

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Pakize GÖK GÜLER

**ŞERBETÇİ OTU VE TURUNÇGİL BİTKİLERİNDE
BULUNAN VİROİDLERİN ARAŞTIRILMASI, BİYOLOJİK,
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BU BİTKİ
GRUPLARINDA VİROİD GEN BANKASI OLUŞTURULMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2023

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞERBETÇİ OTU VE TURUNÇGİL BİTKİLERİNDE BULUNAN
VİROİDLERİN ARAŞTIRILMASI, BİYOLOJİK, MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE BU BİTKİ GRUPLARINDA VİROİD GEN
BANKASI OLUŞTURULMASI**

Pakize GÖK GÜLER

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

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

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi ORHAN BOZAN
ÜYE

.....
Prof. Dr. Gülşen ŞAŞ SERTKAYA
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES
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

DOKTORA TEZİ

ŞERBETÇİ OTU VE TURUNÇGİL BİTKİLERİNDE BULUNAN VİROİDLERİN ARAŞTIRILMASI, BİYOLOJİK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BU BİTKİ GRUPLARINDA VİROİD GEN BANKASI OLUŞTURULMASI

Pakize GÖK GÜLER

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Yıl: 2023, Sayfa:161
Jüri : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Prof. Dr. Gülşen ŞAŞ SERTKAYA
: Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES

Bu çalışma; 2016-2018 yılları arasında Adana, Hatay, Mersin ve Osmaniye illerinde Turunçgil üretimi yapılan alanlarda ve Bilecik ili Pazaryeri ilçesi Şerbetçi otu üretimi yapılan alanlarda viroid hastalık etmenlerinin varlığını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Gündümlü survey çalışmaları ile toplanan örneklerde moleküler karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Çalışma kapsamında, turunçgil örneklerinin *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (CVd II) (CCaVd: Cachexia ve HSVd: Non-Cachexia), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd; CVd III), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd: CVd-IV), *Citrus viroid V* (CVd-V), *Citrus viroid VI* (CVd-VI) viroidleri ile ve Şerbetçi otu örneklerinin *Hop latent viroid* (HLVd) ve *Hop stunt viroid* (HSVd) viroidleri ile enfekteli olduğu her etmene ait spesifik primerler ile RT-PCR yöntemleri ile tanımlanmıştır. Turunçgil viroidleri açısından incelenen örneklerin Adana'da %70, Mersin'de %78, Hatay'da %77,5 ve Osmaniye'de %80 oranında kontamine olduğu RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Şerbetçi otu bitkilerinde Bilecik'in Pazaryeri ilçesinden toplanan 214 örneğin %66'sı HLVd, %23,8'i HSVd ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Moleküler olarak tanımlanmış ve nükleotid dizilimleri belirlenen izolatlar, NCBI kayıtlı izolatlarla %96-99 benzerlik göstermiştir. Bu çalışmada tanımlanan dizilimler, NCBI gen bankasına kaydedilmiştir. Bu çalışmada belirlenen HLVd ülkemiz için ilk kayıt olarak bildirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Şerbetçi otu, Turunçgil, Viroid hastalıkları, HSVd, RT-PCR

ABSTRACT

PhD. THESIS

STUDY OF VIROIDS IN HOP PLANTS AND CITRUS PLANTS, BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THESE VIROIDS AND FORMATION OF A GENE BANK.

Pakize GÖK GÜLER

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

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
Year: 2023, Page: 161
Jury : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN
: Prof. Dr. Gülşen ŞAŞ SERTKAYA
: Asst. Prof. Dr. Ali ENDES

This study was carried out to determine the latest status of citrus viroid agents in citrus growing areas of Adana, Hatay, Mersin, Osmaniye between 2016-2019 and to investigate for the first time viroid disease agents in hops production areas in Pazaryeri districts of Bilecik province. In the other part of the study, identification and molecular characterization of the obtained isolates were performed. Within the scope of the study, all viroid pathogens found in citrus and hop plants were investigated with agent-specific primers. Respectively, were determined in the isolates examined by RT-PCR method. *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (CVd II), CCaVd: Cachexia and HSVd: Non-Cachexia, *Citrus dwarfing viroid* (CDVd; CVd III), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd), *Citrus viroid V* (CVd-V), *Citrus viroid VI* (CVd-VI), *Hop latent viroid* (HLVd) and *Hop stunt viroid* (HSVd) were found on examined isolates. It was determined by RT-PCR analysis that the samples examined in terms of citrus viroids were 70% contaminated in Adana, 78% in Mersin, 77.5% in Hatay, and 80% in Osmaniye. In hop plants, 66% of 214 samples collected from Pazaryeri district of Bilecik were infected with HLVd and 23.8% with HSVd. Molecularly identified and sequenced isolates showed 96-99% similarity with the NCBI registered isolates. Sequences identified in this study were registered in the NCBI gene bank. HLVd was reported as the first record for our country.

Key Words: Hops, Citrus, Viroid diseases, HSVd, RT-PCR

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Rutaceae familyası, Aurantioideae alt familyasına giren turunçgiller (*Citrus* sp.); altıntop, limon, lime, mandarin ve portakal gibi yetiştiriciliği yaygın ve ekonomik değeri olan türlerin dışında şadok, ağaç kavunu, bergamot gibi farklı şekillerde tüketimi yapılan, süs bitkisi ya da ıslahta gen kaynağı olarak kullanılan birçok türü de içerisinde barındıran geniş bir bitki grubundan oluşmaktadır. Anavatanı Çin ve Hindistan olan turunçgiller ılıman iklime sahip olan bölgelerde yetişmektedir. Ülkemizde ise, subtropik iklime sahip olan Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nde yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır. Ayrıca, az miktarda da olsa Marmara ve Doğu Karadeniz Bölgeleri'nde de turunçgil üretimi yapılmaktadır. Turunçgiller dünyada üzerinde yetiştiriciliği yapılan meyve grupları içerisinde 158 milyon ton ile en çok üretimi ve tüketimi olan meyve grubudur (FAO, 2019).

Ülkemizde tarımı yapılan sanayi ürünlerinden birisi olan Şerbetçi otu bitkisi, Isırgan otugiller (Urticales) takımı, kendirgiller (Cannabaceae) familyası, *Humulus* cinsinden, *Humulus lupulus* L. türüne giren, odunsu olmayan, tek yıllık veya çok yıllık bir bitkidir (Conway ve Snyder, 2008). Bitki ilk olarak "*Lupus salictarius*" olarak M.Ö. "Naturalis Historia" kitabında tanımlanmıştır (Van Cleemput ve ark., 2009). Sarılıcı ve tırmanıcı yapıya sahip olan şerbetçi otu bitkisi, her yıl dip sürgünlerinden çıkan ve 8-10 m'ye kadar ulaşabilen yeni sürgünlerin tellere sardırılması ile yetiştirilmektedir. Bitkinin toprak altı aksamının ekonomik ömrü 15-20 yıl olarak bilinmektedir. Türkiye'de Güney Marmara Bölgesi'nde yer alan Bilecik ili Pazaryeri ilçesinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Şerbetçi otunun, sanayide kullanılan kısmı kurutulmuş dişi çiçek salkımlarıdır.

Her iki ürün grubu içerisinde de üretim alanlarında biyotik stres faktörleri içerisinde yer alan hastalık etmenlerinden olan virüsler ve virüs benzeri hastalıklar diğer ürünlerde olduğu gibi, üretimi yapılan ürünün kalite ve kantitesine değişen oranlarda etki etmektedirler. Viral hastalık etmenleri; üretim materyali (tohum,

fide, fidan vb.), aşılama gibi farklı kültürel işlemler, polenler, böcek vektörler ve hastalıklı bitki materyali ile taşınma ve yayılmada oldukça önemlidir. Ayrıca bu hastalık etmelerine karşı kullanılabilen herhangi bir kimyasal mücadele yöntemi olmaması nedeniyle, diğer hastalık ve zararlılara göre yetiştiricilikte önemleri bir kat daha artmaktadır.

Dünya’da turunçgil yetiştirilen alanlarda virüs ve virüs benzeri hastalıklar ekonomik anlamda turunçgil tarımını sınırlayıcı en önemli faktörler içerisinde yer almaktadırlar. Ekonomik olarak zarar oluşturan, 30’dan fazla hastalığın viral etmenler tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Bove, 1995). Türkiye’de yapılan çalışmalarda belirtilen bu hastalıklardan 16 tanesinin ülkemizde olduğu Çınar ve ark. (1993) tarafından bildirilmiştir. Bunların içerisinde turunçgil yetiştiriciliğinde; *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus cachexia viroid* (CCaVd: Turunçgil gözenekleşme hastalığı), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd: CVd-IV) hastalık etmenleri oluşturdukları ağır belirtiler nedeniyle önemli bir yere sahiptirler. CEVd etmeni turunçgillerde genel bodurluk oluştururken üçyapraklı ve melezleri üzerine aşılansmış çeşitlerde aşı noktasının altında kabukta çatlama ve aşılansan bitkilerde genel bodurluk oluştururken, CCaVd özellikle mandarin ve mandarin hibritlerinde bitkilerde genel bodurluk, sararma, aşı birleşme noktasından başlayarak, primer dallara kadar ilerleyen floem renklenmesi, gövdede odun dokusunda oluşan çukurluklara karşı kabuk dokusunda çukurluklara karşı gelecek kabuğun kambiyal yüzeyinde zamklı iğne gibi çıkıntı oluşumları (Calavan ve ark., 1961) ve ilerleyen dönemlerde kambiyal aktivitenin olumsuz etkilenmesi nedeniyle bitkilerde uç sürgünlerde geriye doğru kuruma ve ölümler şeklinde kendini gösteren belirtiler oluşmaktadır (Semancik ve ark., 1988; Belabess ve ark., 2021). CBCVd, ağaç kavununda (*C. medica* L.) ilk olarak belirlenen ve turunçgillerde belirlenen dördüncü viroid türü olması nedeni ile CVd-IV olarak adlandırılan etmen üçyapraklı anacında oluşturduğu kabuk çatlaması belirtileri nedeniyle *Citrus bark cracking viroid* olarak adlandırılmıştır. Tek enfeksiyonlarda üçyapraklı anacı ve melezlerinde kabuk çatlaması belirtisi oluştururken, diğer turunçgil

viroidleri ile karışık enfeksiyon olması durumunda exocortis ve cachexia gibi önemli hastalıklara neden olmakta ve semptom yoğunluğunu arttırabilmektedir (Verniere ve ark., 2004; 2006)

Planlanan çalışma kapsamında, turunçgil üretiminin önemli bir kısmının yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil üretimi yapılan alanlarda turunçgillerde günümüze kadar belirlenmiş olan; *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), Hop stunt viroid (CVd II) (CCaVd: Cachexia ve HSVd: Non-Cachexia), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd; CVd III), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd: CVd-IV), *Citrus viroid V* (CVd-V) ve *Citrus viroid VI* (CVd-VI) etmenleri ile ülkemizde sadece Bilecik ili Pazaryeri ilçesi Şerbetçi otu üretim alanlarında yapılan survey ile toplanan şerbetçi otu bitki örneklerinde *Hop latent viroid* (HLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd) ve *Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd) etmenlerinin varlığının biyolojik ve moleküler olarak belirlenmesi, tanılanması ve moleküler karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Böylece, viroid hastalık etmenlerinin survey alanlarından toplanan örneklerden elde edilen veriler ile yaygınlığı ve hastalık şiddeti ortaya konulmaya çalışılmıştır. Böylece turunçgil türleri arasında hangi viroid etmenlerinin tekli mi çoklu mu enfeksiyon oluşturduğu ve semptom şiddetinde bunun etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Turunçgiller için viroidlerin varlığı etmene ait spesifik primerler ve RT-PCR yöntemleri ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil üretim alanlarında yapılan survey çalışmaları sonucunda; Adana (%70), Hatay (%77.5), Mersin (%78 oranında), Osmaniye (%80 oranında) ikili ve çoklu enfeksiyonlar şeklinde turunçgil viroidlerinin varlığı belirlenmiştir. Turunçgil türleri bazında viroid enfeksiyon oranına bakıldığında; Portakalda % 77, Mandarinde % 70, Limonda %77.5, Altıntopta %69.2 oranında viroid etmenlerinin karışık enfeksiyon halinde bulunduğu belirlenmiştir. Belirlenen karışık enfeksiyonlar birlikte değerlendirildiğinde; iki, üç ve/veya dört etmenin aynı anda bulunduğu bitkilerde özellikle portakal, mandarin ve limonda enfeksiyon şiddetinin daha yüksek ve hatta yıkıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma

sonunda, HSVd ve CEVd etmeninin bölgemizde oldukça yaygın olarak hemen hemen tüm turunçgillerde bulunduğu belirlenmiştir.

HSVd'in ilk belirlendiği bitki grubu olan şerbetçi otu bitkisinde ise Bilecik ili Pazaryeri ilçesinden 214 adet örnek toplanmış ve bu örneklerin %61.21 oranında HLVD, %23.83 oranında HSVd etmeni ile enfekteli olduğu ve %18.2 oranında karışık enfeksiyon oranı gözlenmiştir.

Sonuç olarak her iki bitki grubunda da hangi viroidlerin yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Her iki bitki grubunda da ortak olarak varlığı belirlenen HSVd'in hem morfolojik hem de moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışma sonucunda; karantina ve sertifikasyonda analizlerinde önemli olan CCaVd ve CEVd etmenleri ile beraber incelenen toplamda 10 etmen için moleküler karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, saflaştırılmış izolatların canlı bitki üzerinde muhafazası sağlanarak gen bankası oluşturulmuştur. Ayrıca bu izolatlar için gen klonlaması işlemi yapılarak plazmit üzerinde saf izolat halinde -20°C ve -80°C'de muhafaza edilmeleri sağlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkılarıyla bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Nuket ÖNELGE'ye teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri Sn. Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye, hem Tez İzleme Komitesi üyelerinden olan, hem de Survey çalışmalarımız sırasında yardımını esirgemeyen Sn. Dr. Öğretim üyesi Orhan BOZAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Gen klonlaması çalışmaları aşamasında bize laboratuvarını açıp desteğini esirgemeyen hocam Sn. Prof. Dr. Bayram ÇEVİK'e ve Yüksek lisans öğrencisi Nadire SAKALLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yürütülmesine her türlü destek sağlayan T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, çalışmamı yürüttüğüm aşamalarda Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün değerli yönetici ve Biyoteknoloji laboratuvarı ve Araştırma ve Uygulama Serasında çalışan işçilerimize ve şöförlerimize, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına ve değerli Hocalarıma teşekkür ederim.

Bilecik ili Pazaryeri ilçesi Şerbetçi otu üretim alanlarında gerçekleştirilen surveylerde desteklerini esirgemeyen Pazaryeri İlçe Tarım Müdürü Necmettin YOLDAŞ'a ve Ziraat Mühendisi İsmail TURHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora yazım ve değerlendirme aşamasında tecrübelerinden yararlanıp, desteklerini gördüğüm Sn. Doç. Dr. Bekir Bülent ARPACI ve Sn. Doç. Dr. Refik BOZBUĞA'ya, yine Doktora tez yazım çalışmaları kısmında desteğini esirgemeyen Büşra FİDANCI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında bana maddi manevi destek olan, beni dinleyen, yönlendiren ve kendi çalışma azmi ve isteğini bana yükleyen biricik annem Teslime GÖK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen eşim Mahmut GÜLER'e, yoğun çalışmam süresince beni sabırla bekleyen, oğullarım Mustafa GÜLER ve Mehmet Hakan GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Pakize GÖK GÜLER

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Dünyada Turunçgiller ve Şerbetçi otunda Bulunan Viroidler Konusunda Yapılan Çalışmalar.....	27
2.2. Ülkemizde Turunçgiller ve Şerbetçi otunda Bulunan Viroidler Konusunda Yapılan Çalışmalar.....	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal.....	35
3.1.2. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyaller ve kontrol gen bankasının oluşturulması.....	35
3.1.3. Moleküler tanılama yöntemlerinde kullanılan materyaller.....	36
3.1.3.1. Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan materyaller.....	36
3.1.3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT- PCR) çalışmalarında kullanılan materyaller.....	37
3.1.3.3. Elektroforez çalışmasında kullanılan materyaller	39
3.2. Metod	39

3.2.1. Çalışmada kullanılacak olan bitkisel materyalin seçilmesi, toplanması ve muhafazası.....	39
3.2.2. Bitkisel materyallerin alımı.....	43
3.2.3. Biyolojik indeksleme yöntemini ve gen bankasının oluşturulması.....	44
3.2.4. Moleküler Çalışmalarla İlgili Yöntemler.....	45
3.2.4.1. Total Nükleik asit ve Total RNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler	46
3.2.4.1.(1). Bitki dokularından Total Nükleik asit ekstraksiyonu.....	46
3.2.4.1.(2). Total nükleik asit izolasyon çalışmalarında CTAB Temelli Total Nükleik Asit Ekstaksiyonu.....	46
3.2.4.1.(3). Bitki RNA Purifikasyon Ana Protokolü;	47
3.2.4.2. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Testi.....	48
3.2.4.2.(1). Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	48
3.2.4.2.(2). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	49
3.2.4.2.(3). Tek Aşamalı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	49
3.2.4.2.(4). Agaroz Jel Elektrophorez Çalışmaları.....	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	59
4.1. Turunçgil Arazi Alanları ile ilgili Gözlemler ve Örnek alımları	59
4.2. Şerbetçi Otu Yetiştiricilik Alanlarında Arazi Gözlemleri.....	65
4.3. RT-PCR Çalışmaları ve Elde Edilen Bulgular.....	68
4.3.1. Turunçgil Viroidlerinin RT-PCR Çalışmaları İle Belirlenmesi	68
4.3.2. Şerbetçi Otu Viroidlerinin RT-PCR Çalışmaları ile Belirlenmesi	76
4.4. Biyolojik indeksleme ile ilgili Bulgular ve Tartışma.....	78

4.4.1. Turunçgil ve şerbetçi otu viroidlerinin indikatör bitkilere aktarılması.....	78
4.5. Viroidlerin Turunç Üzerine Aktarılması ve Gen bankasının oluşturulması.....	90
4.6. Gen Klonlaması Çalışmaları.....	91
4.7. Filogenetik Analizler	97
4.8. Viroidlerin İkincil Yapılarının oluşturulması	122
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	133
KAYNAKLAR	141
ÖZGEÇMİŞ	161



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Bitki patojeni viroidlerin sınıflandırılması	8
Çizelge 2.2. Turunçgil viroidlerinin sınıflandırılması	10
Çizelge 3.1. RT aşamasında kullanılan primer	37
Çizelge 3.2. RT-PCR ve PCR aşamalarında kullanılan primerler	38
Çizelge 3.3. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Kit thermal cyclers programı	50
Çizelge 4.1. Turunçgil sörvey alanları ve alınan örnek sayıları	62
Çizelge 4.2. Şerbetçi Otu Survey Alanı ve Toplanan Örnekler	66
Çizelge 4.3. RT-PCR çalışması ile Turunçgil Viroidlerinin Belirlenmesi	70
Çizelge 4.4. RT-PCR yöntemi ile şerbetçi otu'nda bulunan viroidlerin belirlenmesi	76



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Turunçgil ve şerbetçi otu izolatlarının toplandığı illere ait survey alanlarının Türkiye haritası üzerindeki yerleri.....	40
Şekil 3.2. Turunçgil türleri için Adana, Hatay, Mersin, Osmaniye illerinden güdümlü survey çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlar	40
Şekil 3.3. Şerbetçiotu için Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarından güdümlü survey çalışmalarının gerçekleştirildiği noktalar	41
Şekil 3.4. Turunçgillerde Adana, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinden alınan örneklerde görülen genel simptomlar.....	42
Şekil 3.5. Turunçgillerde Adana, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinden alınan örneklerde limon ve mandarinlerde gözlenen simptomlar	42
Şekil 3.6. Şerbetçi otu bitkilerinde Bilecik ili Pazaryeri ilçesinden alınan örneklerde gözlenen simptomlar	42
Şekil 4.1. CCaVd'in mandarin bitkilerinin gövdelerinde oluşturduğu simptomlar.....	60
Şekil 4.2. CEVd'in 8 yaş ve üzeri turunçgil ağaçlarının anaçları üzerinde oluşturduğu simptomlar	61
Şekil 4.3. Kütdiken ve Meyer limon çeşitlerinde gövde ve sürgünde kabuk çatlama simptomları	64
Şekil 4.4. Şerbetçi otu bitkisinde görülen bodurlaşma, gövde yarılması ve yaprak küçülmesi simptomları	67
Şekil 4.5. Şerbetçi otu bitkisinde görülen yoğun yaprak simptomları.....	67
Şekil 4.6. Mersin ili turunçgil örneklerinde CEVd F/R primer çifti ile 371 nt büyüklüğünde çoğaltılan bölgenin agaroz jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.7. CBLVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 327 nt seviyesinde çoğaltılan bölgenin agaroz jel görüntüsü.....	70

Şekil 4.8. CCaVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 300 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri	71
Şekil 4.9. HSVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 220 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri	72
Şekil 4.10. CDVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 297 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri	73
Şekil 4.11. CBCVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 284 nt seviyesindeki oluşturduğu bant görüntüleri	74
Şekil 4.12. CVd-V'in F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 300 nt seviyesindeki oluşturduğu bant görüntüleri	74
Şekil 4.13. Bilecik ili Şerbetçi otu örneklerinde HSVd F/R primer çiftleri ile 200 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri	77
Şekil 4.14. Bilecik ili Şerbetçi otu örneklerinde HLVd F/R primer çiftleri ile 260 ve 360 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri.....	77
Şekil 4.15. CEVd'i ve ırklarını ayırt etmek için <i>Gynura aurantiaca</i> indikatör bitkisine purifiye edilmiş CEVd viroid RNA'larının bulaştırma işleminin aşamaları	79
Şekil 4.16. <i>Gynura aurantiaca</i> bitkilerinde CEVd izolatlarının bulaştırma işleminden 2 ay sonra gözlenen belirtiler	80
Şekil 4.17. <i>Gynura aurantiaca</i> bitkilerinde CEVd izolatlarının oluşturdukları bitkisel gelişim farklılıkları	80
Şekil 4.18. Hıyar bitkisine turunçgil HSVd'inin farklı varyantlarının uygulanmasından sonra gözlenen belirtiler	82
Şekil 4.19. Hıyar bitkisi üzerine uygulanan turunçgil HSVd izolatlarının oluşturduğu şiddetli bodurluk belirtileri	83
Şekil 4.20. Turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkisi üzerinde oluşturduğu belirtiler.....	84
Şekil 4.21. Turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkilerinde oluşturduğu yaprak epinastisi ve yaprak düşüklüğü belirtisi	85

Şekil 4.22. Turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkilerinde yaprağın alt kısmında oluşturduğu hafif ve yoğun orta damar nekrozu	86
Şekil 4.23. CBLVd'in Etrog citron bitkilerinde oluşturduğu yaprağın tek noktadan bükülmesi simptomsu.....	87
Şekil 4.24. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd ve HLVd izolatlarının lif kabağı bitkilerinde oluşturdukları simptomlar	88
Şekil 4.25. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd izolatlarının hıyar bitkilerinde oluşturdukları bodurluk simptomsu	88
Şekil 4.26. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd izolatlarının hıyar bitkilerinde oluşturduğu simptomlar	89
Şekil 4.27. <i>Gynura aurantiaca</i> bitkilerinden alınan örneklerde CEVd için yapılan RT-PCR sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	89
Şekil 4.28. Hıyar ve Lif kabağı indikatör bitkilerinden alınan örneklerde HSVd F/R primer çifti ile çoğaltılmış gen bölgesinin 220 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri	90
Şekil 4.29. Etrog citron ve turunç fidanlarına aşı ile inokulasyon yöntemi ile stok bitki üzerinde gen bankası oluşturulması	90
Şekil 4.30. PCR ürünlerinin Bio Basic Spin Column PCR Purifikasyon Kit ile saflaştırılması ve gen klonlama çalışmaları için seçim aşamaları	91
Şekil 4.31. pGEM-T easy plazmidi ve PCR ürünü ile bir ligasyon karışımının hazırlanması ve PCR ürünü ile plazmidin birleştirilmesi aşaması	92
Şekil 4.32. 25µl Bakteri hücrelerine (Competent cell) 5 µl ligasyon karışımı eklenerek gerçekleştirilen transformasyon işleminin aşamaları.....	93
Şekil 4.33. Etikeplenip hazırlanmış olan ortam ve bakteri suşlarının 100 µg/ml amphisilinli LB agarlı ortama ekimi ve inkübasyon aşaması.....	93
Şekil 4.34. İnkübasyondan çıkan petrilere koloni gelişiminin gözlenmesi ve beyaz kolonilerin seçilip işaretlenmesi ve seçilen tek kolonilerden ekim aşaması	94

Şekil 4.35. Seçilen beyaz kolonilere Koloni PCR işlemi ile viroid genomunun aktarmasının belirlenme aşamaları.....	94
Şekil 4.36. Gen aktarılmış beyaz kolonilerden seçim, çoğaltma ve stok olarak muhafazaya alma aşamaları	95
Şekil 4.37. Viroid geni aktarılmış plazmitlere ait ürünlerin pozitif kontrol olarak gliserol stokta -20 ve -80 °C’de muhafaza edilen tüplerinin görüntüsü.....	96
Şekil 4.38. Plazmit saflaştırma kiti (BioBasic-Kanada) ile plazmit saflaştırma işleminin aşamaları.....	96
Şekil 4.39. Plazmit izolasyonu ile plazmit saflaştırması yapılan örneklerde EcoRI enzimi ile kesim ve görüntüleme aşamaları	97
Şekil 4.40. CEVd etmeninin 5 adet turuncgil izolatının dünyanın farklı bölgelerinden seçilen izolatlar ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı	101
Şekil 4.41. CBLVd etmeninin 3 adet izolatının dünyanın farklı bölgelerinden seçilen izolatlar ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı.....	103
Şekil 4.42. HSVd (CVd IIa) etmeninin 9 adet izolatının dünyanın farklı bölgelerinden seçilen izolatlar ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı	105
Şekil 4.43. CVd IIb/c etmeninin 6 adet izolatının dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilmiş diğer CVdIIb ve IIc’nin seçilen izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı.....	107
Şekil 4.44. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CVd IIa izolatının ve CVd IIb/c izolatlarının dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilmiş diğer CVd IIa, CVdIIb ve IIc izolatları ile Mega11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı	109

