansky, R.H., 2004. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus, Citrus Industry Magazine. Vol: 85 no.7 22-23pp.(Kaplankıran vd. 2001b)
- Gillings, M. R., BROADBENT, P., and GOLLNOW, B. I.,1991. Viroids in Australian citrus: Relationship to Exocortis, Cachexia and Citrus Dwarfing. Aust. J. Plant Physiol. 18: 559-570.
- Gross, H. J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., et al. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and Chrysanthemum stunt viroid. European Journal of Biochemistry, 121, 249–257. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb05779.x.
- Güllü, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel Grubu Portakal ve Satsuma Mandarin Ağaçlarında Yaygın Virüs ve Virüs-benzeri Hastalıkların Sörveyi ve İndekslenmesi Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi 266s.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S., 2003. Viroids. Csiro Publishing, Australia.
- Hızal, A. Y., Göral, V. T., 1987. Türkiye Turunęgil Üretimi-İhracatı ve Virüs Hastalıkları Yönünden Durumu. Derim, 4 (1):32-42.
- Kafa G., 2014 Web sitesi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/alata/Belgeler/Digerbelgeler/Turun%C3%A7gillerdeBah%C3%A7eTesisleriGKafa.pdf> Dr. Güçer KAFAYüksek Ziraat Mühendisi
- Karahocagil, P., 2003. Turunęgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11

- Khurshid, T., April 2021, Primefact 21/121, | NSW Department of Primary Industries April 2021
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6):1547–1549.
- Lacey, K., & Foord, G. 2006. Citrus Rootstocks for Western Australia. State of Western Australia-Department of Agriculture and Food. Farmnote, 155, 2006.
- Lee, A. T. C., Joubert, J., & van Vuuren, S. P. 2009. Rootstock choice. Integrated production guidelines for export citrus, 1, 6.
- Lelliot, R.A., Stead, D.E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: *Methods in Plant Pathology*, T.F. Preece, (Ed.). Black well Scientific Publications, Oxford. pp, 176-177.
- Moreira, S., 1965. Cachexia and Xyloporosis. Are the Caused by The Same Virus pp. 52 56. In *Proc. 3rd Conf. IOCV. Univ. Of Fla. Pres Gainesville*.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8:4321-4325
- Norman, P.A., 1963. Report to the government of Turkey on citrus virus diseases. FAO Report No: 1641.
- Önelge N, 1997. Direct nucleotide sequencing of Citrus exocortis viroid (CEV). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 21: 419-422.
- Önelge, N., 1994. Turunçgillerde Hastalık Oluşturan Viroidlerin Biyolojik ve Biyokimyasal (PAGE) Tanısı Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Doktora Tezi 93s.
- Önelge, N., 1996. Nucleotide Sequence of CVd-Ib and CVd-IV Viroid Collected from Citrus Gummy Bark Diseased Sweet Orange Trees in The East Mediterranean Region of Turkey. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheitenand Pflanzenschutz.* 103(5), 482-487.

- Önelge, N., Cinar, A., Szychowski, J.A., and Semancik, J.S. 2002. Cachexia related viroids associated with citrusgummy bark. In: Proceedings 15th Conference of theInternational Organization of Citrus Virologists. da Graça,J.V., Durán-Vila, N., and Milne, R.G. (eds.). RiversideCalifornia, USA (in press).
- Özalp Ve O., Azeri, 1967. Ege Bölgesinde Turunçgil Virüs Hastalıkları Surveyi, Bitki Koruma Bülteni, 7(4) 167-187.
- Palacio, A., And Duran-Vila, N., 2000. Citrus Cachexia Disease : Molecular Characterization of Its Viroid Agent. 14th Conf. IOCV. Riverside, 273-281
- Pethybridge, S.J., F.S. Hay, D.J. Barbara, K.C.Eastwell, and C.R. Wilson. 2008. Viruses andviroids infecting hop: Significance, epidemiol-ogy, and management. Plant Dis. 92:324–338,<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0324>.
- Prior LD, Grieve AM, Bevington KB, Slavich PG. 2007. Long-term effects of saline irrigation water on Valencia orange trees: relationships between growth and yield, and salt levels in soil and leaves. Aust. J. Agric. Res. 58: 349–358.
- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hadas, R., Bar-Joseph, M., & Sanger, H. L., 1991. Primary and secondary structure of Citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. Nucleic Acids Research, 19, 6640. doi:10.1093/nar/19.23.6640.
- Randles, J.W., 2003. Economic impact of viroid diseases. In: Viroids. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik J.S., (Eds.), Csiro Publishing: Australia, pp: 3-15.
- Reichert L. 1959. A survey of citrus virus diseases in the Mediterranean area. In J.M. Wallace, ed. Citrus virus diseases, p. 23-28. Riverside, Div. Agric. Sci., Univ. Calif.
- Reichert, I. & Perlberger, J.1934. Xyloporosis, the new citrus disease. Bull. Agr. Res. Sta. (Rehovat), 12: 1-49; Huclur, 7: 163167, 172,193-202