Şekil 4.45. Bu çalışma kapsamında Şerbetçi otu ve Turunçgillerde belirlenen HSVd izolatları ile dünyada ve Türkiye’de farklı bitki gruplarında tespit edilmiş olan HSVd izolatlarından seçilenler ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı.....	111
Şekil 4.46. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CDVd (CVd III) izolatlarının dünyada tespit edilmiş ve NCBI veri bankasında kayıtlı seçilen CVd III izolatlarından MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı.....	113
Şekil 4.47. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CBCVd (CVd IV) izolatının (MZ995261) dünyada tespit edilmiş seçilen CVd IV izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan oluşturulan evrimsel soyağacı.....	115
Şekil 4.48. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş CVd V izolatının dünyada tespit edilmiş seçilen CVd V izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı.....	117
Şekil 4.49. Bu çalışma kapsamında Şerbetçi otu bitkisinden elde edilmiş HSVd izolatının dünyada tespit edilmiş seçilen şerbetçi otu HSVd izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan oluşturulan evrimsel soyağacı.....	119
Şekil 4.50. Bu çalışma kapsamında Şerbetçi otu bitkisinden elde edilmiş HLVD izolatlarının dünyada tespit edilmiş seçilen şerbetçi otu HLVD izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan oluşturulan evrimsel soyağacı.....	121
Şekil 4.51. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat ile bu çalışma kapsamında analiz edilen CVd-IIa'nın 6 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin konumları..	123
Şekil 4.52. CVd IIa için referans izolatla çalışma kapsamında elde edilen izolatların birlikte görülen çubuk şeklinde ikincil yapıları	125

Şekil 4.53. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat ile çalışma kapsamında elde edilen CVd-IIb/IIc'nin 6 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin konumları	127
Şekil 4.54. CVd IIB Referans izolatu ile çalışma kapsamında elde edilen 6 moleküler varyanta ait izolatlardan elde edilen çubuk şeklinde ikincil yapılar	128
Şekil 4.55. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat ile bu çalışma kapsamında analiz edilen CEVd'in 5 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin konumları ..	131
Şekil 4.56. CEVd için seçilen Referans izolat ve çalışma kapsamında elde edilen 4 moleküler varyanta ait izolatlardan elde edilen çubuk şeklinde ikincil yapılar	132

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
AFCVd	: <i>Apple fruit crinkle viroid</i>
bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Base pair
Cac	: Cachexia
CBCVd	: <i>Citrus bark cracking viroid</i>
CBLVd	: <i>Citrus bent leaf viroid</i>
CcacVd	: <i>Citrus cachexia viroid</i>
CDVd	: <i>Citrus dwarfing viroid</i>
CEVd	: <i>Citrus exocortis viroid</i>
C	: Citozine
°C	: Derece celcius, Santigrad Derece
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid
cm	: Santimetre
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
CVd I	: <i>Citrus viroid I</i>
CVd II	: <i>Citrus viroid II</i>
CVd IIa	: <i>Citrus viroid II a</i>
CVd IIb/c	: <i>Citrus viroid II b/c</i>
CVd III	: <i>Citrus viroid III</i>
CVd IV	: <i>Citrus viroid IV</i>
CVd V	: <i>Citrus viroid V</i>
CVd VI	: <i>Citrus viroid VI</i>
CVd OS	: Citrus viroid Original Sample
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi

da	: Dekar
dak	: Dakika
DEPC	: Diethyl pyrocarbonate
DNA	: Deoksiribonükleik asid
dNTP	: Deoksinükleotidtrifosfat
ds	: Double stranded (Çift iplikli)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO	: Food and Agriculture Organisation
G	: Guanin
HLVd	: <i>Hop latent viroid</i>
HSVd	: <i>Hop stunt viroid</i>
H ₂ O	: Su
kb	: Kilo base
KCl	: Potasyum klorür
L	: Litre
M	: Molar
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg/ml	: miligram/mililitre
mg	: miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
Non-cac	: Non-cachexia
N	: Normal
NA	: Nükleik Asit
NaCl	: Sodium Klorür
NaOH	: Sodium hydroxide

NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: nanogram
nm	: nanometre (10^{-9} m)
nt	: nükleotid
PCR	: Polimerase Chain Reaction
pH	: power of Hydrogen
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: messenger Ribonükleik asit
RNA sin	: Ribonükleaz inhibitörü
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT	: Reverse Transkriptaz
RT-PCR	: Reverse Transkriptaz- Polimeraz Chain Reaction
sn	: Saniye
ss	: Single Stranded (Tek iplikli)
sPAGE	: Sequential Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAE	: Tris Acetic Acid EDTA
T	: Timin
Taq	: Termo stabil polimeraz enzimi
TE	: Tris EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U	: Ünite
USA	: United State of America
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
WB	: Washing buffer



1. GİRİŞ

Ana vatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan gibi Asya ülkeleri olan turunçgillerin, günümüzde subtropik iklime sahip olan hemen hemen tüm ülkelerde yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Dünyada turunçgil üretimi 35° Kuzey ve Güney paraleller arasındaki bölgelerde yapılmaktadır. Kuzey Yarıküre’de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkeleri, Güney Yarıküre’de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya’da ekonomik olarak üretilmektedir (Karahocagil, 2003; Şimşek, 2009). Rutaceae familyası, Aurantioideae alt familyasına giren turunçgiller (*Citrus* L.); altıntop (*Citrus paradisi*), limon (*Citrus limon*), lime (*Citrus latifolia*), mandarin (*Citrus reticulata*) ve portakal (*Citrus sinensis*) gibi yetiştiriciliği yaygın ve ekonomik değeri olan türlerin dışında şadok (*Citrus maxima*), ağaç kavunu (*Citrus medica*), bergamot (*Citrus bergamia*) gibi farklı şekillerde tüketimi sözkonusu olan, yada süs bitkisi yada ıslahta gen kaynağı olarak kullanılan diğer birçok türü de içerisinde bulunduran geniş bir bitki grubudur. Ilıman iklime ihtiyaç duyan turunçgil çeşitlerinin, yurdumuzda subtropik iklime en fazla sahip olan Akdeniz ve Ege Bölgeleri’nde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunun yanı sıra az miktarda da olsa Marmara ve Doğu Karadeniz Bölgeleri’nde de üretimi yapılmaktadır. Türkiye yaklaşık 51 milyon ton yaş meyve ve sebze üretim miktarı ile önemli bir üretici ülke konumunda yer almaktadır (TÜİK, 2018). Tarım ürünleri ihracatı içerisinde ise %12 pay alan yaş meyve sebze ürünlerinin yaklaşık %5’ini turunçgiller oluşturmaktadır. Yaş meyve sebze ihracatı içerisinde ise turunçgillerin payı yaklaşık %44 düzeyindedir (TİM, 2017).

Türkiye’de turunçgil üretimi son 10 yılda %44’lük artışla 2020 yılında 5.3 milyon ton üretime ulaşmıştır (TÜİK, 2021). Turunçgil üretim alanının yaklaşık olarak % 82,7’si Akdeniz bölgesinde, %16,38’i Ege bölgesinde yer almakta olup, üretimin yaklaşık % 84,22’si Akdeniz Bölgesinde, % 14,93’ü ise Ege bölgesinde gerçekleştirilmektedir. FAO istatistiklerine bakıldığında ise 2020 yılında dünyada

yaklaşık 9,7 milyon hektar alanda 140 milyon ton turunçgil üretiminin yapıldığı ve ülkemizin de yaptığı üretim miktarı ile 8. sırada yer almaktadır (FAO, 2020)

Türkiye'nin turunçgil üretimi son on yılda %44'lük artışla yaklaşık 5,3 milyon ton seviyesine ulaşmıştır. 2007 yılında toplam turunçgil üretim alanı 111 bin hektar iken, %23 artışla 2020 yılında 157 bin hektar alana çıkmıştır (TÜİK, 2020; FAO, 2020). Son 10 yıllık dönemdeki artışın nedeni üretim alanlarının artışının yanı sıra ağaç başına verim artışın yanı sıra, üretim bölgelerinde modern yetiştiriciliğin yaygınlaşması ve tercih edilen tür ve çeşitlerin nispeten yüksek verime sahip olması da gelmektedir. Son yıllarda turunçgil üretiminde mandarin ve limon türlerine ağırlık verilmiştir. Ülkemizde turunçgil ihracatının artması için, turunçgillerde yaygın olan Akdeniz meyve sineği, unlu bit gibi zararlıların yanı sıra *Citrus yellow vein clearing virüs* gibi viral etmenlerle etkin bir şekilde (kimyasal ve kültürel önlemler) mücadele edilmesi ve kimyasal mücadelede kalıntı sorununun önüne geçilmesi için üreticilerin eğitime ağırlık verilmesi dış pazara gönderilen ürünlerin gümrük kapılarından geri dönmemesi ve ülkemizin prestiji açısından önem arz etmektedir.

Ülkemizde tarımı yapılan çok çeşitli sanayi ürünlerinden birisi olan Şerbetçi otu bitkisi Isırgan otugiller (Urticales) takımı, kendirgiller (Cannabaceae) familyası, Humulus cinsinden, *Humulus lupulus* L. türüne giren çok yıllık bir bitkidir (Systma ve ark, 2002). Maya otu, Bira otu, Ömer otu, Bira çiçeği, Sarısarmaşık gibi farklı isimleri de bulunmaktadır (Baytop, 1984). Şerbetçi otunun bilinen üç türü mevcut olup, bu türlerden bira otu olarak bilinen *Humulus lupulus* türünün yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Japon şerbetçi otu olarak bilinen *Humulus japonicus* ve Çin şerbetçi otu olarak adlandırılan *Humulus yunnanensis* ise yöresel olup sadece bulundukları ülkelerde yetiştirilmektedirler. Sarılıcı ve tırmanıcı yapıya sahip olan bitki (Koday, 2000), her yıl dip sürgünlerinden çıkan ve 8-10 m'ye kadar ulaşabilen yeni sürgünlerin tellere sardırılması ile yetiştirilir. Bitkinin toprak altı aksamının 100 yıla kadar yaşadığı bildirilse ekonomik ömrü

15-20 yıldır. Cannabaceae familyasına giren türler genellikle dioik çiçek yapısına sahiptir ve sadece dişi çiçek veren bitkiler üretimde kullanılmaktadır.

Dünya’da kültürü yapılan şerbetçi otunun yetiştiriciliği kuzey ve güney yarımkürede 30° ve 50° enlemleri arasında yapılmaktadır. Yabani şerbetçiotları Asya ve Kuzey Avrupa’da ılıman iklimin hüküm sürdüğü ormanlarda ve Türkiye’de de Kuzeybatı Anadolu’da görülebilmektedir. Bolu, Zonguldak, Adapazarı, Bilecik, Edirne, Kırklareli ve İstanbul’da şerbetçi otu bitkisinin yabanilerine rastlanmaktadır (Başkaya, 2017).

Slavların eski devirlerden beri Borga denilen bir içkinin yapımında şerbetçi otunu kullandıkları bilinmekle beraber, batıda o zamanlar bira üretiminin şerbetçi otu kullanılmadan yapıldığı bildirilmiştir (Bağcı, 2005). 16.yüzyıldan beri Avrupa’da şerbetçi otunun verdiği genç sürgünler sebze olarak kullanılırken, Almanya, İsviçre ve Macaristan gibi ülkelerde çiçek kozaları bira ve ekmek mayası olarak ta kullanılmıştır (İncekara, 1964). Türkiye’de Doğu Karadeniz Bölgesi’nde yetişen yabani şerbetçiotlarından elde edilen ekstrakt, bu bölgede aromatik ve dezenfektan olarak ekşi maya olarak hamur yapımında kullanılmaktadır. Türkiye’de şerbetçi otu isminin nereden geldiği bilinmemekle birlikte, bu ismin bitkinin eskiden beri bazı şerbetlerin yapımlarında kullanılmış olmasından ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir (Bağcı, 2005).

Dünya şerbetçi otu üretiminde ABD, Etiyopya, Almanya, Çin, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Slovenya, Arnavutluk, Kore gibi ülkeler ön sırada bulunmaktadır (FAO, 2017). Türkiye’de FAO kayıtlarına girecek miktarda olmayan, TÜİK 2018 yılı verilerine göre 3300 da alanda 1785 ton şerbetçi otu çiçek kozası üretimi yapıldığı bildirilmiştir.

Türkiye’de ise ilk şerbetçi otu denemeleri Atatürk Orman Çiftliği’ndeki bira fabrikasının kurulmasından sonra başlamıştır. İlk denemeler başarısız olmuş II. Dünya Savaşından sonra tekrar ithalat yapılmıştır (Bağcı, 2005). 1965 yılından itibaren Türkiye’de şerbetçi otu üretimi sadece Bilecik ilinde gerçekleştirildiğinden Bilecik ilinin karakteristik bitkisi olmuştur. Bilecik’te şerbetçi otu tarımı 800-850

m. yükseklikteki Pazaryeri Havzası ve Ahı Dağı çevresindeki bazı yerleşim birimleri sınırları içerisinde yapılmakta ve bu üretimin tamamı bira sektöründe kullanılmaktadır.

Biyotik faktörler içinde hastalık etmenlerinden virüsler diğer ürünlerde olduğu gibi, üretimin kalite ve kantitesine değişen oranlarda etki etmektedir. Viral hastalıkların üretim materyali, aşılama, farklı kültürel işlemler, polen, böcek vektörler ve hastalıklı materyal ile taşınma ve yayılmalarının kolay olması, ayrıca bu hastalıklara karşı hiçbir kimyasal mücadele yönteminin kullanılamaması nedeniyle, diğer hastalık ve zararlılara göre yetiştiricilikte önemleri bir kat daha artmaktadır.

Ülkemizin iç tüketimi ve dış ticareti açısından önemli bir tarımsal ürünü konumunda olan turunçgillerde, bitkilerin gelişmesini sınırlayan ve ürün kaybına neden olan çok sayıda hastalık etmeni bulunmaktadır. Bunlar arasında, ağaçların potansiyel gücünü ve verimliliğini azaltan ve bazı durumlarda ağacın yok olmasına neden olan 30'dan fazla sayıda viroid, virüs ve virüs benzeri hastalıklar ilk sırada yer almaktadır. Turunçgil teknolojisi gelişmemiş ülkelerde viroid, virüs ve virüs benzeri hastalıkların ağaçların verimini %10-50 arasında değişen oranlarda azaltabildiği belirtilmektedir (Futch ve Bransky, 2004). Turunçgillerde enfeksiyon oluşturan ve tanımlamaları yapılan ve dört cins içinde yer alan 7 adet viroidin bulunduğu açıklanmıştır (Di Serio ve ark., 2014): *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Citrus viroid V* (CVd-V) ve *Citrus viroid VI* (CVd-VI). Uluslararası bitki transferleri ve tüm turunçgil viroidlerinin aşı gözü ve mekanik yollarla kolayca taşınması bulaşık üretim materyallerinin dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelere yayılmasında etken olmuştur (Duran Vila ve Semancik, 2003; Eiras ve ark., 2013; Önelge, 2017).

Ülkemizde turunçgil viroidlerinin varlığı ilk kez yabancı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. FAO uzmanı olarak ABD'den gelen Norman 1963

yılında ülkemiz turunçgillerinde farklı virüs hastalıklarının yanı sıra exocortis ve cachexia hastalıklarının varlığını da bildirmiştir. Turunçgil anacı olarak üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* (L.)Raf.) çeşidinin kullanıldığı Ege Bölgesi'nde 1964-1965 yıllarında turunçgil ağaçlarının %23'ünün cachexia, %10'nunun exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir. Antalya Turunçgiller Araştırma Enstitüsünde turunçgil virüs ve benzeri hastalıkları araştırmak amacıyla yürütülen 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 mandarin ağaçlarında yürütülen diğer bir çalışmada mandarin ağaçlarının %37 oranında cachexia hastalığı, portakal ağaçlarından yapılan indeksleme çalışmasında ise %83.3'nün exocortis hastalığı ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Güllü, 1989). Moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda ülkemizde farklı turunçgil çeşitlerinde CEVd ve CCaVd'nin yanı sıra CBLVd, CDVd, CBCVd, CVd-V'in varlığı ardışık poliakrilamid jel elektroforez ve RT-PCR yöntemleriyle saptanmış ve nükleotid dizilimleri belirlenmiştir (Önelge,1994; Önelge ve ark., 1996; Önelge, 2007; Önelge ve Yurtmen, 2012). CVd-VI'nın varlığı ve yaygınlığı ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamızda yer alan ikinci bitki grubu olan şerbetçi otu bitkisinde günümüze kadar 4 adet farklı viroidin bulunduğu bildirilmiştir. Bunlar; *Hop latent viroid* (HLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Apple Fruit Crinckle Viroid* (AFCVd) olarak bildirilmiştir (Flores ve ark., 2000). *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd)'in şerbetçi otu bitkisinde varlığı Yeni nesil dizileme ve Deep-sequencing çalışmalarının son zamanlarda yeni etmenlerin etkin bir şekilde belirlenmesi için kullanılması ile (Jakse ve ark., 2015) belirlenmiştir. Yamamoto ve ark.'nın, 1973 yılında Japonya'da *Hop stunt disease* olarak adlandırdığı hastalık etmeninin aslında bir viroid olduğu Sasaki ve Shikata tarafından belirlenmiş ve 1977 yılında *Hop stunt viroid* olarak adlandırılmıştır. Etmenin yapılan çalışmalarda *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd) (Van Dorst ve Peters, 1974) ile nükleotid dizisi olarak %95

oranında benzerlik bulunduğu ve bu iki etmenin aynı viroid türünün varyantı olduğu bulunmuştur (Sano ve ark., 1985).

Çalışma konusu olan viroid hastalık etmenlerinin turunçgil ve şerbetçi otunda farklı oranlarda bitkü habitüsünde küçülme ve ürün kalitesinde azalmalara neden olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiş ve bu konudaki hakkındaki bilgiler literatür özetleri “Önceki Çalışmalar” kısmında kısaca verilmiştir.

Yürütülen bu çalışma kapsamında, Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil üretim alanlarında ve Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarında bulunan viroid hastalık etmenlerinin saptanması ve elde edilen izolatların moleküler karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, farklı turunçgil türlerinde CEVd, CBLVd, HSVd, CCaVd, CDVd, CBCVd, CVd-V ve CVd-VI etmenlerinin ve şerbetçi otunda HSVd, HLVd ve AFCVd etmenlerinin iller bazında varlığı belirlenmiştir. Şerbetçi otu bitkisinde, günümüze kadar ülkemizde çalışılmamış olan şerbetçi otu viroidlerinin araştırılması ve her iki ürün grubunda ortak olarak bulunan viroidlerin benzerlik durumlarının ortaya konması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında belirlenen HLVd etmeni ilk kayıt olarak yayımlanmıştır.

Çalışma kapsamında varlığı belirlenen ve moleküler olarak teyidi yapılan etmenlerde, turunç ve Etrog citron bitkisi üzerinde canlı bitki üzerinde gen bankası oluşturma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca virülensliği yüksek olan seçilen izolatlarda yapılan gen klonlaması çalışmaları ile hem -20 ve -80 °C’de plazmide aktarılmış viroid genleri gliserin stok yapılarak gen bankası oluşturulmuştur. Gliserin stoğa alınmayan bir kısmı ise plazmid izolasyon kiti ile izolasyon yapıldıktan sonra full genom çalışmalarında kullanılmıştır. Burada elde edilen veriler ile genetik akrabalık ilişkileri ve viroidlerin ikincil yapıları ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viroidler nükleotid uzunluğu 246-434 arasında değişen, protein kodlama özelliği olmayan, tek iplikçikli ve dairesel RNA molekülüdür (Steger & Perreault, 2016). Etmen geniş bir konukçu aralığını enfekte edebilen en küçük bitki patojenleri olarak bilinmektedir (Flores ve ark., 2004). Konukçu dizinine bakıldığında, turunçgiller, asma, avokado, hindistan cevizi, şerbetçi otu, sert ve yumuşak çekirdekli meyveler, patates, domates, biber, patlıcan ve süs bitkileri olmak üzere geniş bir bitki grubunda hastalık oluşturmaktadır. (Fagoaga ve ark., 1996; Hammond ve Owens, 2006; Verhoven, 2010; Hadidi ve ark., 2017).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)'e göre viroidler *Avsunviroidae* ve *Pospiviroidae* olarak 2 farklı familya, 8 cins ve 32 türde sınıflandırılmıştır. Bitki patojeni olan bu viroidlere ait sınıflandırma çizelge 2.1.'de verilmiştir.

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

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

Viroidlerin replikasyonu yuvarlanan çember mekanizması ile gerçekleşmektedir. Mekanizma *Avsunviroidae* ve *Pospiviroidae* familyalarında sırasıyla simetrik ve asimetrik olarak 2 farklı şekilde gerçekleşmektedir (Di Serio,

2014). Bununla birlikte bu iki familyanın moleküler yapıları ve konukçularında bulunduğu yerlerde birbirinden farklılık göstermektedir. *Avsunviroidae* familyasını genom yapısı içinde korunmuş bölgelerinin bulunmadığı ve kendi kendilerine kesim özelliklerini çekiç başlı ribozimler ile gerçekleştirmektedirler (Fadda ve ark., 2003). *Pospiviroidae* familyasına bakıldığında ise genom yapılarında merkezi korunmuş bölgelerin bulunduğu ve kendi kendine kesim özelliğinin olmadığı bunun yerine stabil çubuk şeklinde yapılar oluşturduğu bildirilmiştir (Steger ve Riesner, 2003). *Avsunviroidae* ve *Pospiviroidae* familyalarının üyelerinin konukçu hücre içerisinde replikasyon yerleri ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda *Avsunviroidae* üyelerinin konukçu hücrenin kloroplastında *Pospiviroidae* üyelerinin konukçu hücrenin çekirdeğinde replike olduğu belirlenmiştir (Navarro ve ark., 1999; Verhoven, 2010; Flores ve ark., 2003).

Viroid etmenli hastalıkların karakteristik belirtilerine bakıldığında etmenin en karakteristik belirti olan budurlaşma olduğu bunun yanı sıra yaprak deformasyonları, yaprakların damar aralarında daralma, kloroz ve nekroz oluşumu, yaprakların kıvrıklaşması, yaprak saplarının kısılması, kabuk çatlaması, kabuk kavrılması ve zamklanması, çukurlaşmalar, çıkıntılar, gelişim bozulmaları, çiçeklerde renk değişimleri, meyvelerde renk ve şekil değişimi viroid temelli hastalıkların belirtileri olduğu bildirilmiştir (Skoric, 2017).

Dünyada viroid etmenleri daha çok tropik ve ılıman bölgelerde hastalığa neden olmaktadır. Buna karşın, sıcaklığın yüksek olduğu bölgelerde viroid etmenlerinden kaynaklanan hastalıkların oluşturduğu belirtilerin daha şiddetli olduğu bildirilmiştir (Soliman, 2012).

Viroidler bitkilerde çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir ve hastalık yaptıkları bitkilerde ekonomik anlamda tarımsal kayıplara neden olabilmektedirler. Bu bitki gruplarının en önemlileri arasında turuncgiller ve şerbetçi otu bitkileri de bulunmaktadır.

Turunçgillerde Gözlenen Viroidler:

Turunçgillerde hastalık oluşturan viroid etmenlerinden en çok *Citrus exocortis viroid* ve *Citrus cachexia viroid* hastalığı bilinmesine rağmen, turunçgillerde günümüze kadar 12 farklı viroid etmeninin tanısı gerçekleştirilmiştir (Semancik ve Duran-Vila,1991). Bu etmenler Çizelge 2.2’de belirtildiği gibidir.

Çizelge 2.2. Turunçgil viroidlerinin sınıflandırılması (Semancik ve Duran-Vila, 1991)

FAMİLYA	TURUNÇGİL VİROİDLERİ		
	CİNS	VİROİD	HASTALIK
POSPİVİROİDAE	POSPİVİROİD	CEVd	<i>Exocortis</i>
	APSCAVİROİD	CVd-I (CBLVd) CVd-Ia CVd-Ib	
	HOSTUVİROİD	CVd-II (HSVd) CVd-IIa CVd-IIb CVd-IIc	<i>Cachexia</i>
	APSCAVİROİD	CVd-III CVd-IIIa CVd-IIIb CVd-IIIc CVd-IIId CVd-V	
	COCADVİROİD	CVd-IV	

***Citrus exocortis viroid* (CEVd)**

Turunçgil cüceleşme hastalığına neden olan CEVd ilk olarak California da yapılan bir çalışmada üç yapraklı anacı üzerinde tanılanmış ve viroidin aşılı gözle ile

taşındığı belirlenmiştir (Fawcett ve Klotz, 1948). Scaly butt olarak adlandırılan hastalık Dünya’da turunçgil yetiştirilen birçok bölgeden rapor edilmiştir (Benton ve ark., 1949; Moreira, 1965; Wallace, 1978; Norman, 1963; Duran Vila ve Semancik, 2003).

1972 yılında Semancik ve Weathers turunçgillerde düşük moleküler ağırlıkta da infeksiyöz bir RNA molekülü bulunduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar o güne kadar virüs olarak düşünülen exocortis hastalık etmeninin viroid yapısında olduğunu bildirmişler ve hastalık etmenini *Citrus exocortis viroid* (CEVd) olarak tanımlamışlardır (Semancik ve Weathers, 1972). Etmen *Pospiviroidae* familyası, *Pospiviroid* cinsi, CEVd türü olarak sınıflandırılmaktadır. CEVd günümüzde en iyi karakterize edilmiş viroidlerden bir tanesidir. Etmen 371-410 nt uzunluğunda tek iplikçikli, circular veya linear formda, yaklaşık 105.000 dalton ağırlığında olup zayıf ve şiddetli hastalık belirtileri geliştiren çok sayıda varyanta sahip olduğu bildirilmiştir (Semancik ve ark., 1987).

CEVd’i turunçgillerde üç yapraklı ve hibridlerinde, rangbur laymında (*Citrus limonia*) hastalık belirtileri oluşturmakla birlikte tüm turunçgil tür ve çeşitlerini enfekte edebilmektedir. Ancak üç yapraklı (*Poncirus trifoliata*) ve hibritleri dışındaki çeşitlerde latent olarak bulunmaktadır (Roistacher, 1991). CEVd’nin turunçgil çeşitleri dışındaki konukçu spektrumunun da oldukça geniş olduğu bildirilmiştir (Duran-Vila ve Semancik, 2003). Etmen deneysel olarak pek çok bitki tür ve çeşidine aktarılmıştır (Semancik ve ark., 1988b). CEVd’nin Rutaceae familyası dışındaki doğal konukçusu olarak birçok türde varlığı (*Brassica napus*, *Daucus carota* (Fagoaga ve Duran-Vila 1996), *Solanum lycopersicum* (Mishra ve ark. 1991), *Solanum melongena* (Fagoaga ve Duran-Vila 1996), *Vicia faba* (Fagoaga ve ark., 1995), *Vitis sp.* (Flores ve ark. 1985; Garcia Arenal ve ark. 1987) (Duran-Vila ve Semancik, 2003)) farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Etmen sebzelerde, bağlarda, süs bitkilerinde ve yabancı otlarda da doğal olarak bulunmakta, ancak bu bitki gruplarında bodurluk dışında herhangi bir hastalık belirtisi göstermemektedir (Duran-Vila ve Semancik, 2003; Önelge, 2017).

Turunçgil yetiştirilen alanlarda Turunçgil Tristeza Virüsü (CTV)'nin oluşturduğu zarardan dolayı etmene duyarlı turunç anacı yerine üç yapraklı ve hibritlerinin anaç olarak kullanılmaya başlanması CEVd viroidinin sorun olarak ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Semancik, 1987).

CEVd'nin üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* L.) hibritlerinde, rangpur lime'ı (*Citrus limonia*) ve filistin lime'ı (*Citrus limettioides*) gibi hassas olan türlerde, anaç üzerindeki karakteristik simptomları toprak üstü kısımlarda kabuk pullanması, çatlaması ve yarılmalar soyulmalar olarak kendini göstermektedir. Ayrıca bitkide genel bodurluk oluşumu da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Benton ve ark., 1949; Malfitano ve ark., 2005).

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'nin şiddetli ırkı ile enfekteli olduğunda ağacın verim oranının %40-60 oranında azaldığını 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 az olduğu rapor edilmiştir (Yamada ve Tanaka, 1972).

Hop stunt viroid (HSVd) [Citrus cachexia viroid (CCaVd)]

Hop stunt viroid etmeninin neden olduğu 'Turunçgil gözenekleşme hastalığı' ilk olarak Childs (1950) tarafından bulunmuştur. Hastalığın ismi latince kötü koşul kelimelerinin birleşimi olan 'cachexia' olarak isimlendirilmiştir. Etmenin Orlando tanjelo (*C. paradisi* X *C. reticulata*)'nın floem dokularında oluşturduğu renk bozulmaları, kahverengileşme zamlı oluşumu ile

birlikte gözlenen kabuk çatlamaları ve odun çöküntülerinin tanılamak amacıyla belirlendiği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra Orlando tanjelo’da görülen belirtiler Filistin tatlı laymında (*C. limettiodes*) gözlenmiş ve hastalık ‘xyloporosis’ olarak adlandırılmıştır (Reichert ve Perlberger, 1934).

Reanwarakorn ve Semancik (1998) tarafından yapılan çalışma ile farklı turunçgil çeşitlerinde gözlenen bu belirtilerin aynı etmenin (CVD-II’nin) farklı varyantları tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. Cvd-IIa ve IIb olarak tanımlanan iki viroidin birbirine oldukça benzer homolojiye ancak farklı elektriksel mobilitelere sahip etmenler olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Cvd-IIa örneklerinin nükleotit dizilim analizleri bu viroidin tüm dünyada oldukça korunmuş bir genom yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Ancak Cvd-IIa ekonomik öneme sahip herhangi bir hastalık etmeni olmayıp tüm turunçgil çeşitlerinde latent olarak bulunduğu bildirilmiştir (Reanwarakorn ve Semancik, 1999a).

Viroidin hastalık belirtisi oluşturmeyen varyantlarının (CVD-IIa) üç yapraklı anacında ağaç gelişimini olumsuz yönde etkilediği ve hafif kabuk çatlamalarına neden olduğu belirlenmiştir (Duran-Vila and Semancik, 2003).

Semancik ve Duran-Vila (1991) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada CVD-IIb den daha hızlı hareket eden farklı bir varyantı belirlenmiş ve CVD-IIc olarak adlandırılmıştır (Semancik and Duran-Vila, 1991).

Japonya’da gerçekleştirilen bir hibridizasyon ve nükleotit dizilim çalışmasında CVD-IIb’nin HSVd’in bir varyantı olduğunu belirlenmiştir (Sano ve ark., 1988). Biyolojik aktiviteleri açısından bakıldığında turunçgillerde HSVd’nin turunçgillerde iki farklı grupta varyantlarının bulunduğu, bunlardan birinci grupta yer alanların (CVD-IIa) cachexia hastalığına duyarlı konukçularda latent durumda olduğu, diğer grupta yer alan varyantların ise (CVD-IIb ve CVD-IIc) cachexia hastalığına neden olan patojenler olduğu bildirilmiştir (Semancik ve Duran-Vila, 2003).

Pek çok turunçgil tür ve çeşitleri CCaVd'e karşı tolerant iken özellikle mandarinler (*C.reticulata*), bazı mandarin hibridleri (*C.retiulata* X *C.paradisi*) ve kamkat (*C.japonica*) türleri etmene karşı oldukça duyarlıdır.

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 infekteli olduğunu bildirmişlerdir.

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

Önelge (1994) tarafından Doğu Akdeniz bölgesinde mandarinlerde gerçekleştirilen farklı bir çalışma da ise CCaVd'nin ve bu grupta yer alan diğer viroidlerin CVd-IIa, CVd-IIb ve CVd-IIc sPAGE (Önelge ve ark.,1995) ve RT-PCR yöntemleriyle moleküler olarak tanımlanmıştır (Önelge ve ark.,1996; Önelge ve ark., 2002).

***Citrus bent leaf viroid* [CBLVd, *Citrus viroid* I, CVd-I]**

Etrog citron bitkisinden izole edilerek karakterizasyonu gerçekleştirilen CVd-I ilk kez sPAGE analizlerinde birbirinden farklı noktalarda bant gözlemlenen iki varyant şeklinde CVd-Ia ve CVd-Ib olarak tanımlanmıştır (Duran-Vila ve ark., 1988b).

CVd-I ilk olarak *Etrog citron* bitkisinde, yaprağın alt ve orta damar kısımlarında spesifik nekrotik lezyonların ortaya çıkması ile belirlenmiştir. Ayrıca bitkide parlak, simptomsuz, bükülmüş yapraklar ve kabuk dokusu altında iğne deliği şeklinde leke belirtileri etmenin karakteristik belirtileri olarak tanımlanmıştır (Duran-Vila ve ark. 1993).

CVd-Ia ile infekteli üç yapraklı anacında kabuk da iğne çıkıntılarına karşılık gelen kısımlarda derin çukurlar şeklinde oluşan semptomların bitki taç hacminde azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Roistacher ve ark. 1993).

Semancik ve ark. (1997); CVd-Ia ve CVd IIb ile bitkinin enfeksiyonunda bitki taç hacminin %20 oranında azaldığını, bununla birlikte bitki boyunda da azalmaların olduğunu bildirmişlerdir. Viroid ile enfekteli ağaçlarda viroid içermeyen ağaçlara oranla taç hacmi başına verimin önemli oranda (%17-38) arttığını gözlemişlerdir. CVdIa etmeninin ana konukçularının Rutaceae familyasıyla sınırlı olmasına rağmen, avokado bitkisine etmenin bir heteroloğunun aşısı ile deneysel olarak taşındığı bildirilmiştir (Hadas ve ark. 1992).

Etmenin 318 nükleotit den oluşan varyantı CBLVd ve 327 nükleotid dizisinden oluşan varyantı ise CVd-Ia olarak adlandırılmıştır (Ashulin ve ark.1991; Semancik ve ark. 1997).

Citrus dwarfing viroid (Citrus viroid III; CVd-III)

CVd-III viroidi ilk kez sPAGE analizleri ile farklı elektroforetik geçiş ve farklı nükleotit sayısına sahip olan CVd-IIIa (294nt) ve CVd-IIIb (297 nt) iki viroid olarak tanımlanmıştır (Duran-Vila et al.,1988).

Daha sonra yapılan hibridizasyon ve nükleotit dizilim analizleri çalışmaları ile bu grupta yer alan viroidlerin birbirleri ile yüksek oranda homoloji gösteren aynı etmenin farklı varyantları olduğu belirlenmiştir (Semancik and Duran-Vila, 1991; Rakowski et al.1994).

Turunçgiller ile sınırlı bir konukçu aralığına sahip olan *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Etrog citron*'da genel yaprak dökümü, yaprak sapı bükülmesine ve nekrozuna neden olurken, taç hacmi, verim ve meyve kalitesi üzerinde zararlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Duran-Vila ve ark.,1988). Ancak, CVd-III'ün turunçgillerle sınırlı bir konukçu aralığına sahip olması ve *Poncirus trifoliata* ve hibritlerine aşılansmış turunçgil bitkilerinde bodurlaşmaya neden olduğu farklı

araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Hutton ve ark., 2000 ; Vidalakis ve ark., 2011).

Valensiya portakalında CDVd popülasyonlarının yüksek genetik stabilite göstermelerine rağmen, biyolojik özellikler ve patojenite açısından farklılık gösteren dizi varyantlarının olduğu rapor edilmiştir (Owens ve ark., 2000; Murcia ve ark., 2009). Bu genetik değişkenlik turunçgil üretim alanlarında bodurlaştırıcı bir ajan olarak etmenin değerlendirilmesini düşündürmüştür (Semancik ve ark., 1997). Farklı turunçgil türlerinde istenilen bodurlaşma oranlarını teşvik etmek için turunçgil yetiştiriciliği yapılan farklı ülkelerde etmenin ciddi hastalık belirtileri oluşturmaması ve bitkilerde bodurlaştırıcı etkisi olması nedeniyle özel olarak Citrus viroid III varyantlarının arazi denemelerinde kullanması söz konusu olmuştur (Gillings et al.,1991; Semancik et al.,1997; Villalobos et al.,1997; Owens et al., 2000).

Turunçgil konukçularında herhangi belirgin hastalık belirtisi oluşumuna neden olmayan, ancak bitkinin performansını değiştirerek düzenleyici genetik yapılar olarak hareket eden, karakterize edilmiş küçük bulaşıcı ribonükleik asitler (TsnRNA'lar) olarak adlandırılan TsnRNA-IIIb (CDVd) ile yapılan çalışmada; *Poncirus trifoliata* anacı üzerine aşılı 13 yaşındaki portakal ağaçlarında (*Citrus sinensis*) taç hacminde standart dikimde (6mX6.7m) %45 sık dikimde (3mX6.7m) %53.5 oranında azalmalara neden olduğu ve birbirini takip eden 8 hasad döneminde de dikim sıklığından toplam verimin önemli oranda etkilenmediği belirlenmiştir. Bununla birlikte dekara verimin, sık dikim yapılan alanlarda, standart dikim yapılan alanlara göre neredeyse iki katına (%97.5) çıktığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. TsnRNA-IIIb ile enfekteli ağaçlarda meyve iriliği, kalitesi ve olgunlaşma süresi açısından dikim sıklığı ve kontrol uygulamaları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Sık dikim uygulamalarında ilk kurum maliyeti yüksek olmasına rağmen, alınan verimdeki fark nedeniyle yüksek kar eldesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Vidalakis ve ark., 2010).

Tessitori ve ark., (2013)'nın yaptığı çalışmada doğal bahçe koşullarında yetiştirilen üç yapraklı portakal ve Troyer sitranj anacı üzerine aşılı portakal üzerinde CVd-IIIb izolatının zaman içinde (25 yıl) yüksek genetik stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Citrus viroid IV (CVd-IV)

İlk kez Kaliforniya'da pek çok turunçgil viroidini bir arada barındıran bir turunçgil kaynağından elde edilen CVd-IV etmeni günümüze kadar turunçgil yetiştirilen ülkelerde en az gözlenen viroid olarak bildirilmiştir (Duran-Vila and Semancik, 2003).

CVd-IV viroidi İsrail ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda aşılı ile taşınan bodurlaştırıcı faktör olarak bildirilmiştir (Hadas et al.,1989; Önelge, 2000). CVd-IV 285 nt büyüklüğünde oldukça korunmuş bir nükleotit dizilime sahip olduğu belirlenmiştir (Önelge,1996).

CVd-IV ve CEVd'i yakın bir homolojiye sahip olup aynı zamanda sol terminal bölgesi HSVd'ne oldukça benzer olması nedeniyle CVd-IV viroidinin yeni bir mozaik tipli kimerik bir viroid olabileceği bildirilmiştir (Puchta ve ark.,1991).

Yapılan farklı bir çalışmada, turunç anacı üzerine aşılı turunçgil çeşitlerinde CVd-IV'ün semptomsuz olarak, herhangi bir hastalık oluşturmada Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak bulunduğunu belirtilmiş olmasına rağmen (Duran-Vila ve Semancik, 2003), ilerleyen zamanlarda üçyapraklı anacı ve melezleri üzerine aşılansın turunçgil türlerinde, CVd-IV ve HSVd'nin tüm varyantlarının ciddi kabuk çatlamalarına sebep olduğu bildirilmiştir (Verniere ve ark., 2004). Malfitano ve ark., (2005) İtalya'da yaptıkları çalışmada, daha önce farklı araştırmacıların CVd-IV etmeninin düşük oranda ve semptomsuz olarak bulunduğunu bildirdikleri (Duran-Vila ve Semancik, 2003; Najjar ve Duran-Vila, 2004) çalışmaların aksine, CVd-IV'ün oldukça yoğun olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir.

1995-2007 yılları arasında Çin’de yürütülen bir çalışmada, 21 portakal (*Citrus sinensis*), 6 mandarin (*C. reticulata*), 2 satsuma mandarinini (*C. unshiu*), 6 limon (*C. jambhiri*) ve 7 mandarin melezinden olmak üzere 42 adet bodurlaşma ve kabuk çatlaması semptomlu bitkiden örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Enfekteli ağaçlardan elde edilen sürgünler kaba limon (*C. jambhiri*) anacı üzerinde Arizona 861-S1 'Etrog citron' (*C. medica*) üzerine aşılanmıştır. 12 ay sonra, 42 örnekten 39 adedinde tipik bodurluk, epinasti ve Etrog’da yaprak kıvrılması gibi viroid semptom oluşumları ortaya çıkmıştır. 42 örneğin 37’si HSVd ve 35’i CDVd, 14’ü CEVd ve 13’ü CBLVd ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca, Sichuan Eyaletinden Meishan No. 9 (*C. sinensis*) ve Zhejiang Eyaletinden Akemi (*C. reticulata*) ve Nishirokaori (*C. reticulata*) çeşitlerinde CBCVd etmeninin varlığı tespit edilmiştir. CVd-V ise Zhejiang, Hunan ve Chongqing Eyaletinden Nishirokaori, Haruka (*C. tamuranua*) ve Kiyomi (*C. unshiu* × *C. sinensis*) çeşitlerinde tespit edilmiştir. 42 enfekteli turuncgil bitkisinden 36’sı birden fazla viroid türü ile enfekteli bulunmuştur. Bu bitkilerden elde edilen, CBCVd ve CVd-V’e ait RT-PCR ürünleri standart yöntemlerle klonlama işlemine tabi tutulmuştur (Cao ve ark., 2010).

Citrus viroid V (CVd-V)

Pospiviroidae familyası Apscaviroid cinsi içinde yeni bir tür olarak bildirilen CVd-V, *Atalantia citroides* bitkisine aktararak tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Serra ve ark., 2008). Yapılan çalışmada, CVd-V’in farklı turuncgil üretim alanlarından alınan 64 örnekte analizi gerçekleştirmiş ve CVd-V’in Amerika Birleşik Devletleri, İspanya, Nepal ve Umman’da varlığını belirlemişlerdir. Umman’da altı portakal izolatında bulunan CVd-V’in, referans CVd-V varyantı ile aynı bulunurken, CVd-VCA izolatı ile %98,6, CVd-VST izolatı ile %97,3 ve CVd-VNE izolatı ile %94,9 sekans benzerliğine sahip üç yeni varyantı sırasıyla; Kaliforniya, İspanya ve Nepal’den gelen örneklerde tanımlanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, bu viroidin yakın zamanda ortaya çıkmadığını ve nispeten bu etmenin yaygın olduğunu düşündürmüştür. Portakal,

mandarin ve mandarin hibritleri, limon, turunç, Tahiti lime'ı, Filistin tatlı lime'ı, kalamondin, bergamot ve kamkata aktarma deneyleri, tüm bu turunçgil türlerinin ve akrabalarının CVd-V için konukçu olduğunu göstermiştir.

Önemli turunçgil üretici ülkeler de yapılan farklı çalışmalar ile etmenin İspanya, Kaliforniya, Türkiye, Çin ve Japonya'da oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir (Serra ve ark., 2008; Cao ve ark., 2010; Ito ve Ohta, 2010; Önelge ve Yurtmen, 2012).

Pakistan Punjab'ta yapılan bir çalışmada, altı turunçgil viroidi arasında yer alan CVd-V'in dallarda hafif nekrotik lezyonlar ve gövde kısmında çatlak belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir. Çalışma kapsamında araştırmacılar, CVd-V için daha önce rapor edilen primerler kullanılarak etmenin saptanmasını zorlaştıran bazı değişiklikler olduğunu ortaya koymuşlar ve CVd-V AF1/CVd-V AR1 adı ile dizayn ettikleri primerlerin CVd-V'i 294bp'de elde edilen bant ile başarılı bir şekilde tesbit ettiğini belirtmişlerdir. Pakistan'dan elde edilen tüm izolatların, İran ve ABD'den gelen diğer CVd-V izolatları ile %98-100 oranında yüksek sekans homolojisi gösterirken; Çin, Japonya, Tunus ve Afrika'dan elde edilen izolatlar ile uzaktan akraba olduğunu bildirmişlerdir. Genbankta kayıtlı tüm CVd-V dizilerini kullanarak yaptıkları filogenetik analiz sonucunda iki CVd-V grubu (I ve II) tanımlamışlar ve çalışma kapsamında tanımladıkları izolatların grup I içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda CVd-V'in Pakistan'daki tüm narenciye çeşitlerinde yaygın olduğunu belirlemişlerdir (Ali ve ark., 2022).

CVd-V etrog citron bitkisinde bodurlaşma ve yaprak nekrozları belirtilerine neden olduğu ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bu viroidin tek olarak turunçgil çeşitlerinde bulunmadığı diğer viroidlerle (CBLVd, CDVd) bir arada bulunması nedeni ile turunçgil çeşitlerinde geliştirdiği belirtilerin henüz ayrıntılı bir biçimle bilinmediği ve bu nedenle herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmediği yapılan araştırmalar doğrultusunda bildirilmiştir (Serra ve ark., 2008, Hamdi ve ark., 2015).

Citrus Viroid VI (CVd-VI, CVd-OS)

Japonya’da yapılan bir çalışmada turunçgil bitkilerinden original source (OS) olarak adlandırılan 330-331 nt uzunluğa sahip yeni bir viroid bulduklarını bildirmişlerdir (Ito ve ark., 2001). Bulunan bu yeni viroid turunçgillerde herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmezken etrog citron bitkilerinde zayıf petiol nekrozlarına ve yaprak bant oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (Ito ve ark., 2001). Başlangıçta CVd-OS olarak adlandırılan bu viroid daha sonra CVd-VI olarak değiştirilmiştir (www.ictvonline.org).

CVd-VI’nın CEVd, CVd-III ve CVd-IV ile benzer bir nükleotit dizilimine sahip olduğu ve muhtemelen bu viroidlerin replikasyonu sırasında rekombinat olarak ortaya çıkmış kimerik bir viroid olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Ito et al., 2001). CVd-VI *Pospiviroidae* familyası *Apscaviroid* cinsi içinde sınıflandırılmıştır (www.ictvonline.org).

Chambers ve ark., (2020), dünya çapında turunçgil üretim alanlarında bulunan ancak daha önce Avustralya’da bildirilmemiş olan CVd-V ve CVd-VI ile etmenlerini ilk kayıt olarak belirledikleri çalışmalarında, *Citrus reticulata* Blanco örneğinde yaptıkları, SYBR-Green RT-qPCR çalışmalarında örneği CVd-V açısından pozitif bulmuşlardır (Vidalakis ve Wang 2013). Bu çalışma kapsamında yaptıkları HTS çalışmalarında, toplam nükleik asit izolasyonunu, mirVana miRNA İzolasyon kiti (Life Technologies, Avustralya) ile gerçekleştirip rRNA temizliğinin ardından, Truseq RNA Kütüphanesi Hazırlanması (Illumina, ABD) ile cDNA kütüphanesi hazırlanmış ve bir Illumina NextSeq500 dizileme platformu kullanılarak dizilenmiştir. Dizilenmiş ve kırılmış veriler; NCBI viroid/virüs genom referans veritabanlarına eşlenerek viral ve viroid okumaları çıkarılmış ve birleştirilmiş contig’ler, BLASTn sürüm 2.2.26 ile viroid/virüs veritabanındaki 294-nt CVd-V (EF617306) ve 330-nt CVd-VI (AB019508) izolatları ile eşleşmiş ve bu örnekte başka viroid veya virüs tespit edilmemiştir. CVd-V (Serra ve diğerleri 2008) ve CVd-VI’ya (Cao ve diğerleri 2017) özgü primerler ile RT-PCR analizleri ile her viroidin varlığı doğrulanmıştır. Bu tam uzunluktaki ampliconlar, pGEM-T

Easy vektör sistemi (Promega, Avustralya) kullanılarak klonlanmış ve her birinin en az beş klonu, eksiksiz viroid genomları üreterek her iki yönde dizi analizine tabi tutulmuştur. Örnekte CVd-V'in dört 294-nt'lik sekans varyantı (MN640600 ile MN640603), AB560862'ye (TS1 izolatu, Japonya) her biri 2-nt ile 3-nt süstitüsyona sahip sekans varyantı gözlenmiştir. CVd-VI için, Japon TS izolatu (AB054601) sırasıyla %100 ve %99 sekans benzerliği gösteren, 331-nt'lik tek bir varyantı (MN640604 ile MN640605) gözlenmiştir. RT-PCR ile yapılan testler, aynı mandarin çeşidinin 23 örneğinden iki adedinde hem CVd-V, hem de CVd-VI etmenleri saptanmıştır. Yapılan bu çalışma, Avustralya'da CVd-V ve CVd-VI'nın ilk tespiti olarak bildirilmiştir.

Turunçgil zamlı kabuk hastalığı (Citrus gummy bark disease)

Mısır'da turunç anacına aşılı portakal ağaçlarında floem renklenmesi olarak tanımlanan hastalık (Nour-Eldin,1959) ülkemizde turunçgil zamlı kabuk hastalığı olarak adlandırılmıştır (Norman 1963, Güllü1989).

Turunçgil zamlı kabuk hastalığının turunçgil cachexia hastalığı ile benzer hastalık belirtileri oluşturması bu hastalığın etmeninin CVd-II grubunda yer alan bir viroid olabileceği veya bu grupta yer alan viroidlerin (CVd-IIb ve CVd-IIc) hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasında etken olabileceği belirtilmiştir (Önelge ve ark, 2002).

Mısırdaki yapılan farklı bir çalışmada ise 299 nt sahip bir HSVd varyantının turunçgil zamlı kabuk hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (Sofy ve ark., 2010).

Turunçgil zamlı kabuk hastalığı Orta Doğu ve Afrika'da pek çok ülkede bulunduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Nour-Eldin,1959; Bove, 1995; Önelge, 1996).

Florida'da etmenin zayıf bir formunun varlığı bildirilmiştir ancak ülkenin diğerturunçgil yetiştiricilik alanlarında varlığına dair bir bilgi bulunmamıştır (Grimm ve ark., 1955)

Hastalığın en karakteristik belirtisi turunçgil gözenekleşme hastalığında olduğu gibi aşı birleşme noktasından başlayarak ağaç gövdesi boyunca ilerleyen zamlı kabuk oluşumudur. Şiddetli zamb oluşumunda kabukta zamlı çıkıntılar ve odun dokusunda bu çıkıntılara karşı gelecek şekilde çöküntüler gelişmektedir. Genellikle zamb aşı birleşme noktasında çepeçevre gelişen zamlı doku formunda veya floem renklenmesi şeklinde gözlenmektedir (Önelge,1996).

Etmen ilk kez Mısırdaki Baladi portakal çeşidinde bildirilmiş daha sonra yapılan çalışmalarda ise W. navel, Valensiya, Khalili White, Trablus, Kozan ve Dört Yol yerli portakal çeşitlerinde varlığı belirlenmiştir (Bove,1995, Güllü, 1989, Önelge,1996).

Şerbetçi otunda Gözlenen Viroidler:

Şerbetçi otu (*Humulus lupulus* L.) bitkisinde günümüze kadar (*Hop stunt viroid* (HSVd), *Hop latent viroid* (HLVd) ve *Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd)) olarak üç adet viroid hastalık etmeni belirlenmiştir (Eastwell ve Nelson 2007). Turunçgillerde patojen olarak bildirilen *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd)'in Slovenya'da 2014 yılında Şerbetçi otu bitkisinde varlığı ilk kez tespit edilmiştir. CBCVd etmenin şerbetçi otu bitkisinde verim ve kalitede azalma ve hatta birkaç yıl içinde enfekteli bitkilerin ölümüne neden olması sebebiyle önce EPPO alarm listesine alınmış karantina önlemleri ile etmenin sınırlandırılması nedeniyle daha sonra Avrupa'da EPPO A2 listesinde, Afrika'da Fas'ta karantina listesinde ve Asya'da Ürdün'de A1 listesinde kategorize edilmiştir.