- Roistacher C. N., 1991. Graft-Transmissible Diseases Of Citrus. In: Handbook For Detection And Diagnosis. Fao, Rome.
- Roistacher C.N., 1995. A historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. FAO Rome (Eds.) 89 p.
- Roistacher, C.N. 2004 Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus. In Diseases of Fruits and Vegetables; Naqvi, S.A.M.H., Ed.; 2004; Vol. I, pp. 109-189.
- Salibe, A.A., (1986). Report to the Government of Turkey on a programme for Citrus Improvement and Protection in Turkey
- Salibe, A.A., And Moreira, S., 1968. Effect of Virus Diseases on Growth and Productivity of Citrus Trees. pp. 289-303. In. Proc. 4th Conf. IOCV. Univ. of Flo. Pres. Gainesville.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., and Owens, R.A., 1992. Identification of Multiple Structural Domains Regulating Viroid Pathogenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10104-10108.
- Sano, T., Hataya, T., & Shikata, E., 1988. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of Hop stunt viroid group. Nucleic Acids Research, 16, 347. doi:10.1093/nar/16.1.347.
- Semancik, J. S., 1987. Viroids and Viroid-like Pathogens. CRC Pres: Boca Raton. 127- 161
- Semancik, J.S. and Weathers L.G., 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants. Nature New biology 237 : 242-244.
- Semancik, J.S., C.N.Roistacher, N.Duran-Villa., 1988. A New Viroid is The Causal Agent of Citrus Cachexia Disease. In Proc. 10th Conf. IOCV. Riverside, 125-136.

- Sieburth, P. J., Irey, M., Garusey, S. M., Semancik, J. S., Levy, L., & Hilf, M. E., 2002. The Use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. Proceedings of the Fifteenth Conference on International Organization of Citrus Virologists, Riverside, California, 15, pp. 230–238.
- Skewes, M.A., 2017. Citrus Rootstock Technical Guide – Mature Tree Assessments.
- Tuzcu, Ö., Yeşiloğlu, T., Yıldırım, B., 2001. Citrus 2001 Reports : Turkey. Florida Grower Annual Edition. Mid.
- TÜİK., 2020. Türkiye İstatistik Kurumu, Web sitesi: (<http://www.tuik.gov.tr>), Erişim tarihi: 20.01.2022.
- USDA, 2020, The United States Department of Agriculture, Web sitesi: (<http://www.usda.gov>), Erişim tarihi: 20.01.2022.
- Uysal, O., Polatöz, S., 2017. Dünyada ve Türkiye'de turuncgil üretimi ve dış ticareti. Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi, 6(22), 4-9.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., ... & Vila, N. D. (2006). Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliate orange. Phytopathology, 96(4), 356-368.
- Wallace, J. M., 1978. Virus and Virus-like Diseases. pp. 67-184. In “The Citrus Industry”. Univ. Caf. Div. Agr. Sel.
- Wang, X., Zhou, C., Tang, K., Zhou, Y., & Li, Z., 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. European Journal of Plant Pathology, 124(1), 175-180.
- Yamada, S., And Tanaka, H., 1972. Damage from Eocortis in Japan . pp. 99-101. In Proc. 5th Conf. IOCV, Univ. Fla. Pess Gainesville.
- Yeşiloğlu, T., 2017. Turuncgil anaçlarının tarihçesi ve yeni anaçların geliştirilmesi. TÜRKTOB Dergisi, 22, 12-14.



ÖZGEÇMİŞ

Merve KAZAK, ilkokul, ortaokul ve liseyi Muğla iline bağlı ilçede tamamladı. 2014 yılında Ankara Üniversitesi/Yabancı Diller Yüksek Okulunda 1 Yıl İngilizce Hazırlık eğitimi aldıktan sonra Ziraat Fakültesi/Bitki Koruma Bölümü'ne başlayarak 2019 yılında mezun oldu. Aynı yıl aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Fitopatoloji Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlayıp, 2021 yılının Aralık ayında yatay geçişle Çukurova Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü'ne geçiş yaptı.