Şerbetçi otu cüceleşme viroidi [*Hop stunt viroid* (HSVd)]

Hostuviroid cinsi içerisinde yer alan *Hop stunt viroid* (HSVd) ilk olarak şerbetçi otu (*Humulus lupulus* L.) bitkisinde belirlenerek isimlendirilmiştir. 1940'lı yılların başından 1960'lı yılların sonuna kadar Japonya'da "bodur şerbetçi otu", "sedir biçimli şerbetçi otu" olarak rapor edilmiş ve şerbetçi otu bitkisinin en önemli hastalıklarından biri olan hastalık *Hop stunt disease* olarak tanımlanmıştır

(Yamamoto ve ark., 1973). Hastalık 1988 yılında Kore’de, 2004 yılında Kuzey Amerika’da ve 2007 yılında Çin’de saptanmıştır (Sano, 2013).

Bu etmen hıyar bitkisine (*Cucumis sativus*) mekanik olarak bulaştırıldığında kısa süre sonra gözlenen semptomların *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd)’in oluşturduğu semptomlara benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Sano ve ark., 1981). Daha sonra yapılan çalışmalarda, HSVd ve CPFVd’in %95 dizi analiz benzerliğine sahip olduğu ve bu iki viroidin aynı viroid türünün varyantları olduğu belirlenmiştir (Sano ve ark., 1984; Hadidi ve ark., 2003).

Şerbetçi otu bitkisinde HSVd Avrupa’da ilk kez Slovenya’da tespit edilmiştir (Radisek ve ark., 2012). HSVd etmeninin, bitkilerin ciddi bir şekilde bodurlaşmasına, daha düşük verim vermesine, çiçek kozalarının alfa asit oranlarında önemli düşüşlerin olmasına (Sano, 2003) ve önemli metabolitlerin gen ifadelerinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Füssy ve ark., 2013). HSVd’in tipik semptomları arasında ayrıca yaprak kıvrılması ve küçük çiçek konilerinin oluşumu söz konusudur. HSVd ile enfekteli bitkilerde bodurluğun ortaya çıkması bitkilerin olgunlaşması ile 3. ve 5. yıldan sonra gözlenmektedir (Eastwell ve Nelson, 2007).

HSVd, tek iplikli, halkasal yapıda 294-303 adet nükleotitten oluşan RNA molekülü yapısında olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Flores ve ark., 2004).

HSVd’in hastalıklı bitkilerde oluşturduğu semptomlar; sarımsı yeşil renkli yaprak oluşumu ve erken ile orta büyüme döneminde yaprak saplarında sarkmaların oluşumu şeklinde gelişim, ayrıca ana ve yan dallarda boğum aralarının kısılmasına neden olmaktadır. Şerbetçi otu çeşidine bağlı olarak, oluşan bodurluk enfeksiyondan sadece birkaç yıl sonra ortaya çıkmaktadır. Daha ciddi semptomlar ise, asma başına toplam koni sayısında azalmanın eşlik ettiği alfa asit içeriğinde ciddi azalmalar şeklinde semptom oluşumları gözlenmektedir (Sano, 2013).

HSVd, odunsu bitkilerde geniş bir konukçu dizisine (erik, şeftali: Sano ve ark., 1989; narenciye: Diener ve ark., 1988; antepfıstığı: Elleuch ve ark., 2013) ve asma (Matoušek ve ark., 2003) sahip olduğu bildirilmiştir.

HSVd'in 144 adet varyantının bulunduğu, şerbetçi otu dışında, çok yıllık odunsu bitkileri içeren çok geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu dünyanın farklı ülkelerinde birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hammond ve Owens, 2006; Parkinson ve Reed, 2013). HSVd etmeni, incir, dut, badem, elma, kayısı, kiraz, şeftali, armut, erik, gibi çok sayıda konukçu bitkide var olduğu yapılan farklı çalışmalar ile tanımlanmıştır (Luigi ve ark., 2013; Hataya ve ark., 2017; Maddahian ve ark., 2019; Vamenani ve ark., 2019).

Yapılan çalışmalar sonucunda HSVd varyantları beş filogenetik gruba ayrılmıştır; Bunlar 1) erik (erik-şeftali-badem-kayısı) grubu (Plum: P) 2) şerbetçi otu (hop) grubu (Hop:H), 3) turuncgil cachexia grubu (Citrus: C), 4) erik-turuncgil grubu (P-C) 5) erik/şerbetçi otu/turuncgil 3 (P-H/cit3) grubudur (Ragazzino ve ark., 2004).

Tüm HSVd-şerbetçi otu izolatlarının asma izolatları (şerbetçi otu (-asma)) ile bir arada gruplanması dikkat çekici olmuştur (Sano, 2003; Hadidi ve ark., 2003'ten).

Enfekteli üretim materyali ile ülkeler arası dağılım sonucunda HSVd'in günümüzde Japonya, Kuzey Kore, A.B.D., Çin ve Slovenya gibi birçok ülkede şerbetçi otu üretim alanlarında varlığı bildirilmiştir (Sasaki ve Shikata, 1980; Lee ve ark., 1990; Eastwell ve Nelson, 2007; Guo ve ark., 2008; Radisek ve ark., 2012).

Şerbetçi otu latent viroidi [*Hop latent viroid* (HLVd)]

HSVd'den sonra şerbetçi otunda varlığı belirlenen viroidlerden birisi de HLVd'dir. İspanya'da şerbetçi otu üretim alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada viroid benzeri RNA olarak Pallas ve ark. (1987) tarafından varlığı belirlenmiştir.

HLVd'nin ayrıntılı biçimde incelenmesi ve bu viroidin dünya'da şerbetçi otu yetiştirilen tüm alanlarda yaygın olarak bulunduğu Puchta ve ark. tarafından (1988) ortaya konmuştur.

HLVd 255-256 nt'den oluşan tek iplikli halkasal ve enfeksiyöz yapıda RNA'dan oluşmaktadır. HLVd etmeninin herhangi bir farklı varyantının olmadığı sadece şerbetçi otunda HSVd ile düşük oranda bir benzerliğine sahip olduğu ve HSVd'den daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Puchta ve ark., 1988).

HLVd'in bitkide enfeksiyon oluşturma konukçu bitkinin metabolizmasına, viroidin çoğalmasına, patojenitesine ve hücrel faktörlerle etkileşimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Tabler ve Tsagris, 2004).

Diener (1999), HLVd etmeninin herhangi bir hastalık semptomu oluşturmadığını bu neden ile viroidin adının latent kalması gerektiğini belirtirken, günümüzde HLVd'in şerbetçi otu bitkisinde bazı çeşitlerde semptomlar oluşturduğu, istenmeyen toksik maddeler ürettiği ve kozalarda bazı ikincil metabolitlerde kantitatif değişikliklere neden olduğu yapılan farklı çalışmalar ile belirlenmiştir (Barbara ve ark., 1990; Adams ve ark., 1991; Patzak ve ark., 2001).

Daha sonar yapılan çalışmalarda, HLVd Belçika, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Macaristan, Polonya, Portekiz, Rusya, İspanya ve Sırbistan'da geniş çapta (test edilen şerbetçi otu gen kaynaklarının %90- %100'üne kadar) tespit edilmiştir (Pallás ve ark., 2003).

HLVd'in Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da şerbetçi otu yetiştiriciliği yapılan alanlarda farklı şerbetçi otu çeşitlerinde %85 ile %100 arasında değişen oranlarda enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Barbara ve Adams, 2003; Eastwell ve Nelson, 2007).

Şerbetçi otunda HLVd'nin kozalak verimini %27 oranında ve alfa asit içeriğini %20-50 oranında azaltırken, beta asit içeriğini yükselttiği ve bira mayası yapımında kullanılan çiçek kozalaklarının biranın kalite ve aromasını olumsuz yönde etkilediği yapılan analizler ile belirlenmiştir (Barbara ve ark., 1990; Adams ve ark., 1991; Svoboda ve ark., 2012)

Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)

Japonya'da Koganezawa ve ark. (1989) "Mutsu" (Crispin) elma çeşidinde meyve kabuğunda buruşukluğa neden olan belirtiler gözlemlenmiştir. Yapılan bulaştırma çalışmaları ile hastalığın başka bitkilere taşınabildiği Ito ve ark., (1993) tarafından belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, elmada meyve kabuğunda buruşukluğa neden olan AFCVd etmeninin nükleotid dizisi belirlenmiş, AFCVd etmeninin *Pospiviroidae* familyası *Apscaviroid* cinsine ait bir viroid olduğu bildirilmiştir (Ito ve ark., 1998).

Ito ve Yoshida (1991), gerçekleştirdikleri bir çalışmada hastalık etmenini sadece ticari elma çeşitlerinde tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Ito ve ark. (1993) AFCVd'in konukçu dizisini belirleme ile ilgili yaptıkları bir başka çalışmada, etmenin "Rutgers" domates, "Suyo" salatalık, "Kurodane-sanjyaku" börülce çeşitlerine, *Gynura aurantiaca*, *Chenopodium quinoa* ve *Nicotiana occidentalis* indicator bitkilerine bulaştırma testleri yapmışlar ve aktarma denemesi sonuçlarının negatif olduğunu bildirmişlerdir. AFCVd'inin konukçularının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmada etmenin konukçu aralığının oldukça dar olduğu ve doğal konukçularının elma, şerbetçi otu ve hurma olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca etmenin domates, salatalık ve yabani şerbetçi otu bitkilerine deneysel olarak aktarılabildiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, domates ve salatalıkta AFCVd'nin varyantları aynı iken, yabani şerbetçi otundan elde edilen izolattın, nükleotid dizilimlerinin kültür bitkisi olarak yetiştirilen şerbetçi otuna ait nükleotid dizilerine çok benzediğini belirlemişlerdir (Suzuki ve ark., 2017).

Sano (2004) tarafından yapılan bir çalışmada; HSVd, HLVd ve AFCVd'nin neden olduğu hastalıkların, şerbetçi otu yetiştiriciliği yapılan alanlardaki verimi yaklaşık olarak %30 ile %50 oranında azalttığını belirlemişlerdir.

Citrus bark cracking viroid (CBCVd; Citrus viroid IV; CVd_IV)

CBCVd, ağaç kavununda (*Citrus medica*) keşfedilen dördüncü viroid türü olduğu için başlangıçta Citrus viroid IV (CVd-IV) olarak adlandırılmıştır. sPAGE analizlerinde en hızlı elektroforetik hareketliliğe sahip etmen olarak belirlenmiş ve

CVd-I, CVd-II ve CVd-III ile dizi homolojisi göstermemiş, yalnızca 284bp'lik tam nükleotid dizisi ile CEVd ile zayıf bir dizi homolojisi göstermiştir (Duranvila ve ark., 1988). *Pospiviroidae* familyası ve *Cocadviroid* cinsi içerisinde sınıflandırılmış (Flores ve ark., 1998), ancak hala bu sınıftaki yeri tartışmalıdır (Semancik ve Vidalakis, 2005). CVd-IV'in üç yapraklı anaçlarında kabuk çatlama belirtileri ile ilişkili olması nedeniyle, etmeni tanımlaması açısından CBCVd olarak yeniden adlandırılmıştır (Vernière ve ark., 2004; Vernière ve ark., 2006). CBCVd'in şerbetçi otundaki varlığının keşfi ile *Hop latent viroid* (HLVd) ile birlikte Cocadviroid cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır (EPPO, 2021).

CBCVd için doğal konukçular, limon (*Citrus aurantiifolia*), turunç (*Citrus aurantium*), nagami kumkatı (*Fortunella margarita*), Tahiti lime'ı (*Citrus latifolia*), Filistin lime'ı (*Citrus limettoides*), limon (*Citrus limon*), etrog citron (*Citrus medica*), Meyer limon (*Citrus meyeri*), mandarin (*Citrus reticulata*), tatlı portakal (*Citrus sinensis*), üç yapraklı (*Citrus trifoliata*) ve çeşitli melezleri dahil olmak üzere *Citrus* cinsinin farklı türleri ve türler arası melezleri ile sınırlı olduğu bildirilmiştir. 2015 yılında CBCVd'i Slovenya'da şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) üretim alanlarında ciddi hastalıklara neden olan bir etmen olarak saptanmış ve EPPO alarm listesindedir (Jakse ve ark., 2015). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, CBCVd-pis adı antep altında fıstığında (*Pistacia vera*-pis) varlığı bildirilen, diğer bir CBCVd varyantının da diğer CBCVd izolatları ile daha düşük dizi benzerliği (%87 nükleotit benzerliği) gösterdiği belirlenmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2018).

2.1. Dünyada Turunçgiller ve Şerbetçi otunda Bulunan Viroidler Konusunda Yapılan Çalışmalar

Viroidler ilk olarak Theodor Diener (1971) tarafından bulunmuş ve adlandırılmışlardır. Diener (1971) 'patates iç yumru' hastalığına neden olan etmenin dahili marker RNA'lar ile yoğunluk gradyanlı santrifüj ve poliakrilamid jel elektroforez kombinasyonunu gerçekleştirerek, etmenin, 2.5×10^4 ile 1.1×10^5

dalton olarak değişen moleküler ağırlıklara sahip RNA'dan oluştuğunu gözlemlemiştir. Etmenin çoğalmasını gerçekleştiremeyecek derecede küçük olan bir genetik yapısının olması ve protein kılıfının bulunmamasından dolayı virüs olamayacağını bildirmiştir (Diener, 1971).

Roistacher ve ark. (1977) *Etrog citron* bitkisinin 861-S-1 klonunun daha duyarlı bir indikatör bitki olması nedeniyle CEVd'in hafif ırklarının dahi bu klonda kolay bir şekilde semptom geliştirdiğini belirlemişlerdir.

Viroidlerin yalnızca nükleik asitten oluşmaları nedeni ile yani protein kılıflarının bulunmamasından serolojik tanılama yöntemleri ile tanılanmalarının mümkün olmadığı bildirilmiştir (Reisner ve Gross, 1985).

Viroidlerin tanılama yöntemleri ile ilgili yapılan bir çalışmada elektron mikroskopu ile yapılan tanılamaların viroidlerin tanısında bitki virüslerinin tanısında olduğu kadar başarılı olmadığı bildirilmiştir (Reisner ve Gross, 1985).

Morton ve ark. (1993), HLVd'in dormansi döneminden sonrada bitkilerde sürgünlerin patlaması ile yavaş yavaş açığa çıkarak tüm bitkiye yayıldığını gözlemlemiştir. Aktif sürgün büyümesi döneminde sürgün uçlarındaki HLVd konsantrasyonunun arttığını bildirmişlerdir (Matusek ve ark., 1995).

Randles tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise viroidlerin konukçularında oluşturduğu zararın öldürücü, çok şiddetli, orta şiddetli ve az şiddetli olarak değişiklik gösterebildiğini bunun yanı sıra bodurluk semptomu oluşturduğunu bildirmiştir (Randles, 2003).

Ito ve ark. (2002), Turunçgillerde görülen CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III, CVd-IV ve CVd-OS ve ASGV: CTLV 6 adet viroidi belirlemek amacıyla multiplex RT-PCR çalışması yürütmüşler ve CVd-I-LSS'i (CBLVd'in farklı bir varyantı) CBLVd'den ayırmak için bu yöntemi tasarlamışlardır. Multiplex RT-PCR sonuçları, her bir patojeni saptamak için tek RT-PCR çalışmalarının sonuçları ile tutarlı olduğunu gözlemlemiştir.

Ito ve ark. (2002), Turunçgillerde görülen CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III, CVd-IV ve CVd-OS ve ASGV: CTLV 6 adet viroidi belirlemek amacıyla

multiplex RT-PCR çalışması yürütmüşler ve CVd-I-LSS'i (CBLVd'in farklı bir varyantı) CBLVd'den ayırmak için bu yöntemi tasarlamışlardır. Multiplex RT-PCR sonuçları, her bir patojeni saptamak için tek RT-PCR çalışmaların sonuçları ile tutarlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Vernière ve ark. (2004)'nın turuncgillerde sorun olan viroidlerin Pomeroy üç yapraklı anacı üzerine aşılı klemantin ağaçları üzerindeki etkisini belirlemek için arazi çalışması yapmışlardır. Viroidler ile infekteli ağaçlar, simptom gelişimi, büyüme ve meyve verimi açısından 12 yıllık (1990- 2002) bir süre boyunca periyodik olarak izlenmiştir. Sadece CEVd'in, üç yapraklı anacında exocortis hastalığının karakteristik simptomsu olan belirgin cüceleşme ve kabuk kavlamasına neden olduğunu belirlemişlerdir. HSVd varyantlarında, cahexia hastalığının karakteristik özelliği olan floem dokularındaki zamlı oluşumu klemantin çeşidinin sürgünlerinde de gözlenmiştir. Üç yapraklı anacında kabukta çatlama belirtileri gösteren bitkilerde meydana gelen çatlamların, CVd-IV, HSVd veya CEVd enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Diğer anormallikler (derin çukurlar, şişkinlikler ve zamlı çukurlar) viroid ile ilişkili bulunmamıştır. CBLVd ve CDVd enfeksiyonu ile ilgili spesifik bir simptom gözlenmemiştir. HSVd, CVd-IV ve CBLVd'inin büyüme ve verim üzerinde çok az etkisi olduğu veya hiç etkisi olmadığı, CEVd ve CDVd'in zaman içinde daha belirgin hale gelen büyüme ve verimin önemli ölçüde azalmasında etkili oldukları gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar verim azalmasını esas olarak meyve büyüklüğünün kaybı ile ilişkilendirmişlerdir. Çalışma sonunda genel olarak, vejetatif büyümedeki azalma ile verim arasında bir korelasyon olduğu belirlemişlerdir.

Kunta ve ark. (2007), Teksas'ta turuncgil viroidlerinin tanısında kullanılan yöntemleri karşılaştırmak için yaptıkları bir çalışmada RT-PCR yöntemini kullanarak altıntop fidanlarında CEVd, HSVd (Cachexia ve Cachexia olmayan varyantlar), CVd-III ve CVd-IV etmenlerinin moleküler olarak tanılmasını gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda Konukçu bitkilerden alınan etmenler Etrog bitkilerinde yapılan biyolojik indeksleme çalışmaları ile bitkilerin viroidle enfekteli

olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar pahalı ve uzun süreli bir biyolojik indekslemeden önce RT-PCR ile stok bitkilerin taranmasıyla bulaşık olanların gen havuzundan kolay bir şekilde uzaklaştırılabileceğini bildirmişlerdir.

Eastwell ve Nelson (2007), Washington'da şerbetçi otu üretiminin yoğun olduğu üç farklı bölgede viroid hastalık etmenlerinin varlığını araştırmışlardır. Kuzey Amerika'da şerbetçi otu üretim alanlarında, 33 üretim alanından 10 tanesinde, toplanan 126 bitki örneğinden 19 adedinde HSVd'in varlığını belirlemişlerdir. HSVd etmenini zayıf gelişen ve yapraklarında kloroz gelişimi gösteren bitkilerde tesbit etmişlerdir. Japonya'da varlığı bildirilen AFCVd etmeninin varlığı hiçbir örnekte belirlenmezken, dünya çapında şerbetçi otu üretim alanlarında varlığı yaygın olarak bildirilen HLVd etmenini ise 126 örnekten 98 adedinde belirlemişlerdir.

Wang ve ark. (2008), 2002-2006 yılları arasında üç yapraklı anacında bodurluk, kabukta çukurlaşma ve çökme belirtisi gösteren 72 portakal, limon, mandarin ve mandarin melezlerinden survey çalışması yapmışlardır. Survey çalışması sonucu elde edilen semptomlu örnekler Kaba limon ve Arizona 861-S1 Etrog citron'a aşılanmışlardır. Etrog citron indikatör bitkilerine aşılanan 60 adet örneğin tipik viroid semptomu gösterdiği belirlenmiştir. Bu semptomlara neden olan etmenleri tanılamak için tüm genom sekanslarını hedefleyen beş primer çifti kullanılarak tek aşamalı RT-PCR çalışması yapmışlardır. Gerçekleştirilen moleküler çalışmalar ile CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III ve CVd-IV etmenleri için kullanılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda 72 adet örnekte CEVd, CVd-II ve CVd-III viroidlerinin tanınması gerçekleştirilmiştir. Çin'de CVd-II ve CVd-III'ün varlığı bu çalışma ile ilk kez tanımlanmış ve NCBI'da bildirilen üç alt tipin hepsinden farklı ve yeni bir alt tip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bernard ve ark. (2009), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada farklı turuncgil çeşitlerini enfekte eden CEVd popülasyonlarının genetik çeşitliliği, 10 yıllık evrimden sonra enfekte olmuş üç yapraklı anacına aşılı portakal ve turunc fidanlarından elde edilen popülasyonlar ile aynı dönem için Etrog citronda bulunan

ata popülasyonu karşılaştırılarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda CEVd popülasyonlarının birbiri ile yakından ilişkili haplotiplerden oluştuğunu bunun nedeninin popülasyondaki mutasyon, seçim ve genetik arasındaki dengeden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Flores ve ark., (2014) RNA'nın genetik bilgiyi taşıması ve bir biyokatalizör olabilmesi sebebiyle RNA'yı ara işlevlere indirgeyen DNA ve proteinlerden daha önce ortaya çıktığına dair bir fikir birliği olduğunu belirtmişlerdir. DNA ve proteinlerin ortaya çıkmasıyla birlikte, bu protoviroidlerin bazı yeteneklerini kaybettiği ve şu anda bitki parazitleri haline geldikleri düşünülmektedir. Viroidlerin çok eski bir kökene sahip olabileceğine dair kanıt gösteren özellikleri; Küçük genoma sahip olmaları (250-400 nükleotid), Yüksek G + C içeriğine sahip olmaları ile öncül RNA polimerazların çoğalma doğruluğunu arttırdığını, tam çoğalma için genomik etiket ihtiyacı hariç dairesel yapılarının olması, genişletilmiş genomlara modüler montaj için yapısal periyodikliğe sahip olmaları, ribozomdan önce ortaya çıkan protein kodlama kapasitesinin olmaması, bazılarında RNA dünyasının parmak izi olan ribozimlerin aracılık ettiği replikasyonlara sahip olmasıdır.

Murcia ve ark. (2015)'ı Carrizo sitranj anacı üzerine aşılı Washington Navel portakalında CEVd, HSVd, CBLVd, CDVd ve CBCVd etmenlerinin etkisini belirlemek için 1989 yılında bir bahçe denemesi başlatmışlardır. 2004-2007 yılları arasında viroid enfeksiyonunun, bitki boyu, büyüklüğü, meyve üretimi ve kalitesi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Viroid enfeksiyonundan sonra bitkilerde büyüme ile ilgili parametrelerden özellikle bitki hacminin daha çok azaldığını belirlemişlerdir. CEVd ile enfekteli ağaçlarda, kabuk lezyonları olsa da, kabukta çatlama gözlenmemiş, bitkiler deneme sonunda söküldüğünde köklerde küçük lezyonlar gözlenmiştir. CBCVd enfekteli bitkilerde kabuk çatlama belirtilerinin yanı sıra meyve verim artışı ile birlikte daha küçük boyutlu ağaçlar gözlenmiştir. CBLVd, HSVd veya CDVd enfeksiyonu sonucu bitkilerde önemli bir simptom gelişimi gözlenmemiştir. HSVd ile enfekteli ağaçlarda, meyvelerin kalitesi

viroidden çok etkilenmemiş, yalnız hasat edilen meyvelerin daha küçük olduğu gözlenmiştir. CEVd, CDVd ve özellikle CBCVd ile karışık enfekteli bitkilerde ağaç veriminde artış (verim / kanopi hacmi) olduğu belirlenmiştir.

Polonya'da 2014 yılında bitkilerde virüs hastalıklarının oluşumunun izlenmesi, erken kontrol önlemlerinin uygulanması ve daha fazla hastalık yayılmasının önlenmesi için şerbetçi otu üretim alanlarında görülen virus ve viroidlerden izlenmesi için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Polonya'daki IUNG-PIB deney istasyonundan ticari şerbetçi otu üretim alanlarından alınan numuneler *Hop latent virüsü* (HpLV) ve *Hop latent viroid* ve *Hop stunt viroidleri* (HLVd ve HSVd) için test edilmiştir. Virüs testi için qRT-PCR ve ELISA yöntemleri, viroidleri tespit etmek için RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. HpLV ve şerbetçi otu viroidlerinin yoğunluğu, programın başlamasından önce bildirilen orandan daha düşük bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında viroid yoğunluğunun düşük bulunmasının örnekleme zamanından kaynaklanacağını düşündürmüştür. Şerbetçi otu üretim alanlarından elde edilen HpLV ve HLVd izolatlarının, Çek Cumhuriyetinden elde edilen izolatlar ile çok benzer olduğu belirlenmiştir (Ziegler ve ark., 2014).

Ziegler ve ark., (2014)'nın Polonya'da yaptıkları çalışmada, 2012 yılı Eylül ayında örneklemleri gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, şerbetçi otu için bu dönemin mevsim sonu olması nedeni ile bitkilerdeki viroid oranlarını çok düşük bulmuşlardır. Yeni sürgün veren genç bitkilerde, viroidin dokuya özgü olarak farklılık gösterdiği ve en yüksek seviyenin köklerde ve en düşük seviyenin de gövde ucunda bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, büyüme mevsiminin sonunda viroid seviyesinin düşük olması nedeni ile viroid tesbiti için örnekleme zamanı açısından doğru olmayacağını belirtmişlerdir.

2.2. Ülkemizde Turunçgiller Ve Şerbetçi otunda Bulunan Viroidler Konusunda Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde turunçgil viroidlerinin varlığı ilk kez yabancı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. FAO uzmanı olarak ABD'den gelen Norman (1963) ülkemiz turunçgillerinde farklı virüs hastalıklarının yanı sıra *Citrus exocortis* viroid etmeninin oluşturduğu exocortis ve *Citrus cachexia viroid* etmeninin oluşturduğu cachexia hastalıklarının da varlığını bildirmiştir.

Turunçgil cüceleşme hastalığının Türkiye'de var olduğunu bildiren bir diğer araştırmacı da Moreira (1965) olmuştur. Araştırmacı turunçgillerde anaç olarak üç yapraklı (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) anacının kullanıldığı Ege Bölgesi'nde 1964-1965 yıllarında turunçgil ağaçlarının %23'ünün cachexia, %10'nunun exocortis hastalığı ile bulaşık olduğunu bildirmiştir.

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 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).

Doğu Akdeniz bölgesinde farklı turunçgil çeşitlerinde moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar ile ülkemizde CEVd ve CCaVd'nin yanı sıra CBLVd, CDVd, CBCVd, CVd-V'in varlığı ardışık poliakrilamid jel elektroforez ve RT-PCR yöntemleriyle saptanmış ve nükleotid dizilimleri belirlenmiştir (Önelge, 1994; Önelge ve ark., 1996; Önelge, 2007; Önelge ve Yurtmen, 2012).

Önelge ve ark., 2000; turunç üzerine aşıli Meyer limonunda CVd-IIIa ve CVd-IV turunçgil viroidlerinin nükleotid dizilimlerini belirlemişlerdir.

Önelge ve ark., 2004; 'Gummy Bark' hastalığı ile *Citrus viroid* II varyantlarının ilişkisini araştırmışlardır.

Önelge, 2010; Çukurova bölgesinde zamklanma, bodurluk veya düşük verim gözlenen yada simptom göstermeyen, portakal, mandarin, limon ve greylfuttan aldığı örnekleri *Citrus medica* L.'ye aşılamaştır. Daha sonra bu bitkilerden aldıkları örneklerde viroid purifikasyonu ve sPAGE analizlerinde CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III ve CVd-IV etmenlerinin varlığını tesbit etmiş, RT-PCR analizlerinde de spesifik primerler ile bu etmenlerin varlığını teyit etmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, CEVd, CVd-II ve CVd-III'ün genellikle karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde şerbetçi otu bitkisinde virüslerle ilgili bazı araştırmalar bulunmakla birlikte, viroidler ile ilgili daha önce yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız kapsamında, HLVd'in ülkemiz şerbetçi otu üretim alanlarında varlığı ile ilgili ilk kayıt bildirimini gerçekleştirilmiştir (Gök Güler ve Önelge, 2017).

Türkiye'de HSVd ile ilgili yapılan çalışmalarda; Amari ve ark. (2000) hastalığın Septik kaysı çeşidinde bulunduğunu, Torres ve ark. (2003) Türkiye'nin batı kesiminde; kaysıda (% 66) ve şeftalide (% 57) HSVd'in görülme sıklığının oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sipahioğlu ve ark. (2002 ve 2006) Hacihaliloglu kaysı çeşidinde bir örneğin HSVd ile enfekteli olduğunu, Gümüş ve ark. (2007 ve 2008) 26 adet kaysı, şeftali ve erik örneğinde % 7 oranında HSVd etmeninin varlığını belirlerken, Gazel ve ark., (2008) testledikleri 335 örnekten, 19 kaysı, 14 şeftali, 17 erik, 3 kiraz ve 1 badem örneğinin HSVd ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma; Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı, Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bitki Hastalıkları Şubesi, Biyoteknoloji Laboratuvarı ve seralarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal**3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyal**

Çalışmada bitkisel materyallerin toplanması turunçgiller için; Adana, Mersin, Hatay ve Osmaniye il sınırları içerisinde yoğun olarak turunçgil üretimi yapılan alanlardan, şerbetçi otu için ise Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarından gerçekleştirilmiştir. Bitki örneklerinin toplanması aşamasında, simptomatolojik olarak viroid açısından şüpheli bulunan bitki örnekleri fotoğraflanıp, etiketlenmiş ve kağıt havluya sarılıp plastik torbalara alınarak buz aküsü bulunan kaplara yerleştirilmiştir. Örneklerin laboratuvar koşullarına getirilmesi aşamasında soğuk zincirin bozulmamasına dikkat edilmiştir. Örneklerin alınması ve taşınması aşamasında, plastik torbalar, buz aküleri, buzluk, etiket ve fotoğraf makinası gibi materyaller kullanılmıştır.

3.1.2. Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyaller ve pozitif kontrol gen bankasının oluşturulması

Biyolojik indeksleme çalışmalarında; turunçgil viroidlerinin tanısı için en duyarlı indikatör olan Etrog citron (*C. medica* L.) cv. 861-S-1 seleksiyonu indikatör bitki olarak ve pozitif kontrol gen bankasının oluşturulmasında da turunç (*C. aurantium* L.) bitkisi kullanılmıştır. Turunçgillerde karışık infeksiyon halinde gözlenen viroidlerden CEVd'ini tek izolat olarak elde etmek için indikatör bitki olarak kadife (*Gynura aurantiaca*) bitkisi kullanılmıştır. Yine karışık infeksiyon halinde bulunan turunçgil viroidlerinden HSVd'i tek olarak elde edebilmek için ise

indikatör olarak hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisi, şerbetçi otu viroidleri için ise lif kabağı (*Luffa cylindrica*) bitkisi kullanılmıştır. Biyolojik indeksleme ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılan otsu bitkilerin yetiştirilmesi 8000 lüks aydınlatmalı iklim odalarında gerçekleştirilmiştir. Yetiştiricilik sırasında belirtilen indikatör bitkilere ait tohumlar, yaprak gübreleri, organik sıvı gübreler ile tarım ilaçları, ayrıca harç hazırlanmasında dezenfekte edilmiş torf, perlit, bahçe toprağı ve çiftlik gübresi, saksı vb. malzemeler kullanılmıştır.

Etrog ve diğer odunsu indikatör bitkilerin yetiştirilmesinde yine steril torf, perlit, toprak, viyol ve plastik saksılar kullanılmıştır. Bitkilerin sıcaklık isteklerinin yerine getirilmesi, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı binası iklimlendirme odalarında ve Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitü Müdürlüğü Araştırma seralarında kontrollü ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları sırasında otsu bitkiler için, etmenin tanımlanmış olduğu bitki örneklerinin Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyon çözeltileri, şırınga ucu, latex eldiven, %2'lik Sodyum hipoklorid çözeltisi, 1X TKM tamponu çözeltisi, saf-steril su, parafilm bantlar ve plastik saksılar içerisinde yetiştirilmiş otsu bitkilere ait genç fideler kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler tanılama yöntemlerinde kullanılan materyaller

3.1.3.1. Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan materyaller

TNA ekstraksiyonu çalışmaları için; her iki bitki grubu için farklı illerden toplanan bitki örnekleri, Thermo scientific firmasından temin edilen Total RNA izolasyon kiti, CTAB buffer, hassas terazi, havan, dövücü, tüpler (1,5ml-2ml), rak, mikropipet, pipet ucu, thermal blok, soğutmalı santifirüj cihazı, vortex, kloroform: izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi, CTAB yönteminin farklı aşamalarında kullanılan ve farklı firmalardan temin edilen bazı kimyasallar (Tris HCl, Sodyum asetat, Sodyum klorür, EDTA, CTAB, PVP 40, Etil alkol, NaOH, vb...), saf su cihazı, derin dondurucu (-20 °C), etüv ve otoklav,

Sigma 2-16K soğutmalı santrifüj, Eppendorf Thermomixer, pH metre, Eppendorf otomatik pipet setleri, otomatik pipet uçları, otoklav, steril cam malzemeler, steri su kullanılmıştır. Nükleik asit kalite ve miktarını ölçmek için nanodrop gibi laboratuvar alet ve ekipmanları kullanılmıştır.

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

Bu çalışmanın Ters transkriptaz (RT) aşamasında thermal cycle cihazı, Thermo scientific firmasından temin edilen M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase enzimi, RNasin (Ribonükleaz inhibitörü), dNTP setleri, Thermo Scientific DTT (DL-Dithiothreitol), 5x tampon çözeltisi, Revers primerler (Çizelge 3.1), steril distile su, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, vorteks, buz makinesi, santrifüj cihazı ve tüp (0.2 ml) gibi materyaller kullanılmıştır. Şerbetçi otu bitkisinde aranılan etmenlerin tanısında ise Thermo scientific Verso 1-step RT-PCR Hot-Start Kit kullanılmıştır. Nükleik asitlerin çoğaltılmasında Eppendorf Mastercycler Gradient Thermocycler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. RT aşamasında kullanılan primerler

Primerler	Sekans Dizilimi (5'-3')
Random Primer (Hexamer)	NNNNNN
Şerbetçi otu	
AFCVd	GACTCGTCGTCGACGAAGGGTC
HLVd	ATACAACTCTTGAGCGCCGA
HSVd	GGCAACTCTTCTCAGAATCC
Turunçgil	
CEVd-RT ^z	CTTCCTCCAGGTTTCCCCGGGGATCCC
HSVd-RT ^z	GTGTTGCCCCGGGGCTCCTTTCTCTGG
CBLVd-RT ^z	GCTGACGAGCCTTCGTCGACGACGACC
CVd-III-RT ^z	CCAACCTTAGCTGCCTTCGTCGACGACG
CVd-IV-RT ^z	GTCTGAAGAGATTTCCCCGGGGATCCC
CVd-V PII ^s	CGACGACAGGTGAGTACTCTCTAC
CVd-VI/OS	CGTCGACGAAGGCATGTGAGCT

Çalışmanın PCR aşamasında kullanılmış olan materyaller, RT aşamasından sonra elde edilen cDNA'lar, Taq DNA polimeraz (ThermoFisher), dNTP setleri, 5x tampon çözeltisi, Forward ve Revers primerler, Saf distile steril su, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, vorteks, buz makinesi, santrifüj cihazı, tüp (0.2ml) ve İontek (Türkiye) firmasından temin edilen Oligonükleotid primerler (Çizelge 3.2) olmuştur. Ayrıca jelden yapılan purifikasyon çalışmasında; Thermo scientific Gen jet Gel Extraction Kit'i kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR ve nested-PCR aşamalarında kullanılan primerler, bağlanma sıcaklıkları ve çoğaltılan bölgenin büyüklüğü

Viroid-Primer	Sekans Dizilimi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge\Uzunluk
Şerbetçi otu			
AFCVd R ^a	GACTCGTCGTCGACGAAGGGTC	59	220 bp
AFCVd F ^a	CTGGTTGGGACCGCTGGGAC		
HLVd R ^a	ATACAACTCTTGAGCGCCGA	59	360 bp
HLVd F ^a	CCACCGGGTAGTTTCCAAC		
HSVd R ^a	GGCAACTCTTCTCAGAATCC	59	300 bp
HSVd F ^a	GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG		
Turunçgil			
CEVdR1 ^z	CCGGGGATCCCTGAAGGA	55	371 bp
CEVdF1 ^z	GGAAACCTGGAGGAAGTCG		
CEVdC R	CCCTGAAGGACTTCTTCCCC	55	371 bp
CEVdH F	ATCCCCGGGGAACCTGGAGGAAG		
HSVdR1 ^z	GGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGTC	55	299 bp
HSVdF1 ^z	GGGGCAACTCTTCTCAGAATCC		
HSVdCa ^z	GAATCCAGCGGGGGCGTG	55	283 bp
HSVdNonCa ^z	TTTTACCTTCTCCTGGCTCTTCGAGTG		220 bp
CBLVd-R1 ^z	TTCGTCGACGACGACCAGTC	55	327 bp
CBLVd-F1 ^z	GGCTCGTCAGCTGCGGAGGT		
CVd-III-R1 ^z	TTCGTCGACGACGACAGGTA	60	294 bp
CVd-III-F1 ^z	GGCAGCTAAGTTGGTGACGC		
CVd-III-C ^y	CTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCGC	60	294 bp
CVd-III-H ^y	CTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCGC		
CVd-IV-R1 ^z	GGGGATCCCTCTTCAGGT	60	284 bp
CVd-IV-F1 ^z	GGGGAAATCTCTTCAGAC		
CVd-V PI ^s	TCGACGAAGGCCGGTGAGCA	60	
CVd-V PII ^s	CGACGACAGGTGAGTACTCTCTAC		
CVd-VI/OS CB3CM ^x	ACGACAGGTGAGTTCTCCTT	50	330 bp
CB3-CP ^x	CGTCGACGAAGGCATGTGAGCT		

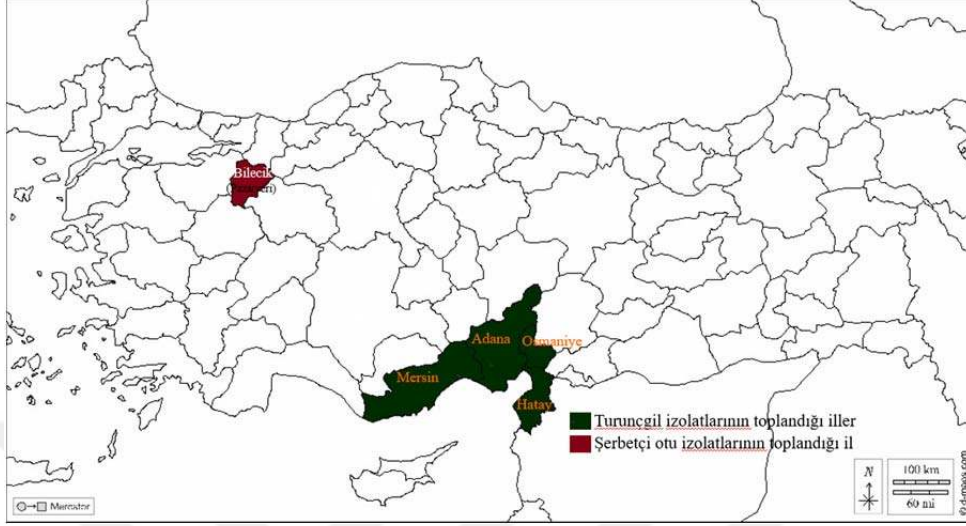
^a Eastwell and Nelson, (2007), ^z Bernad and Duran-Vila (2006), ^y Garnsey et al. (2002), ^x Ito et al. (2001), ^s Serra et al. (2008)

3.1.3.3. Elektroforez çalışmasında kullanılan materyaller

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan ürünler, %2'lik agaroz jel, mikrodalga fırın, pleyt, güç ünitesi cihazı, elektroforez tankı, 1X TAE buffer çözeltisi, Thermo scientific 100 bp ve 50 bp DNA ladder, pipet ve pipet ucu gibi materyaller bu çalışmada kullanılmıştır. Görüntüleme aşamasında ise agaroz (sigma), agaroz jel tankı, safe T stain (Syber green boya), güç kaynağı, VILBER marka jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntüler alınmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Çalışmada kullanılacak olan hastalıklı bitkisel materyalin seçilmesi, toplanması ve muhafazası**

Çalışma kapsamında örneklemeler turunçgiller için; Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yoğun turunçgil üretim alanlarından güdümlü örneklemeye (simptomatolojik olarak viroid hastalıkları açısından şüpheli bulunan bitkilerden örneklemeye) şeklinde yapılmıştır. Şerbetçi otu için ise; Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarında virüs/viroid hastalık belirtisi gösteren şüpheli örneklerden alınmaya çalışılmış, herhangi bir belirtiye rastlanmayan durumlarda da örneklemeye basit tesadüfi usulle gerçekleştirilmiştir (Bora ve Karaca, 1970). Çalışılan bitki türlerinden hastalıklı bitki örneklerinin toplanması; Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil üretim alanlarında ve Güneydoğu Marmara bölgesi şerbetçi otu üretim alanlarında gerçekleştirilmiştir. Bu üretim alanlarının Türkiye haritası üzerindeki yerleri Şekil 3.1'de verilmiştir. Turunçgiller için yoğun üretimin yapıldığı Adana, Hatay, Mersin, Osmaniye illerinden (Şekil 3.2) ve şerbetçi otu için ise yoğun üretim yapılan Bilecik ili Pazaryeri ilçesindeki (Şekil 3.4) üretim alanlarından virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni simptomsu bulunduran bitkilerden örneklemeler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Turunçgil izolatlarının toplandığı iller (koyu yeşil renk) ve şerbetçi otu izolatlarının toplandığı il (koyu kırmızı renk) ait survey alanlarının Türkiye haritası üzerindeki yerleri



Şekil 3.2. Turunçgiller için Adana, Hatay, Mersin, Osmaniye illerinden *C. limon*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. paradisi* türlerinden güdümlü survey çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlar

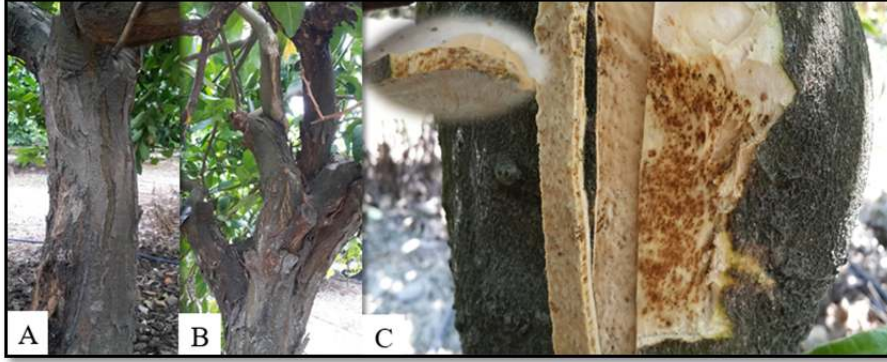


Şekil 3.3. Şerbetçiotu için Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu (*H. lupulus*) üretim alanlarından güdümlü survey çalışmalarının gerçekleştirildiği noktalar

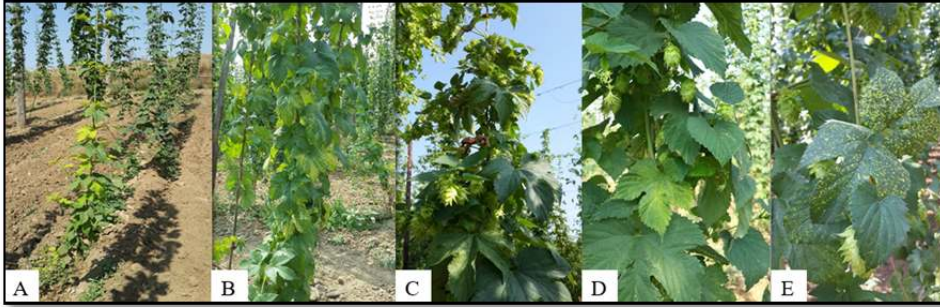
Çalışma kapsamında toplanan örneklerde, turunçgiller için 2016-2018 yılları Mart ve Kasım ayları arasında, bitkilerde genel olarak gelişim geriliği, bodurluk (Şekil 3.4A, B), verim ve kalite kaybı, geriye doğru kuruma (Şekil 3.4C, D) ve ölüm (Şekil 3.4E) belirtileri gözlenen alanlardan ve limonlarda gövde çatlaması (Şekil 3.5A, B) ve mandarinlerde aşu noktası üzerinde kabuk alt kısmında floem dokusunda zamlı çıkıntı ve odun dokusunda çukurluk belirtileri (Şekil 3.5C) gözlenen bahçelerden örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Şerbetçi otu için ise; Bilecik ili Pazaryeri ilçesi ve çevresindeki 35 köyü kapsayan üretim alanlarından Erciyes, Brewers Gold, Aroma ve Ege çeşitlerine ait öncelikle virüs ve virüs benzeri hastalık belirtisi gösteren şüpheli bitkilerden örneklemeler yapılmıştır (Şekil 3.5). Şerbetçi otunda örnek alımı 2017-2018 yılları Temmuz-Ağustos ayları arasında bitkinin çiçeklenme döneminde gerçekleştirilmiştir. Şerbetçi otu bitkilerinde ise bitkilerde gözlenen genel bodurluk (Şekil 3.6A), sararma (Şekil 3.6 B) ve yaprak belirtilerine (Şekil 3.6 C, D, E) göre örneklemeler yapılmıştır.



Şekil 3.4. Turunçgillerde Adana, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinden alınan örneklerde görülen bodurluk (A, B), geriye doğru kuruma (C, D) ve ölüm (E) belirtileri



Şekil 3.5. Turunçgillerde Adana, Mersin, Hatay ve Osmaniye illerinden alınan örneklerde görülen limonlarda gövde çatlaması (A, B) ve mandarinlerde aşı noktası üzerinde kabuk alt kısmında floem dokusunda zamlı çıkıntı ve odun dokusunda çukurluk (C) belirtileri



Şekil 3.6. Şerbetçi otu bitkilerinde Bilecik ili Pazaryeri ilçesinden alınan örneklerde görülen bodurluk (A), sararma (B) ve yaprak belirtileri (C, D, E)

3.2.2. Bitkisel materyallerin alımı

Turunçgillerde bugüne kadar bulunmuş olan 7 viroid türü içinde, bilinen önemli hastalıklardan birisi olan exocortis'in etmeni CEVd'i belirlemek için cüceleşme (bodurluk) gösteren, üçyapraklı ve hibritleri üzerinde yetiştirilen turunçgil tür ve çeşitlerinde anaç kısımlarında kabuk kavlaması gösteren bitkilerden örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Turunçgiller için önemli hastalıklardan bir diğeri olan cachexia (gözenekleşme) hastalığının etmeni olan HSVd'in ve varyantlarının tesbiti için ise mandarin ve mandarin hibritlerinde genel bodurluk gözlenen, aşı birleşme noktası üzerinde ve gövde kabuğu altında (floemde) zamklanma ve zambak paketi oluşumu olan bitkilerden örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte CBLVd, CDVd etmenleri için farklı turunçgil tür ve çeşitlerinde bodur ağaç gelişimi, CBCVd etmeni için ise farklı turunçgil çeşitlerinde bodurluk ve kabuk çatlaması symptom oluşumlarına göre örneklemeler yapılmıştır. Turunçgil viroidlerinin yoğun karışık infeksiyon halinde bulunduğu düşünülen bitkilerde daha şiddetli symptom oluşumu gözlemlendiği düşünülerek örneklemeler daha ağır symptomlu bitkilerden gerçekleştirilmiştir.

Adana ilinden 190 örnek, Mersin ilinden 100 örnek, Hatay ilinden 80 örnek ve Osmaniye ilinden 15 örnek olmak üzere toplamda 385 adet hastalık belirtisi gösteren turunçgil bitki örneği alınmıştır. Arazi gözlemleri sonunda toplanan örnekler, etiketlenip poşet içerisine alınmıştır. Etiketlenen örnekler buz içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiş, TNA ekstraksiyonuna kadar örneklerin kabuk ve yaprak dokularından ayrı ayrı alınarak, etiketlenip paketlenmiş ve - 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Şerbetçi otu bitkisi için ise; yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Bilecik ili Pazaryeri ilçesinde Erciyes, Brewers Gold, Aroma ve Ege çeşitlerine ait bitkilerden çiçeklenme periyodu olan Temmuz- Ağustos aylarında literatürde belirtilen gelişme geriliği (bodurluk vb.), yapraklarda sararma, nekroz ve/veya deformasyon oluşumu gösteren bitkilerden örneklemeler yapılarak çalışılmaya başlanmıştır. Şerbetçi otu bitkisinden toplam 214 adet örnek alınmıştır. Her ilde

viroid ile enfekteli olabileceği düşünülen şüpheli ağaçların her birinden, ağacı temsil edecek şekilde dört yanından sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler ayrı ayrı örnek torbalarına konulmuş, etiketlenmiş ve testlenmek üzere Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Biyoteknoloji Laboratuvarına soğutuculu termoslar içerisinde getirilmiştir. Getirilen örneklerden fotoğraflamalar yapılmış, kayıtları tutulmuştur. TNA ekstraksiyonu sırasında örneklerin yaprak dokuları alınıp sıvı azotta ezilip etiketleri ile birlikte -80 °C’de muhafaza edilmiştir. TNA ekstraksiyonundan sonra tüm örnekler bir ve/veya iki aşamalı RT-PCR analizine tabi tutulmuştur.

Arazi çıkışları sonucunda pozitif olarak belirlenen bitkilerden çalışma süresince kullanmak, indiktor ve stok bitkilere aşılama amacıyla aşı kalemleri alınmıştır.

3.2.3. Biyolojik indeksleme yöntemini ve gen bankasının oluşturulması

Biyolojik indeksleme çalışmaları otsu ve odunsu bitkiler üzerinde gerçekleştirilmiştir. İndikatör bitkiler olarak turunçgil viroidleri için Etrog citron (*C. medica* L.) cv. 861-S-1 seleksiyonu indikatör bitki olarak kullanılmıştır. CEVd’ini ayırmak için indikatör olarak kadife bitkisi (*Gynura aurantiaca*) bitkisi kullanılmıştır. HSVd için ise indikatör olarak hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisi, şerbetçi otu viroidleri için lif kabağı (*Luffa cylindrica*) bitkisi kullanılmıştır. Toplanan örneklerden elde edilen ve RT-PCR sonucunda pozitif sonuç veren izolatlar seçilerek TNA’leri mekanik inokulasyonda kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon işlemi iğne yardımıyla bitki gövdesine çizme şeklinde (Stem slash) gerçekleştirilmiştir. TNA’ler bitki gövdesine ½ oranında TKM ortamı ile sulandırılarak aktarılmıştır. Çizme işlemi uygulanan gövde kısımları parafilmle sarılarak nem kaybı önlenmiştir.

Mekanik inokulasyondan yaklaşık iki ay sonra Etrog citron bitkileri kontrol edilmeye başlanmış ve epinasti, nekroz oluşumu ve bitki gelişimi gözlenmeye çalışılmıştır. Otsu bitkilere gerçekleştirilen inokulasyondan 2 hafta sonra gözlemler

başlamış boğum arası kısılma, epinasti, bodur gelişim, yaprak boyutu gibi oluşumlar pozitif değerlendirmeye alınmıştır.

Gen bankası oluşturması şerbetçi otu ve turunçgiller için elde edilen izolatların Etrog citron ve turunç üzerine aşılama ile gerçekleştirilmiştir. Aşılama işlemleri araziden alınan ve pozitif olarak farklı viroidlerle enfekteli örneklerin daha sonraki çalışmalarda pozitif kontrol amacıyla kullanılması amaçlanarak yapılmıştır. Aşılama tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı bitkiler kullanılmış ve gövdesi kalem kalınlığına erişmiş bitkiler üzerine daha önce RT-PCR ile viroid enfekteli olduğu saptanmış turunçgil ağaçlardan alınmış göz ve kabuk dokuları aşılama için inokulasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Şerbetçi otundan alınan örnekler ise mekanik olarak etrog citron bitkilerine aktarılmıştır. Mekanik inokulasyonda TKM tampon çözeltisi kullanılmış ve iğne yardımıyla gövdeye çizikler oluşturularak enfekteli bitki özsuynun inokulasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitki özsuynun aktarılmasından sonra yara yerleri parafilmle kapatılmıştır. Bitkiler iklimlendirme odalarında ve serada muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Moleküler Çalışmalarla İlgili Yöntemler

Moleküler çalışmalarla viroidlerin saptanması aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirilmiştir;

Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu; CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tampon çözeltisi temelli total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu Li ve ark. (2008)'e göre modifiye edilerek uygulanmıştır. Ayrıca GeneJet RNA Purification Kiti (Thermo Fisher Scientific) ile kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR uygulamaları,

Agaroz jelde kuvvetli bant gösteren örnekler İontek firmasına sekans analizine gönderilmiştir.

Elde edilecek olan nükleotid dizilimleri NCBI-Blast Gen Bankasındaki veriler ile Mega Blast 7 ile karşılaştırılarak genomik analizleri ortaya konmuştur.

Böylece elde edilen gen bankası verileri ile filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1.Total Nükleik asit ve Total RNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler

3.2.4.1.(1).Bitki dokularından Total Nükleik asit ekstraksiyonu

Her iki bitki grubunda da viroidlerin araştırılması moleküler yöntemlerle laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Hastalık etmeni viroid RNA'larının bitki dokusundan saflaştırılması ve elde edilmesi Li ve ark. (2008)'e göre modifiye CTAB yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1.(2).Total nükleik asit izolasyon çalışmalarında CTAB Temelli Total Nükleik Asit Ekstaksiyonu

Porselen havanlara alınan taze yaprak veya gövdenin kabuk dokusundan kazınmış örnekten (300-500 mg bitki örneği) alınarak sıvı azot ile iyice ezilmiştir. 2 ml ependorf tüp içerisine 1 / 10 mg/hacim olacak şekilde ~2 ml'lik CTAB Buffer (% 2 CTAB, % 2 PVP – 40, 100 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA ve % 0,2 2- Mercaptoetanol) eklenmiş ve örnek iyice vortekslenerek homojenize edilmiştir.

Hazırlanan örnekler 65 °C termal blokta 30 dak. inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra örnekler 4 °C 'de 10.000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenmiştir. Üst fazdan yavaşça bir şekilde 1 ml'lik temiz bir sıvı alınarak yeni 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 1 ml Kloroform: İsoamil Alkol (24:1) eklenerek kibarca alt üst edilerek karıştırılmıştır.

4 °C 'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.

Santrifüjden sonra tüpün üst fazından 750 µl'lik kısmı, 1.5 ml'lik temiz bir ependorf tüp içine transfer edilerek, üzerine 450 µl soğuk İso-propanol eklenmiştir. Kibarca birkaç defa alt üst edildikten sonra -20 °C'de 30-60 dakika arasında veya bir gece inkübasyona alınmıştır.

-20 °C'den çıkarılan örnekler 13.000 rpm'de 10 dak. Santrifüjlendikten sonra üstteki sıvı faz dikkatli bir şekilde boşaltılmıştır.

Pelet (katı faz)'e 1 ml % 70'lik alkol eklenerek 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve % 70'lik etanol tüplerin dikkatli bir şekilde çevrilmesi ile dökülmüştür.

Daha sonra örneklerin bulunduğu tüpler hava veya vakumla kurutulmuştur.

Katı kısım (pelet) 100 µl ddH₂O veya TE bufferda çözündürülmüştür.

Ekstrakte edilen total nükleik asit etiketlenerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Yüksek kalitede nükleik asit için A 260/280 değerinin optimum 1.8-2.0 değerleri arasında olması RT-PCR çalışmasının verimliliğini arttıracığı için, çalışmadan önce izole edilen RNA'ların spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca örneklerden RNA izolasyonu için GeneJET Plant RNA Purification Kiti kullanılmıştır. İzolasyon aşamalarını içeren kit protokolü aşağıda verilmiştir.

3.2.4.1.(3). GeneJET Plant RNA Purification Kiti Protokolü;

100 mg taze veya donmuş bitki dokusu ezilerek kullanılmıştır.

1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne Plant RNA Lysis Solution'dan 500 µl eklenmiş ve üzerine ezilmiş bitki örneği konularak 10-20 sn vortekslenerek iyice karıştırılmıştır.

Örnekler 56 °C'de 3 dak. çalkalayıcı thermal blokta inkübe edildikten sonra 5 dak. 20.000g (14.000 rpm)'de santrifüjlenmiştir.

Santrifüjden sonra üst fazdan (süpernatant) ~450-550 µl'lik kısım temiz mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 250 µl soğuk %96'lık etanol eklenerek pipetle iyice karıştırılmıştır.

Hazırlanan karışım purifikasyon kolonu içeren toplama tüpüne pipetle aktarılmış ve 1 dak. 12.000 g'de (~11.000 rpm)'de santrifüjlenmiştir. İçine çözelti akan alttaki tüp atılarak kolon yeni tüpe aktarılmıştır.

Purifikasyon kolonun üzerine 700 µl Wash Buffer I (WB I) (etanol eklenmiş) eklenmiş ve 1 dak. 12.000 g (11.000 rpm)'de santrifüjlenmiştir.

Alta geçen sıvı kısım atılarak saflaştırma kolonu 2 ml'lik yeni toplama tüpüne yerleştirilmiş ve purifikasyon kolonunun üzerine 500 µl Wash Buffer II (WB II) (etanol eklenmiş) eklenmiştir.

Daha sonra tüpler 1 dak. 12.000 g (11.000 rpm)'de santrifüjlenmiş, alta geçen solusyon atılarak purifikasyon kolonunun üzerine yeniden 500 µl Wash Buffer II (WB II) eklenmiş ve 1 dak. 12.000 g (11.000 rpm)'de santrifüjlenmiştir.

Alt faza geçen kısım atıldıktan sonra kolon 1 dak. max. hızda 20.000 g (14.000 rpm)'de yeniden döndürülmüş ve alta geçen kısım tüple birlikte atılmıştır. Purifikasyon kolonu RNase free 1,5 ml'lik toplama tüpüne aktarılmış ve RNA'yı kolondan tüpe almak için purifikasyon kolonunun membranının merkezine 50 µl nükleaz free su eklenerek 1 dak. 12.000 g (11.000 rpm)'de santrifüjlenmiştir.

30 µg'dan daha yüksek verim beklendiği zaman elution aşaması yani bir önceki aşama tekrarlanmış, işlem bittikten sonra purifikasyon kolonu atılmıştır.

Saflaştırılmış RNA etiketlenerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. -20 °C'den çıkarılan RNA'lar çözündürüldükten sonra RNA'ların degrade olmaması amacıyla, çalışma aşamasında buz üzerinde tutulmuştur.

3.2.4.2. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Testi

Elde edilen nükleik asit ekstraktlarından RT-PCR çalışmaları ve komplementer DNA (cDNA) sentezi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adımlarından oluşacak test için aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2.(1). Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi ticari olarak satın alınacak reverse transcriptase enzimi içeren Thermo Scientific RevertAid RT cDNA sentez kiti (Thermo Scientific) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu prosedüre göre ilk olarak ependorf tüplerinin içerisine 2-4 µl total RNA, 1 µl Random Hexamer primer (0.5 µg/µl) (Çizelge 3.2) konulmuş ve DEPC su ile 12 µl' ye tamamlanmıştır. Tüpler, mikrosantrifüjde 3-5 sn tutulduktan sonra 65 °C'de 5 dk inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5x reaction buffer, 1 µl RiboLock RNase inhibitor (20u/µl), 2 µl 10mM dNTP mix, 1 µl RevertAid RT (200 U/µl) eklenerek toplam hacim 20 µl' ye ayarlanmış ve kısa süreli santrifüj uygulandıktan sonra 25 °C'de 5 dk.'yı takiben 42 °C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 70 °C'de 5 dk. inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşamaı tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PCR'da kullanılıncaya kadar üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2.(2).Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR işlemi taq DNA polimeraz için ticari firmanın (Thermo Fisher) önerdiği prosedüre göre 25 µl hacimde yapılmıştır. Buna göre steril PCR tüpüne 2 µl cDNA, 12.5 µl PCR Master Mix (2x) (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 10 pmol (1'er µl primer Fw/Rev), 2 ünite *Taq* DNA polimeraz ve 8 µl nucleaz free su eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR çalışmasında kullanılan primerler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek Sano ve ark. (2001)'nın uyguladığı prosedüre göre thermo cycle programı uygulanmıştır.

Bağlanma sıcaklıkları her etmen için spesifik olan primerin sıcaklığına göre ayarlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2.(3). Tek Aşamalı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR çalışmalarında Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit kullanılmıştır. RT-PCR reaksiyonu 25 µl hacimde hazırlanmıştır. PCR

reaksiyon bileşenleri olarak; 6,75 µl su, 12,5 µl 2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix, 1,25 µl RT Enhancer, 1µl Forward primer (10µM), 1 µl Reverse primer (10 µM) (Çizelge...), 0,5 µl Verso enzim mix, 2 µl RNA (100 ng) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer çiftleri, elde edilen RT-PCR ürünlerinin büyüklüğü ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Kit thermal cycler programı

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	95 °C	15 dakika	1 döngü
Ayrılma	94 °C	30 saniye	35 döngü
Bağlanma	Tm-7 °C	1 dakika	
Uzama	70 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

Hazırlanan PCR tüpleri thermal cycler cihazına yerleştirilmiş ve kit protokünde belirtilen ve yukarıda verilen 1-Step RT-PCR thermal cycler programı uygulanmıştır (Çizelge 3.3). Primerlerin bağlanma sıcaklıkları ise Tm derecelerinin 5-7 °C altı olacak şekilde ayarlanarak validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve en iyi bulunan sıcaklıkla çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.4.2.(4) .Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan nükleik asitler 1X lik TAE (Tris Acetate EDTA pH 8,3) çözelti ile hazırlanmış %2’lik agaroz jelde (Owens ve ark., 2012) yürütülmüştür. Cam erlen içerisine 2 gr (%2) agaroz tartılarak konmuş ve üzerine 100 ml 1X TAE tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım mikro dalga fırında tamamen eriyinceye kadar ısıtılmış, iyice eriyen karışım 50 °C’ye ayarlanmış ısıtıcı karıştırıcıda yavaş yavaş soğuması sağlandıktan sonra %5 oranında Safe_T stain boyası agaroz jele eklenip biraz daha karıştırıldıktan sonra

yatay elektroforez tankına uygun kalınlıkta tarak yerleştirilmiş tanklara dökülmüş ve üzeri alimünyum folyo ile sarılarak kapatılıp 30 dakika oda sıcaklığında polimerize olması için beklenmiştir. Jel tamamen donduktan sonra tarak çıkarılarak jel aparatı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzerini 1-2 mm kaplayacak şekilde 1 X TAE tamponu elektroforez tankının içerisine doldurulmuştur. 10-12 µl PCR ürünü üzerine 2-3 µl 6 X yükleme tamponu (Loading Dye) olacak şekilde toplam 12-15 µl'lik karışım jelde açılmış kuyucuklara mikropipetle yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra 6 µl 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), en soldaki çukura ve negatif ve pozitif kontrollerde en sağdaki çukurlara gelecek şekilde yükleme işlemi tamamlanmıştır. Tankın kapağı kapatılarak tankın hacmine göre 80 ml lik tank için 80 Voltluk elektrik akımı verilerek jelde 1 saat süreyle koşturulmuştur. DNA Ladder da bulunan en alttaki bandın son 1cm alan kalana kadar yürümesi sağlanarak işlem sonlandırılmıştır. Jel boya içerdiği için yürütme işlemi de kapalı ortamda gerçekleştirilmiştir. İşlemin sonunda jel tanktan alınarak UV-transilluminatörde (Vilber marka) ultraviyole ışık altında bant varlığı görüntülenmiştir. Agaroz jel elektroforez çalışmaları Galitelli ve Minafra (1994)'da belirtilen protokolün modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Jel görüntüleme sisteminde, beklenen moleküler ağırlığa sahip olan örnekler için PCR ürünleri seçilmiş ve DNA dizi analizi yaptırmak amacıyla PCR'da 50 µl olacak şekilde çoğaltılmıştır.

DNA Dizileme ve BLAST Analizi

RT-PCR çalışmaları sonucunda belirlenen bazı izolatlar, dizi analizi için firmaya gönderilmiştir. Firma tarafından gönderilmiş olan DNA dizileri kendi aralarında ve NCBI gen bankasındaki referans izolatlara ait olan kayıtlarla genomik ve filogenetik analizlerin yapılması amacıyla DNA dizileme çalışmalarına alınmıştır. Bu amaçla seçilen PCR ürünleri için belirlenen firmadan çift yönlü kısmi genom dizi analizi hizmeti alınmıştır.

Sekans verilerine ait elde ettiğimiz kromotogram dosyaları, ChromasPro 1.7.6 kromotogram analiz programına yüklenerek analiz edilmiştir. Her bir etmen için kullanılan forward - reverse primerlerle yapılan sekans verileri birleştirilmiş ve okumalara ait konsensüs diziler oluşturulmuştur. Elde edilen konsensüs diziler NCBI gen bankası veri tabanında kayıtlı verilerle BLASTn analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak veri tabanında en yüksek eşleşme gösteren kayıtlı izolatlardan seçim yapılarak genomik ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nükleotit dizilerinin Mega 7 programında Neighbour Joining istatistik metodu ve Kimura 2 modeli kullanılarak dendogramları çizilmiştir. Dendogramlar oluşturulurken kullanılan bootstrap analizleri ise 500 ila 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, her bir viroidin dünyadaki farklı izolatlar ile akrabalık ilişkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Ayrıca yerel izolatlara ait oluşturulan konsensüs diziler, NCBI gen bankası veri tabanına online olarak kayıt edilerek erişim numaraları alınmıştır.

Çalışılan viroidler arasında seçilen bazı izolatlarda gen aktarma ve plazmidin saflaştırılarak DNA dizi analizine gönderilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir.

Gen Klonlaması Çalışmaları

Top 10 İnvitrogen kit ile kit protokolüne uygun olarak gen klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Son döngüden sonra 72 °C 'de 7-30 dakikalık bir uzatma süresi eklenmiştir. PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek kontrol edilmiştir. Tek bant elde edilemeyen çoklu bant gözlenen örnekler elemine edilmiş, nükleaz kontaminasyonu ve bulaş risklerine dikkat edilerek PCR optimize edilmiştir. PCR ürünleri Bio-basic EZ-10 spin kolon PCR purifikasyon kiti ile kit protokolüne uygun olarak aşağıda açıklandığı şekilde saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bio-basic EZ-10 spin kolon PCR purifikasyon kit ile PCR ürünlerinin saflaştırılması protokolü;

PCR ürünü 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp izopropanol eklenmiş Tampon çözelti B3'ten PCR ürün hacminin 5 katı hacminde eklenmiştir.

EZ-0 kolonuna hazırlanan karışım eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.

Kolon yeni tüpe aktarılıp 750 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiş ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir.

3.aşamadaki yıkama işlemi tekrarlanıp 10.000rpm'de yıkama tampon çözeltisi herhangi bir kalıntı kalmayacak şekilde santrifüjleme işlemi tekrarlanmıştır.

Kolon temiz 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 30-50 µl elution tampon çözelti eklendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiş ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek DNA elution aşaması tamamlanmıştır.

Saflaştırılan DNA çalışma aşamasına kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

Saflaştırma işleminden sonra nanodropla saflaştırılan ürünün kalitesine bakılmış ve jele yüklenmiştir. Jel görüntülemesinden sonra tek ve temiz bant elde edilen örneklerle işleme devam edilmiştir. Top 10 İnvitrogen kit protokolünde belirtildiği gibi;

Seçilen örnekler Top 10 Ligasyon mix ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur.

25µl Compotent cell + 5µl Ligasyon ürünü 5 dakika buzda bekletme + 42 °C'de 30sn + Buzda bekletme işlemleri yapılmıştır.

Daha sonra örneklerin üzerine 250 µl SOC ortamı eklenmiştir.

1 saat 37 °C'de 200rpm'de inkübe edilip ekim yapılmıştır.

37⁰'de 1 gece inkübe edilmiştir.

Koloni PCR ve Tek Koloni çizimi yapılmıştır.

Koloni PCR'da istenen bant büyüklüğünde sonuç veren örneklerle işleme devam edilmiştir.

Sıvı LB besi yerine ekilen tek kolonilerden alınan örnekler 37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra Plazmit ekstraksiyon kiti ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

Plazmit saflaştırılması yapılan örneklerde EcoRI ile enzim kesimi yapılmıştır.

37 °C’de inkübasyona tabi tutulmuştur.

% 1.5’lik jele yükleme yapılmış ve jel görüntülenmiştir.

Plazmit saflaştırılması yapılarak enzim kesim sonucuna bakılan ürünlerde beklenen bantlar elde edilen ürünler direkt sekansa gönderilmiştir. Sıvı LB besi yerinde çoğaltılan örneklerin bir kısmı Gliserol stok yapılarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (50) (Katalog no: 27104) kullanılarak kit protokolüne uygun olacak şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanmadan önce P1 tampon çözeltisine son konsantrasyon 100 µg / ml olacak şekilde RNase A eklenir. RNase A kullanımdan önce kısaca santrifüjlenmiştir. Hazırlanan buffer karıştırıldıktan sonra 2–8 °C’de saklanır.

PE Tampon çözeltisi kullanmadan önce %96–100’lük etanol eklenmiştir.

Tüm santrifüj aşamaları klasik mikrosantrifüjde 13,000 rpm (~17,900 x g)’de gerçekleştirilmiştir.

1 gece sıvı kültürde bekletilen 1–5 ml bakteri oda sıcaklığında (15–25 °C) 3 dakika > 8000 rpm’de (6800 x g) santrifüjlenerek pelet elde edilmiştir.

Kullanmadan önce PE Buffer’a ethanol (96–100%) eklenmiştir.

P2 ve N3 Buffer’ları kullanılmadan önce tabanda çökelti olup olmadığına bakılarak kontrol edilmiştir. Çökelti oluşmuş ise özellikle Buffer P2 fazla çalkalanmadan 37 °C’de ısıtılarak çözündürülmüştür.

P2 tampon çözeltisinin avadaki CO²’den asitleşmesini önlemek için kullanımdan hemen sonra P2 tampon çözeltisi içeren şişenin kapağı kapatılmıştır.

P2, N3 ve PB tampon çözeltisi iritanlar içerdiği için bu tamponları tutarken eldiven giyilmiştir.

Opsiyonel: Kit içerisinde sağlanan LyseBlue reaktifi Tampon P1’e eklenmiştir ve kullanmadan önce karıştırılmıştır. P1 Tampon çözeltisi için; son 1: 1000 seyreltme için şişe başına 1 şişe LyseBlue reaktifi kullanılmıştır (örn., 10 ml

P1 Tampon çözelti içine 10 µl LyseBlue). LyseBlue, optimum tampon karışımının görsel olarak tanımlanmasını sağlayarak, verimsiz hücre lizisine ve SDS'nin, genomik DNA'nın ve hücre kalıntılarının eksik çökmesine neden olan yaygın kullanım hatalarını önlemek için kullanılmıştır.

Elution Aşaması;

Elution tamponunun doğrudan QIAprep membran merkezine dağıtıldığından emin olunarak DNA'nın optimal elüsyonu sağlanmaya çalışılmıştır. Bir elüsyondan ortalama 50 µl tampon çözeltisi eklendiğinde son hacim 48µl (QIAprep santrifüj prosedürleri) ve bir 100 µl hacim elüsyon tampon çözeltisi eklendiğinde son hacim 60 µl (QIAprep multiwell prosedürleri) olarak elde edilmiştir.

Elution için su kullanıldığında, PH <7.0 olduğunda DNA verimini düşürebildiği için, pH değeri 7.0 ile 8.5 arasında ayarlanmıştır.

DNA ayrıca TE tamponunda (10 mM Tris · Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) çözdürülmüştür.

DNA'nın saflaştırılması

Peletlenmiş bakteri hücreleri 250 µl P1 bufferda eritilip, mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

RNase A'nın Tampon P1'e eklendiğinden emin olunmuştur. Sonra hiçbir hücre kümesinin görünmemesi için pelet yeniden süspanse edilmiştir.

LyseBlue reaktifi Tampon P1'e eklendikten sonra, kullanmadan önce LyseBlue parçacıklarının tamamen çözüldüğünden emin olmak için tampon şişesini kuvvetlice sallanmıştır. Bakteriler, hücre kümeleri kalmayana kadar vortekslenerek yada yukarı ve aşağı pipetlenerek tamamen yeniden süspanse edilmiştir.

250 µl Tampon P2 eklenmiş ve tüp 4–6 kez ters çevrilerek iyice karıştırılmıştır. Tüp ters çevrilerek yavaşça karıştırılmıştır. Vorteksleme genomik

DNA'nın kesilmesine ve plazmidin kontaminasyonuna neden olacağı için yapılmamıştır. Çözelti viskoz ve biraz berrak hale gelene kadar tüp alt üst edilerek çevrilmeye devam edilmiştir. Lyzis reaksiyonunun 5 dakikadan fazla sürmesine izin verilmemiştir.

LyseBlue Tampon P1'e eklendiğinde, hücre süspansiyonu eklemekten işleminden sonra maviye dönmüştür.

Tampon P2 karıştırma işlemi homojen renkli bir süspansiyonla sonuçlanıncaya kadar devam edilmiştir.

350 µl Tampon N3 eklenmiştir. Tüp 4–6 kez ters çevrilerek iyice karıştırılmıştır. Lokalize çökelmeyi önlemek için çözeltiyi Tampon N3 ekledikten hemen sonra iyice karıştırılmıştır. Büyük kültür hacimlerinde (örneğin, 5 ml) süre 10 kata kadar ters-düz çevirmeyi gerektirmiştir. LyseBlue reaktifi kullanılarak, süspansiyon, tüm mavi kalıntıları gidene ve süspansiyon renksiz olana kadar karıştırılmıştır. Homojen renksiz bir süspansiyon, SDS'nin etkili bir şekilde çökeldiğini göstermiştir.

Mikrosantrifüjde 13.000 rpm'de ($\sim 17.900 \times g$) 10 dakika santrifüjlenmiştir. Kompakt beyaz bir süpernatant oluşumu gözlenmiştir.

Adım 4'ten 800 µl süpernatant pipetlenerek QIAprep 2.0 Döndürme Kolonuna aktarılmıştır. 30–60 saniye santrifüjlenmiştir. Alta geçen akışkan kısım atılmıştır.

Önerilen: QIAprep 2.0 Döndürme Kolonunu 0,5 ml PB Tamponu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

30–60 sn. santrifüjlenmiştir. Alt kısım atılmıştır. Bu adım, endA + suşları kullanılırken eser nükleaz aktivitesini gidermek için gerekli olan bir aşamadır. XL-1 Blue gibi konukçu suşları ve DH5α'da bu ek yıkama adımı gerekmediği için yapılmamıştır.

0,75 ml Tampon PE eklenerek ve 30-60 saniye santrifüjlenerek QIAprep 2.0 Kolonu yıkanmıştır.

Alta geçen sıvı kısım atılmış ve kalan yıkama tamponunu çıkarmak için 1 dakika daha tam hızda santrifüjlenmiştir. Önemli: Bu ilave santrifüjlemeden önce sıvı kısım atılmadıkça kalan yıkama tamponu tamamen çıkarılmamıştır. Buffer PE'den kalan etanol, sonraki enzimatik reaksiyonları inhibe edebilmektedir.

QIAprep 2.0 Döndürme kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. DNA'yı elute etmek için, her QIAprep 2.0 Döndürme Kolonunun merkezine 50 µl EB Tamponu (10 mM Tris · Cl, pH 8.5) veya su eklenmiş, 1 dakika bekletilmiş ve 1 dakika santrifüjlenmiştir.





4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Turunçgil Arazi Alanları ile ilgili Gözlemler ve Örnek alımları**

Turunçgil viroidleri ile enfekteli bitki materyali temini için yapılan arazi çalışmalarında Adana, İçel, Hatay ve Osmaniye illerinden örnekler alınarak çalışılmıştır. Adana ilinden 190 Hatay'dan 80, Mersin'den 100 ve Osmaniye ilinden 15 örnek olmak üzere toplam 385 turunçgil örneği çalışmaya dahil edilerek incelenmiştir (Çizelge 4.1.) Çalışma kapsamında toplanan örneklerden 100 adedini mandarin izolatları, 100 adedini portakal izolatları, 120 adedini limon izolatları ve 65 adedini altıntop izolatları oluşturmuştur. Örneklerin alındığı bahçeler genel olarak damla sulamanın yapıldığı bahçe bakımının ve bitki beslemenin doğru yapıldığı modern bahçeler olarak gözlenmiştir. Bunun yanında 30 ve daha yukarı yaşlarda bazı bahçelerde vahşi sulama yapıldığı ve zaman zaman zamklanma hastalığı (*Phytophthora citrophthora*) ile yoğun bir şekilde bulaşık olduğu gözlenmiştir. Turunçgil örneklerinin toplandığı farklı turunçgil bahçelerinde yapılan simptomolojik gözlemler sonucunda ağaçların genel görünümlerinde bodurlaşmaların olduğu, sürgünlerde boğum aralarının kısaldığı ilk göze çarpan simptomlar olmuştur. Bodurluğun yanı sıra mandarin ağaçlarında aşı birleşme noktasından başlayarak ağacın üst kısımlarına primer dallarına kadar ilerleyen floem dokularında renk değişimi ve zamklanma simptomları ağaçlarda gözlenen diğer bir makroskobik simptom olmuştur (Şekil 4.1). Zamk oluşumları 20 yaş ve yukarı ağaçlarda daha yoğun olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.1. CCaVd'in mandarin bitkilerinin gövdelerinde oluşturduğu belirtiler, aşı noktasının üst kısmında floem dokularında zamlı çıkıntılar (A, B) ve bu çıkıntılara karşılık gelen odun dokusunda çukurluklar şeklinde oluşan belirtiler

CCaVd HSD'nin turuncgil varyantı olup turuncgillerde Gözenekleşme hastalığının etmenidir (Semancik ve ark., 1998a). Bu etmen farklı varyantlara sahip olup (CVdIIa, CVd-IIb, CVd-IIc) bu varyantlardan IIb ve IIc turuncgillerde zamklanma belirtisi oluşturmakta IIa varyantı ise non cachexia varyantı olarak adlandırılmakta ve turuncgil ağaçlarında zamklanma belirtisi geliştirmemektedir (Önelge ve ark., 2004). Arazide gözlenen zamklanma belirtilerinin CCaVd olduğu ve CVd-IIb ve CVd-IIc olabileceği düşünülmüş ve yürütülen moleküler çalışmalar sonucunda da bu kanı doğrulanmıştır.

Bazı viroid etmenleri özellikle de CEVd için karakteristik hastalık belirtisi olan anaçta kabuk kavlaması belirtisi örnek alımı için sörvey yapılan alanlarda fazla sayıda gözlenmemiştir. CEVd'nin kabuk kavlaması belirtisi üç yapraklı ve hibridlerinin anaç olarak kullanıldığı turuncgil plantasyonlarında gözlenen bir belirtidir (Duran Vila ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmada da örnek alımı gerçekleştirilen bütün iller'de turunc anacının turuncgil yetiştiriciliğinde kullanılan neredeyse tek anaç durumunda olduğu tespit edilmiştir. Ancak özellikle Adana ili turuncgil üretim alanlarında son yıllarda üç yapraklı ve hibridlerinin yoğun bir şekilde anaç olarak kullanımına başlandığı gözlemlenmiştir. Bölgede yapılan arazi çalışmaları sırasında C35 (*C. sinensis* Ruby ve *Poncirus trifoliata*) anaçlarında

CEVd'nin makroskobik simptomsu olan anaç'da kabuk kavlama simptomlarına rastlanılmıştır (Şekil 4.2). Kavlama simptomlarının gözlemlendiği bu anaçlar 8 yaş ve üzeri turunçgil ağaçlarıdır.



Şekil 4.2. Turunçgillerde 8 yaş ve üzeri ağaçların anaçları üzerinde CEVd'in oluşturduğu simptomlar; kavlama (A) ve bitki habitüsünde küçülme (B) simptomları

Çizelge 4.1. Turunçgil sorvey alanları ve alınan örnek sayıları

İli	İlçesi	Toplam Alan (da)	Toplam Üretim (ton)	Ağaç sayısı (Adet)	Survey Alanı (da)(%1)	Alınan Örnek	Enfekteli Örnek
Adana	Ceyhan	12248	13244	469242	122	35	22
	Karaisalı	1311	1533	52992	13	0	0
	Karataş	93400	181936	4147958	934	40	29
	Kozan	73810	109825	2024686	738	35	19
	Sarıçam	5025	9308	154900	50	0	0
	Seyhan	95230	292349	3106605	952	40	37
	Yumurtalık	13755	15724	514641	138	10	6
	Yüreğir	273104	622270	8064250	2731	30	20
	Çukurova	1157	1546	41530	12	0	0
	İmamoğlu	2061	10745	89546	21	0	0
	Toplam	571101	1258480	18666350	5711	190	133
Hatay	Altınözü	15	0	600	0	0	0
	Antakya	541	1266	16865	5	0	0
	Arsuz	36960	89798	1474900	370	13	11
	Defne	3937	6560	151050	39	0	0
	Dörtöyl	98000	216903	3759736	980	22	19
	Erzin	101680	326212	3549532	1017	29	18
	Hassa	0	107	4690	0	0	0
	Kırıkhan	710	613	15170	7	0	0
	Payas	4020	2556	124450	40	1	1
	Samandağ	33863	29114	753555	339	15	13
	Yayladağ	130	495	5200	1	0	0
	İskenderun	500	1574	13355	5	0	0
	Toplam	280356	675198	9869103	2804	80	62
Mersin	Akdeniz	58638	131747	1600966	586	10	7
	Anamur	4850	17477	182190	49	0	0
	Aydıncık	459	1249	21702	5	0	0
	Bozyazı	679	2185	24970	7	0	0
	Erdemli	107680	377013	3233700	1077	21	19
	Gülnar	207	498	5336	2	0	0
	Mezitli	18600	57949	612800	186	19	12
	Silifke	33967	85161	934000	340	7	6
	Tarsus	110368	496422	359582	1104	35	29
	Toroslar	4973	15076	164039	50	0	0
	Yenişehir	10444	42482	423474	104	8	5
	Toplam	350865	1227259	7562759	3509	100	78
Osmaniye	Düziçi	546	3168	32855	5	1	1
	Kadirli	800	2044	21924	8	1	1
	Merkez	2775	11326	130650	28	4	3
	Sumbas	4445	20605	178150	44	7	5
	Toprakkale	2380	8160	68066	24	2	2
	Toplam	10946	45303	431645	109	15	12
Genel Toplam		1213268	3206240	36529857	12133	385	285

Örneklerin toplandığı farklı turunçgil bahçelerinde yapılan simptomatolojik gözlemler sonucunda ağaçların genel görünümünde bodurlaşmaların olduğu, sürgünlerde boğum aralarının kısaldığı ilk göze çarpan simptomlar olmuştur. Turunçgil gözenekleşme hastalığı (CCaVd) ilk kez 1950 yılında Childs tarafından bulunmuş ve Latince kötü koşul anlamına gelen cachexia olarak adlandırılmıştır. Yürütülen sörvey çalışmalarında CCaVd için floem dokularında renk bozulmaları, kahverengileşme, zamlık oluşumları gözlenmiştir. Farklı turunçgil tür ve çeşitlerinde belirlenen bu simptomların aynı etmenin, CVd-II'nin farklı varyantları tarafından oluşturulduğu Reanwarakorn ve Semancik (1998) tarafından bildirilmiştir. Citrus Cachexia simptomsu oluşturmeyen varyantlar (CVd-IIa) üçyapraklı anacında ağaç gelişimini etkilemekte ve hafif kabuk çatlamlarına neden olabilmektedir (Duran-Vila ve Semancik, 2003). Turunç anacı üzerinde herhangi bir simptom oluşumu gözlenmeyen, Turunçgil gözenekleşme hastalığına neden olan CCaVd (CVd-IIb) varyantının ağaçların kalem kısımlarında gelişen simptomlara göre gözlem yapılarak örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Sörvey çalışmalarında özellikle mandarin ağaçlarında CCaVd'nin makroskobik simptomlarına yoğun şekilde rastlanılmıştır. Bu simptomlar örnek alımı için sörvey gerçekleştirilen tüm illerde (Mersin, Adana, Hatay, Osmaniye) belirlenmiştir. İlk olarak Kaliforniya'da Duran-Vila ve ark. (1988) tarafından varlığı bildirilen CBCVd (CVd-IV) turunçgil yetiştirilen ülkelerde en az gözlenen viroid olarak bildirilmiştir (Duran-Vila ve Semancik, 2003). Israil (Hadas ve ark.,1989) ve Türkiye'de (Önelge, 2000) aşılı ile taşınan bodurlaştırıcı faktör olarak bildirilen CVd-IV, tüm turunçgil çeşirlerinde simptomsuz olarak herhangi bir hastalık oluşturmada bulunurken (Duran-Vila ve Semancik, 2003) laym ve limonlarda kabuk çatlamları simptomları gösteren ağaçlar bölgemizde oldukça yoğun belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kütiken ve Meyer limon çeşitlerinde gövde ve sürgünde kabuk çatlama belirtileri

Pospiviroidae familyası *Apocaviroid* cinsi içinde tanımlanan CVD-V ilk olarak 2008 yılında *Atlantia citroides* bitkisine aktararak tanımlanmıştır (Serra ve ark., 2008). Daha sonra yapılan çalışmalarda etmenin birçok ülke ile birlikte Türkiye’de (Önelge ve Yurtmen, 2012), oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir. CVD-V’in başta portakal, mandarin, mandarin hibridleri, turunc ve kamkat olmak üzere pek çok turuncgil tür ve çeşidinde ve akraba türlerde bulunabildiği belirlenmiştir (Serra ve ark., 2008) ve bu etmenin tek başına turuncgil çeşitlerinde bulunmadığı diğer viroidlerle (CBLVd, CDVd) bir arada bulunma nedeni ile turuncgil çeşitlerinde geliştirdiği belirtilerin henüz bilinmediği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Serra ve ark., 2008, Hamdi ve ark., 2015). Gerçekleştirilen örnekleme çalışmalarında bu etmene özel belirtiler gözlenmemekle birlikte RT-

PCR çalışmalarında her iki etmenin varlığı pek çok ağaçta tespit edilmiştir. Bir diğer viroid etmeni olan CVd- VI (CVd- OS) ise ilk olarak Japonya’da yapılan bir çalışmada Ito ve ark. (2001) tarafından turunçgil bitkilerinde elde edilerek adlandırılmıştır. CVd-VI’nın CEVd, CVd-III ve CVd-IV ile benzer bir nükleotit dizilimine sahip olduğu ve büyük olasılıkla bu viroidlerin replikasyonu sırasında rekombinat olarak ortaya çıkan kimerik bir viroid olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Ito ve ark., 2001).

4.2.Şerbetçi Otu Yetiştiricilik Alanlarında Arazi Gözlemleri

Bu çalışmanın diğer bir bitkisel ürünü olan Serbetçiotu bitkilerinde bulunan viroid etmenlerinin araştırılması çalışması kapsamında Türkiye’de tek yetiştiricilik alanı olan Bilecik iline bağlı üretim alanlarında sörvey çalışması gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 1400 dekarlık alan gezilerek örnekler toplanmıştır (Çizelge 4.2) Bilecik üretim alanlarında başlıca dört çeşit; Erciyes, B.gold, Aroma, Ege çeşitleri olmak üzere 1400 da alanda üretilmektedir. Çalışma kapsamında bu üretim alanından viroidle enfekteli olabilecek 214 örnek toplanmıştır.

Çizelge 4.2. Şerbetçi Otu Survey Alanı ve Toplanan Örnekler

İlçe	Lokasyon	Survey alanı (da)	Alınan Çeşit	Alınan Örnek sayısı	Enfekteli örnek sayısı	
					HLVd	HSVd
Bilecik/Pazaryeri	Dereköy,	~ 410	Erciyes	40	29	14
Bilecik/Pazaryeri	Arapdede	~146	B.gold	20	11	5
Bilecik/Pazaryeri	Kınık	~116	Aroma	10	6	1
Bilecik/Pazaryeri	Merkez	~100	B.gold	24	13	6
Bilecik/ Pazaryeri	Küçükelmalı	~100	Aroma	25	13	9
Bilecik/ Pazaryeri	Fırınlr	~50	Ege	5	3	-
Bilecik/ Pazaryeri	Bulduk	~50	Erciyes	4	2	-
Bilecik/ Pazaryeri	Gümüşdere	~50	Ege	5	3	-
Bilecik/ Pazaryeri	Sarınc	~50	B. gold	5	3	-
Bilecik/ Pazaryeri	Günyurdu	~100	Erciyes	20	12	6
Bilecik/ Pazaryeri	Güde	< 10	B.gold	5	4	1
Bilecik/ Pazaryeri	Büyükelmalı	<10	Erciyes	4	3	2
Bilecik/ Pazaryeri	Ahmetler	<10	B.gold	4	2	-
Bilecik/ Pazaryeri	Karadede	<10	Ege	5	3	-
Bilecik/ Pazaryeri	Sarıdayı	<10	Aroma	6	5	3
Bilecik/ Pazaryeri	Alınca	<10	B.gold	4	2	-
Bilecik/Merkez	Alpağut	>50	B.gold	7	4	2
Bilecik/Merkez	Erkoca	>50	Erciyes	7	5	2
Bilecik/Merkez	Karaağaç	<10	Ege	5	3	-
Bilecik/Merkez	Çavuş	<10	Aroma	4	2	-
Bilecik/Merkez	Kınık	<10	B.gold	5	3	-
Toplam Survey Alanı:		~1400 da	Toplam Örnek	214	131	51

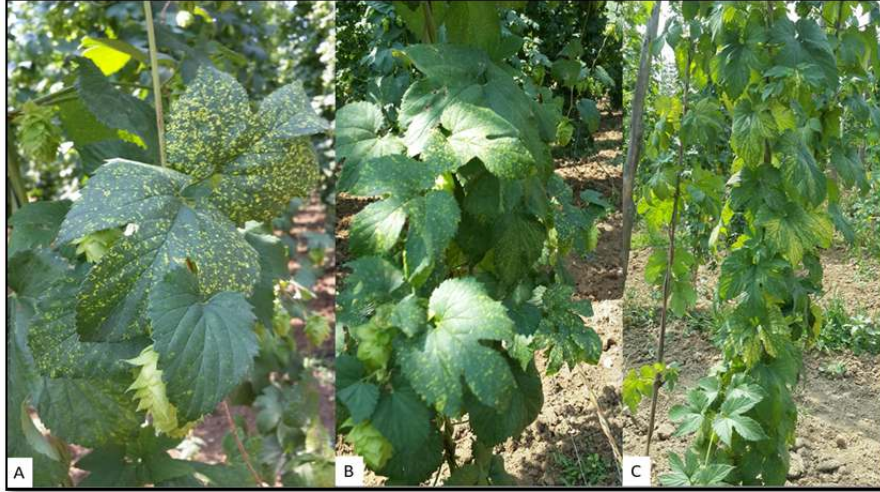
Toplanan 214 izolattan 75 adedi Erciyes, 74 adedi B.Gold, 45 adedi Aroma ve 20 adedi Ege çeşitleridir (Çizelge 4.2).

HSVd beş farklı bitki grubunu enfekte edebilen polifag bir etmendır. Etmen sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında, bağ alanlarında, sebzelerde ve turuncgillerde farklı varyant oluşturmakta ve farklı hastalık görünümleri yaratmaktadır. HSVd'nin ilk olarak şerbetçi otunda varlığı Japonya'da bildirilmiştir (Yamamoto ve ark.,1970). Bilecik ili şerbetçi otu yetiştiricilik alanlarında bu viroid ile ilgili ilk gözlemler etmenin bodurluk oluştuımasıdır. Viroidlerin genel bir özelliğı olan bodurlaşma semptomu HSVd için oldukça belirgindir. Sarılıcı bir bitki olan şerbetçi otu bu viroid ile enfektelendiğinde yarı boyuta ancak ulaşabilmektedir. Gezilen alanlarda görülen en belirgin semptom

etmenin bodurlaştırıcı etkisi olmuştur (Şekil 4.4.).Boğum aralarında kısılmanın normal gelişen bitkilere oranla çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yoğun olamamakla birlikte yapraklarda klorozlaşma,ve beneklenme belirtileri de gözlenmiştir (Şekil. 4.5).



Şekil 4.4. Şerbetçi otu bitkisinde görülen bodurlaşma (A), gövde yarılmaları (B) ve yaprak küçülmesi (C) belirtileri



Şekil 4.5. Şerbetçi otu bitkisinde görülen yoğun yaprak belirtileri; yaprak lekelenmesi (A, B) ve kloroz oluşumu (C) belirtileri

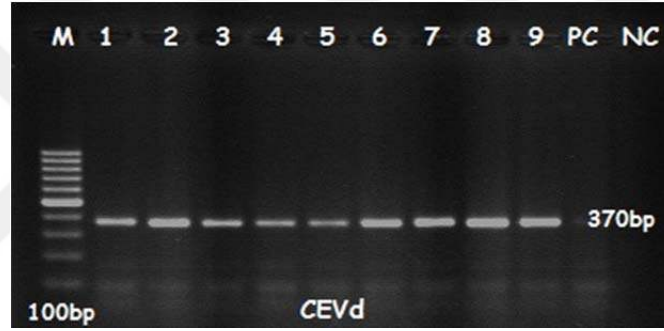
Bodur bitkilerde boğum aralarının oldukça kısa geliştiği gözlenmiştir. Bununla birlikte kozalaklar oldukça küçük gelişmekte ve önemli verim kayıplarına yol açmaktadır. Arazide gözlenen diğer bir simptom ise yapraklarda sararma ve kıvrılmalar olmuştur. Bazı bitkilerde geriye doğru kurumalar gözlenmiştir. *Hop latent viroid*'i ise şerbetçi otu üretim alanlarında belirlenen ikinci viroiddir. Latent olarak isimlendirilmesinin nedeni *Hop stunt viroidi* gibi belirgin simptonlar oluşturmaması ve bitkilerde latent formda yani simptomsuz olarak bulunmasıdır. Etmen yaklaşık %8 oranında önemli ölçüde verim kaybı oluşturmaktadır. Araştırma amacıyla gezilen şerbetçi otu alanlarında etmenle ilgili belirli bir simptom tablosuna rastlanmamıştır. Ancak genel olarak gezilen dikim alanlarında birtakım yetiştiricilik hatalarının yapıldığı özellikle bitkilerin yeterli beslenmediği gözlenen simptomlar arasındadır.

4.3.RT-PCR Çalışmaları ve Elde Edilen Bulgular

4.3.1.Turunçgil Viroidlerinin RT-PCR Çalışmaları İle Belirlenmesi

Çalışmada turunçgil viroidlerinin tanınması TNA ekstraksiyonu ve RT-PCR çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda portakal ve mandarinden 100er örnek, limondan 120 ve altıntoptan 65 örnek alınarak toplamda 385 örnek RT-PCR çalışmasına alınmıştır (Çizelge 4.3). Alınan örnekler yedi farklı viroid etmeni açısından incelenmiştir. Bu viroidlerden Turunçgil çeşitlerinde hastalık oluşturan iki etmen vardır. Bunlar Turunçgil exocortis viroidi ve turunçgil cachxia viroididir. CEVd turunçgillerde cüceleşme hastalığının etmenidir. Bulaşık olduğu ağaçlarda genel bir bodurluk oluşturmakla birlikte bir anaç hastalığı olup üçyapraklı ve hibridlerinde aşı birleşme noktasına kadar kabukta kavlama ve çatlamlar oluşturmakta ve bu oluşan çatlaklardan diğer bazı toprak kökenli patojenlerin giriş kapısını oluşturabilmektedir. Araştırma kapsamında ele alınan 385 örneğin 67 tanesinin yapılan RT-PCR çalışmaları ile CEVd etmeniyle bulaşık olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.3.'de görüldüğü gibi CEVd örneklemelerin gerçekleştirildiği bütün turunçgil türlerinde en fazla görülen etmendir. Tüm

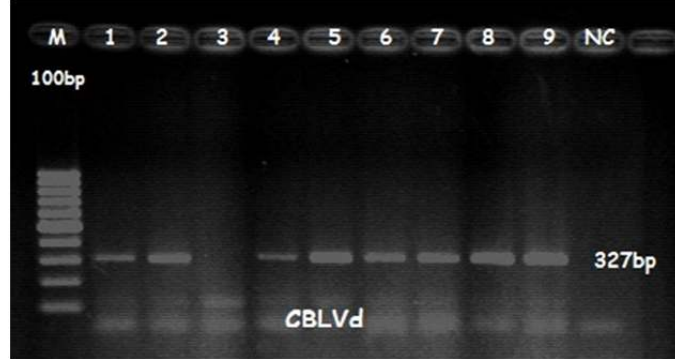
turunçgil viroidleri mekanik olarak aşı bıçakları ve budama aletleri ile bitki özsuyla bulaşıklığı nedeniyle kolayca mekanik olarak taşınabilmektedir (Roistacher,1991). Bu viroidler içinde mekanik olarak taşındığı en fazla belirtilen viroid CEVd'dir. Etmen tüm dünyada turunçgil yetiştirilen alanlarda yaygın olup mekanik taşınımı nedeniyle özellikle sertifikalı bitki yetiştiriciliğinin uygulanmadığı ülkelerde yaygın olarak bulunmaktadır. CEVd'i RT-PCR yöntemi ile kolayca saptanabilen bir etmendir. Etmen 371nt de sahip olup %2'lik agar jele oluşturduğu bant da aynı seviyededir. Şekil 4.6.'da. görüldüğü gibi CEVd farklı primer çiftleriyle belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 4.6. Mersin ilinden alınan turunçgil örneklerinde CEVd F/R primer çifti ile 371 nt büyüklüğünde çoğaltılan bölgenin agaroz jel görüntüsü. M: marker.1, 2, 3, 4: Washington navel çeşidi portakal örnekleri, 5, 6 satsuma mandarin örnekleri, 7, 8, 9: Meyer çeşidi limon örnekleri PC: pozitif kontrol, NC: negatif kontrol

Çalışmada kullanılan tüm primerler etmeni belirlemede etkili bir şekilde pozitif sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.4).

Turunçgil yaprak kıvrılma viroidi (CBLVd) özellikle Akdeniz ülkelerinde yaygın olan bir viroid etmenidir. Etmen 318-328 nt sayısına sahip olup yürütülen çalışmada da benzer olarak (Şekil 4.7) agar jelde 318 seviyesinde bant gelişimi göstermiştir. İncelenen örneklerden 33 tanesi CBLVd ile enfekteli olduğu RT-PCR çalışmalarında belirlenmiştir.



Şekil 4.7. CBLVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 327 nt seviyesinde çoğaltılan bölgenin agaroz jel görüntüsü. M: marker, 1, 2, 3, 4: Washington navel çeşidi portakal örnekleri, 5, 6 satsuma mandarin örnekleri, 7, 8, 9: Meyer çeşidi limon örnekleri PC: pozitif kontrol, NC: negatif kontrol

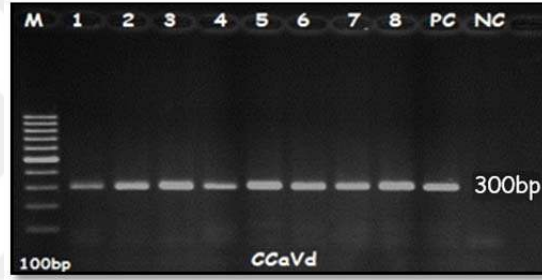
CBLVd'nin en fazla görüldüğü turunçgil çeşitleri limon portakal ve mandarin olmuştur (Çizelge 4.3). Etmen altıntop çeşidinde sadece 3 örnekte belirlenmiştir. Etmenin turunçgil viroidlerinin genel replikatör bitkisi olan etrog citron üzerinde yaprak da tek bir noktadan bükülme oluşturduğu bunun dışında turunçgil çeşitlerinde herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmediği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Calavan ve ark., 1964; Duran-Vila ve ark., 2009; Murcia ve ark., 2009; Wu ve ark., 2014; Vernière et al., 2002) . Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer olarak etmen etrog bitkisinde tek noktadan bükülme semptomu gerçekleştirmiş (Şekil 4.1) olup örnek alınan bitkilerde etmene ait herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.3. RT-PCR çalışması ile Turunçgil Viroidlerinin Belirlenmesi

Çeşit	Örnek Sayısı	CEVd	CBLVd	CCaVd	HSVd	CDVd (III)	CBCVd (IV)	CVdV	TOPLAM
Portakal	100	17	10	15	11	9	11	4	77
Mandarin	100	18	9	14	15	6	5	3	70
Limon	120	20	11	17	18	10	11	6	93
Altıntop	65	12	3	11	15	5	4	2	45
Topam	385	67	33	57	59	30	31	15	285

Turunçgil cachexia viroidi (CCaVd) mandarin ve hibridlerinde Turunçgil gözenekleşme hastalığını oluşturan ikinci viroid hastalığıdır. Hastalık ülkemizde mandarin ağaçlarında oldukça sık rastlanan, floem dokusunda renklenme kabukta zamklı çıkıntılara ve odunda buna karşı gelecek şekilde çöküntülere neden olan önemli bir hastalıktır (Şekil 4.1). Hastalık nedeniyle geriye doğru kurumalar ve önemli verim kayıpları oluşmaktadır.

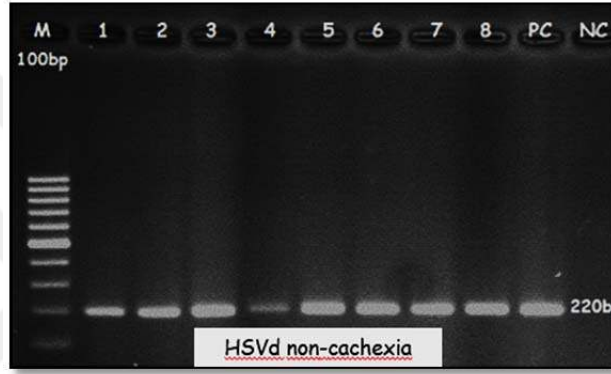
Toplanan 385 örneğin 57 tanesinin bu hastalık etmeni ile bulaşık olduğu RT-PCR çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Çizelge 4.3). Şekil 4.8’de görüldüğü gibi etmen %2’lik agaroz jelde yaklaşık 300nt seviyesinde bant vermiştir.



Şekil 4.8. CCaVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 300 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri. M: Marker, 1, 2, 3, 4: Adana iline ait mandarin örnekleri, 5, 6, 7, 8: Mersin iline ait mandarin örnekleri. PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

Yürütülen örnekleme çalışmasında toplanan 385 örnekten portakallar’da 15, mandarindenler’de 14, limonlar’da 17 ve altıntoplar’da 11 örnek olmak üzere toplam 57 örneğin bu hastalık ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). CCaVd HSVd’nin turunçgil varyantıdır (Reanwarakorn ve Semancik,1999). HSVd genel olarak turunçgil dışında şerbetçi otu bitkilerinde, taş çekirdekli bitkilerde, bağlarda bulunan farklı nukleotid dizilimine sahip varyantları bulunmaktadır (Sano,2003). HSVd turunçgillerde CCaVd varyantı dışında non-cachexia olarak adlandırılan diğer varyantları da içerecek şekilde bulunmakta ve enfeksiyon gerçekleştirmektedir. Yürütülen bu çalışmada non-cachexia primerleri

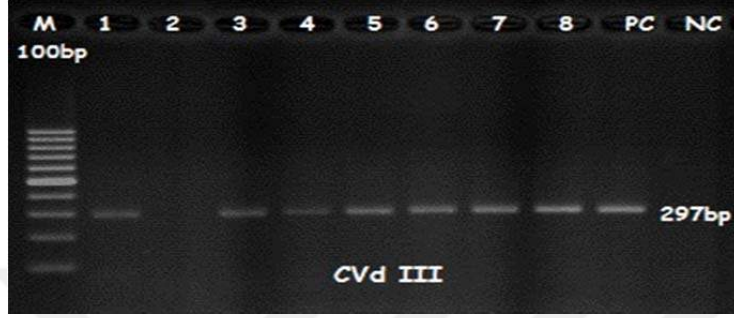
kullanılarak portakallarda 11,mandarinlerde 15,limonlarda 18 ve altıntoplarda 15 olmak üzere toplamda 59 örneğin non-cachexia varyantı ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3) HSVdnin noncachexia varyantı da CCaVd olduğu gibi yaklaşık 300nt (bp) seviyesinde jel üzerinde bant oluşturmuştur (Şekil 4.9.) Ayrıca kullanılan diğer bir primer ile noncachexia varyantı 220bp seviyesinde bant oluşturmuştur (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. HSVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 220 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri. M: Marker, 1, 2, 3, 4: Adana iline ait mandarin örnekleri, 5, 6, 7, 8: Mersin iline ait mandarin örnekleri. PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

Citrus dwarfing viroid (Turunçgil bodurluk viroid'i; CDVd) etmeni Dünya'da turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı bazı ülkelerde bodur turunçgil yetiştiriciliğinde kullanılan bir viroid etmenidir. Etmen turunçgillerde genel bir bodurluk oluşturmakta olup yine bodurluk oluşturan diğer bir viroid olan CEVd gibi herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmeyen bir viroid etmenidir (Eiras et al., 2013). Günümüzde bodur turunçgil yetiştiriciliğinde farklı yöntemlerden biri de CDVd'nin gen aktarımı ile turunçgil tür ve çeşitlerine aktarılması ve özellikle bitki koruma uygulamalarının kolaylığı yönünden tercih edilen bununla birlikte birim alandan elde edilen ürün artışıyla yetiştiricilik açısından avantajlar sağlayan bir

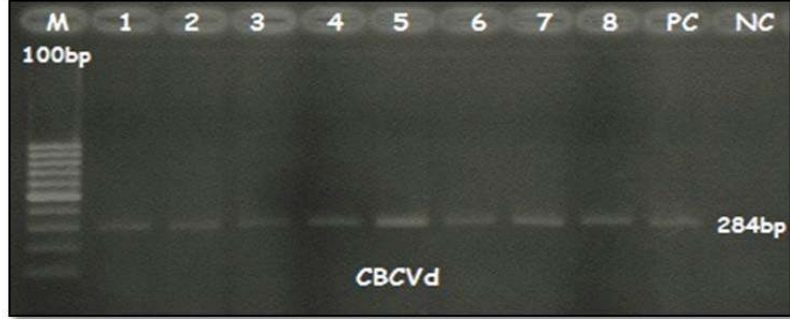
üretim biçimidir (Gonzatto ve ark.,2022). Çalışmada incelenen 385 örneğin 30 tanesi (Çizelge 4.3.) CDVd ile enfekteli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. CDVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 297 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri. 1, 2, 3, 4, 5 nolu örnekler portakal izolatları 6, 7, 8 nolu örnekler mandarin izolatları. M: markör, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

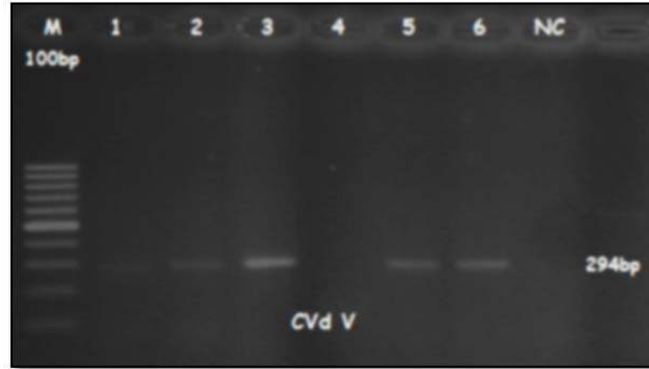
CVd IV herhangi bir hastalık oluşturmeyen ve dünyada yaygın olarak bulunmayan ancak Akdeniz bölgesi turunçgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda daha yaygın bulunan viroid etmenidir. Etmen *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd, CVd IV) turunçgillerde hafif bodurluk oluşturduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Khoo ve ark.,2017). Etmen özellikle limonlarda kabuk çatlaklığı oluşturmaktadır (Şekil 4.3).

Bu çatlamlar genellikle limonun hızlı büyümesinden kaynaklandığı düşünülse de yürütülen çalışmalarda çatlamlara CBCVd'inin neden olduğu ortaya konmuş ve CVd IV olarak bildirilen isimlendirilme CBCVd olarak değiştirilmiştir (Cao ve ark., 2010). CVd IV son yıllarda bildirilen yeni bir viroid etmeni olup turunçgil bitkilerinin genel replikatör bitkisi olan etrog citronda epinasti belirtileri oluşturan bir viroid etmenidir. Çalışmada incelenen 385 örneğin 31 tanesinde CBCVd varlığı belirlenmiştir. Etmen portakal ve limon örneklerinden 11 tanesinde belirlenirken mandarinlerde 5 altıntoplarda ise 4 örnekte belirlenmiştir (Çizelge. 4.3). Etmen için kullanılan primer çifti ile yapılan PCR sonucunda 284 bp seviyesinde bant oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. CBCVd F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 284 nt seviyesindeki oluşturduğu bant görüntüleri. M: markör, 1, 2, 3, 4 nolu örnekler Mersin limon izolatları 5, 6, 7, 8 nolu örnekler Adana limon izolatları. PC: Pozitif kontrol NC: Negatif kontrol

CVd V son yıllarda bildirilen yeni bir viroid etmeni olup turunçgil bitkilerinin genel replikatör bitkisi olan etrog citronda epinasti belirtileri oluşturan bir viroid etmenidir. Çalışmaya alınan örneklerden 15 tanesinde CVd V etmeninin varlığına rastlanılmıştır (Çizelge 4.3). Etmen açısından yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda 294 bp büyüklüğünde bant oluşumu elde edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. CVd-V'in F/R primer çiftleri ile turunçgil örneklerinde 300 nt seviyesindeki oluşturduğu bant görüntüleri. M: markör, 1, 2, 3 Mersin limon izolatları, 5, 6 Mersin portakal izolatları. NC: negatif kontrol.

Genel olarak Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil alanlarını viroid hastalıkları ve turunçgil viroidleri açısından değerlendirecek olursak RT-PCR çalışmaları ile yürütülen araştırmada örnek alınan 385 izolattan 285 adedinin viroidlerle enfekteli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Yüzde olarak izolatların %74'ünün viroid etmenleri ile enfekteli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalara baktığımızda Çukurova bölgesinde CEVd ve CCaVd'nin yanı sıra CBLVd, CDVd, CBCVd, CVd-V'in viroidlerin varlığını ortaya koymuşlardır (Önelge,1994; Önelge ve ark.,2000; Önelge, 2007). Yine yürütülmüş bir çalışmada mandarinlerin %37 oranında CCaVd ile enfekteli olduğunu belirlemiştir (Güllü, 1989).

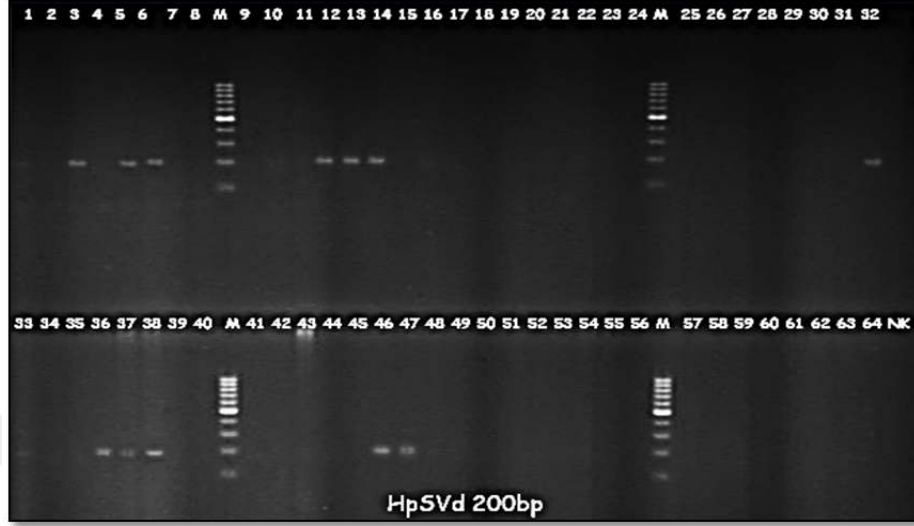
Turunçgil viroidleri dünyada turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm ülkelerde varlığı bildirilmiş olan etmenlerdir. Bu etmenlerden özellikle ikisinin (CEVd ve CCaVd) hastalık oluşturmaları, diğer turunçgil etmenlerinin ise henüz herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmediği günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Hadidi ve ark., 2003). Bu etmen grubunun bölgemizde bu kadar yaygın olmasının nedeni ülkemizde birçok çalışmaya rağmen henüz hastalıklara karşı testlenmiş sertifikalı bitki turunçgil fidanı yetiştiriciliği ve kullanımının olmamasıdır. Üretimde dünyada 8 sırada yer almamız ve günümüzde en fazla rekabet ettiğimiz İspanya üretimine yetişmemize rağmen sertifikalı üretimimiz henüz gerçekleşmemiştir. Bu ülkemiz açısından büyük bir eksiklik olup viroid etmenlerinin ve bazı virüs hastalıklarının bölgemizde bu kadar yaygın olarak bulunmasının başlıca nedenidir. Bölgemizde diğer bir sorun ise budama yapılırken özellikle limonda obur dal ve diğer turunçgil çeşitlerinde kuru alma ve şekil verme işlemleri sırasında yeterli hijyen koşullarına uyulmaması ve mekanik olarak kolayca bitki özsuyla taşınabilen viroid grubu patojenlerin turunçgil ağaçlarına bulaşmasıdır.

4.3.2.Şerbetçi Otu Viroidlerinin RT-PCR Çalışmaları ile Belirlenmesi

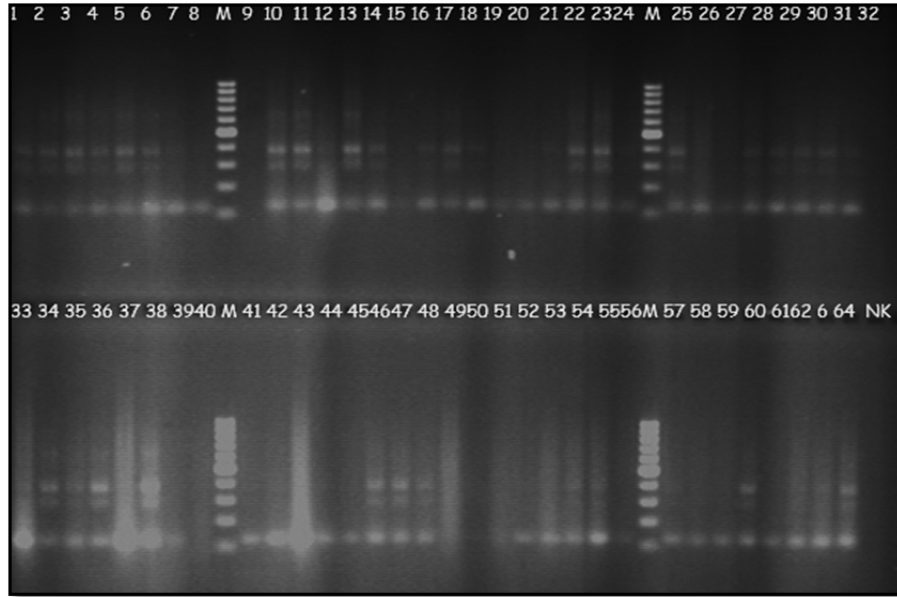
Serbetçi otunda bulunan viroidlerin belirlenmesi amacıyla yürütülen RT-PCR çalışmasında 4 serbetçi otu çeşidinden toplam 214 örnek toplanarak incelenmiştir. Toplanan izolatlarda *Hop stunt viroid* (HLVd) ve *Hop latent viroid* (HSVd)'lerinin varlığı araştırılmıştır (Çizelge 4.2). Bilecik ilinde en fazla yetiştirilen iki serbetçi otu çeşidinden Erciyes çeşidinden 75, B gold çeşidinden ise 74 örnek alınmıştır. Bu iki çeşitte bulunan viroidlere baktığımızda Erciyes çeşidinde 51 izolatta HLVd, 24 izolatta ise HSVd etmenleri belirlenmiştir. Yetiştirilen diğer çeşitler olan Aroma ve Ege çeşitlerinden gerçekleştirilen RT-PCR çalışmalarında ise Aroma çeşidinde 26 izolatta HLVd, 13 izolatta ise HSVd (Çizelge 4.4) belirlenmiştir. Ege çeşidinde 12 izolatin HLVd ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Tolamda 214 izolatin 131 tanesi HLVd ile 51 izolat ise HSVd ile enfekteli bulunmuştur (Şekil 4.13 ve 4.14). Çalışmada ele alınan viroid izolatları genel anlamda karışım halinde bulunduğu her iki viroid etmeninin bir arada bulunduğu izolat sayısının ise 39 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. RT-PCR yöntemi ile şerbetçi otu'nda bulunan viroidlerin belirlenmesi

Çeşit	Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı		
		HLVd	HSVd	Mix Enfeksiyon
Erciyes	75	51	24	19
B. Gold	74	42	14	11
Aroma	45	26	13	9
Ege	20	12	0	0
Toplam	214	131	51	39



Şekil 4.13. Bilecik ili Şerbetçi otu örneklerinde HSVd F/R primer çiftleri ile 200 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri. M: Markör, NK: Negatif Kontrol, 1...64: Şerbetçi otu örnekleri



Şekil 4.14. Bilecik ili Şerbetçi otu örneklerinde HLVD F/R primer çiftleri ile 260 ve 360 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri. M: Markör, NK: Negatif Kontrol, 1...64: Şerbetçi otu örnekleri

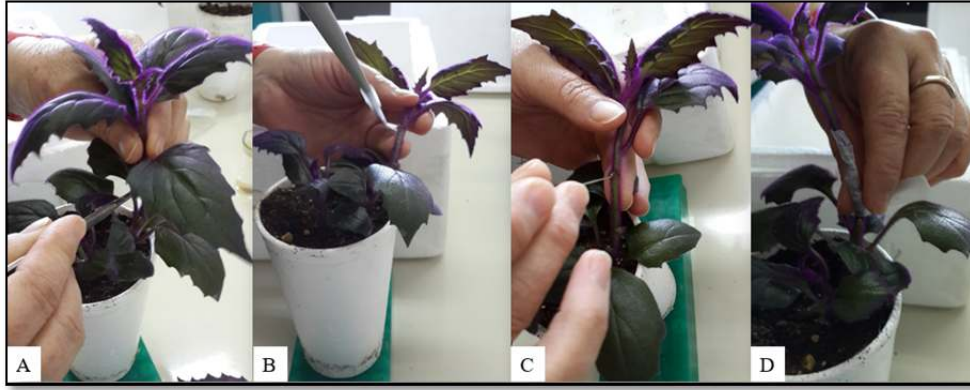
HSVd varyantları beş filogenetik gruba ayrılmıştır; Bunlar 1) erik (erik-şeftali-badem-kaysı) grubu (Plum) 2) şerbetçi otu (-asma) grubu (Hop), 3) turunçgil cachexia grubu (Citrus), 4) erik-turunçgil grubu (P-C) 5) erik/şerbetçi otu/turunçgil 3 (P-H/cit3) grubudur (Ragazzino ve ark., 2004). Etmenin ilk olarak şerbetçi otu bitkilerinde saptanması nedeniyle bu isim verilmiştir. Şerbetçi otu cücelik viroidi şerbetçi otunda boğum aralarının kısa olmasına dolayısıyla bodur bitkilerin gelişimine neden olmaktadır. Dolayısı ile verim kayıplarının oluşmasına neden olmaktadır. Etmen dünyada şerbetçi otu yetiştiricilik alanlarında yaygın olarak bulunan bir patojendir (Sasaki ve Shikata, 1980, Radisek ve ark., 2012). Şerbetçi otunda saptanan ikinci viroid etmeni ise HLVd'dir. Etmen 255-256 nt seviyesinde bant oluşturmaktadır. Etmenin şerbetçi otu bitkilerinde herhangi bir belirti oluşturmaması nedeni ile latent olarak adlandırılmıştır. Ancak şerbetçi otu bitkilerinde koza gelişiminde ve içeriğinde farklılıklar geliştirdiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Patzak ve ark., 2001) RT-PCR analizleri sonucunda şerbetçi otu bitkilerinde HLVd'nin daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Şerbetçi otu ile yapılan çalışmalarda HLVd'nin benzer şekilde dünyada şerbetçiotu üretim alanlarında da daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Barbara ve Adams, 2003; Eastwell ve Nelson, 2007) Yürütülen bu çalışmada her iki viroid de benzer seviyelerde bant oluşumu gözlemlenmiş ve ayrıca sekans sonuçlarında bu viroidlerin varlığını kanıtlamıştır. Her iki viroidin varlığı ülkemiz için ilk rapor olarak bu çalışma ile bildirilmiştir.

4.4.Biyolojik indeksleme ile ilgili Bulgular ve Tartışma

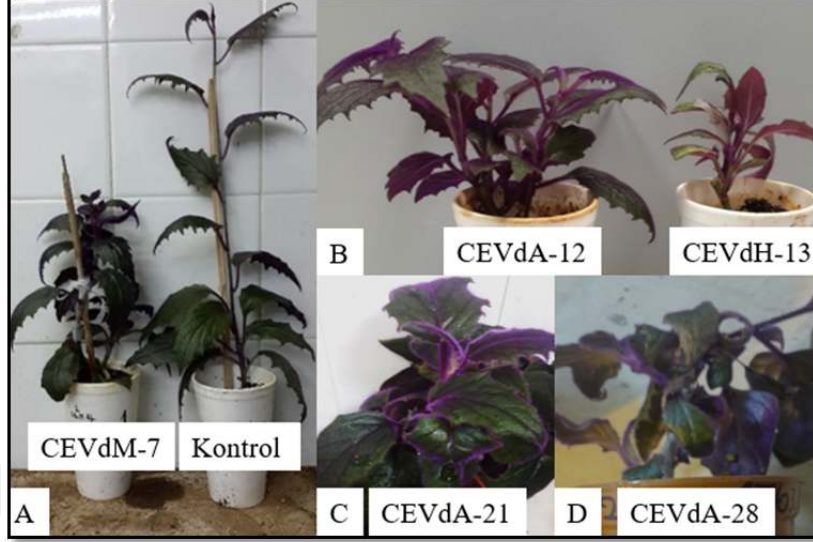
4.4.1.Turunçgil ve şerbetçi otu viroidlerinin indikatör bitkilere aktarılması

Sörvey çalışması ile toplanan örneklerden RT-PCR çalışması sonucunda pozitif bulunan 10 izolat biyolojik indeksleme çalışmasına alınmış ve çalışma kapsamında moleküler çalışmalar bu yöntemle de doğrulanmıştır. CEVd'nin farklı izolatlarının belirlenmesi amacıyla seçilen izolatlarda mor yaprak bitkilerine (*Gynura aurantiaca*) gövdeya açılan yara dokularından saflaştırılmış viroid

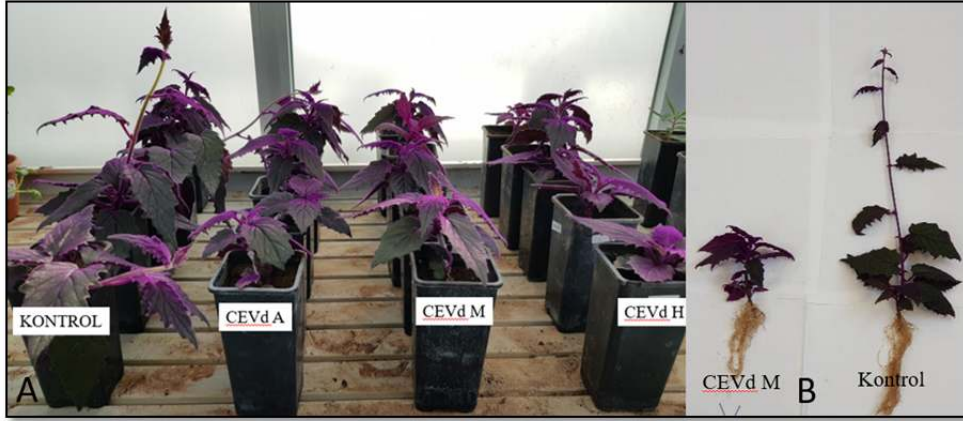
RNA'larının aktarılması işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15). Turunçgil ağaçlarından elde edilen TNA örnekleri 1 / 1 oranında TKM buffer ile seyreltilerek iğne yardımıyla gövdeye çizik atma şeklinde mekanik olarak inokule edilmiştir. Uygulamadan sonraki iki ay boyunca bitkilerin gelişimleri takip edilmiştir. Mor yaprak bitkilerinde yapılan gözlemlerde, boğum aralarının kısalması, dolayısı ile kontrol bitkilerine oranla daha bodur bitki gelişimi ve yaprak epinastisi belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.16). Ayrıca enfekteli bitkilerin kök hacimleri daha az gelişmiştir (Şekil 4.17). İnokule edilen tüm bitkilerde bu belirtiler, farklı oranlarda gözlenmiştir.



Şekil 4.15. CEVd'i ve ırklarını ayırt etmek için *Gynura aurantiaca* (Mor yaprak) indikatör bitkisine purifiye edilmiş viroidlerin bulaştırılması işleminin aşamaları. A: Bistüri ucu ile uygulama yapılacak kısımdaki yaprakların temizlenmesi, B: Purifiye edilmiş RNA'nın mikropipetle gövde üzerine bırakılması, C: İğne ucu yardımı ile RNA'nın tüm gövdeye yara dokusu açılarak yayılması ve D: Yara dokusunun üzerinin parafilm ile kapatılması



Şekil 4.16. *Gynura aurantiaca* bitkilerine CEVd'inin seçilen izolatlarının (CEVdM-7, CEVdA-12, CEVdH-13, CEVdA-21, CEVdA-28) bulaştırma işleminden 2 ay sonra gözlenen semptomlar. Bodurluk (A, B, C, D) ve yaprak epinasti semptomları (B, C, D)



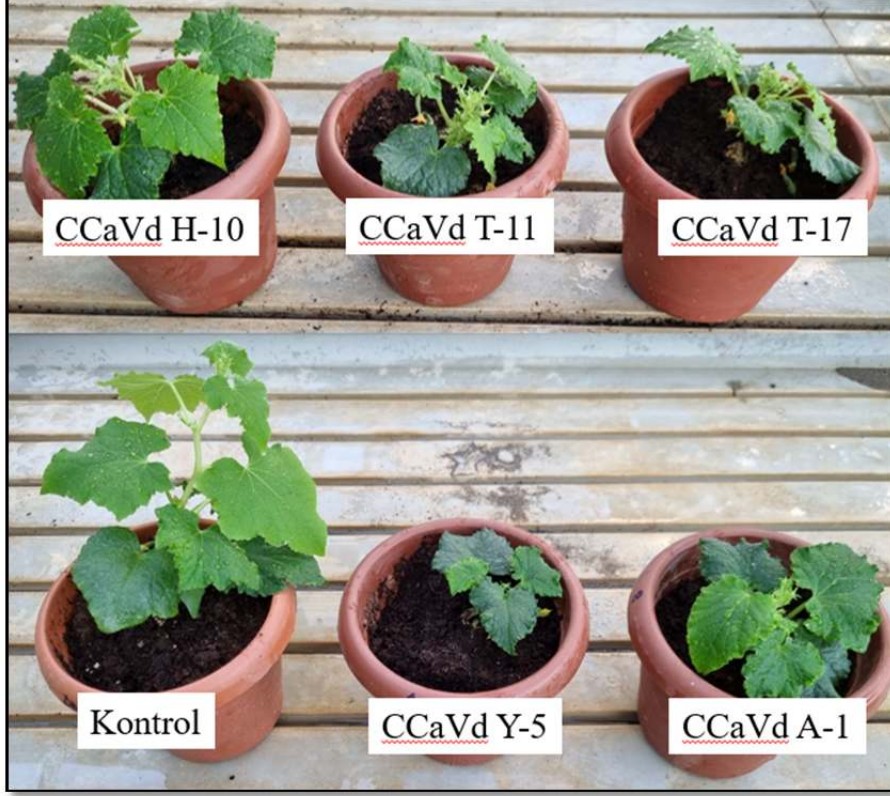
Şekil 4.17. *Gynura aurantiaca* bitkilerinde CEVd izolatlarının (CEVd-A (Adana), CEVd-M (Mersin), CEVd-H (Hatay)) bulaştırmadan 2 ay sonar gösterdikleri bitkisel gelişim farklılıkları. (A) Kontrol (Su) ve CEVd izolatlarının uygulandığı bitkilerde gözlenen bodurluk ve (B) CEVd-M (Mersin) izolatu ve Kontrol uygulamasında bitki gövde ve kök hacmi farklılıkları

Mor kadife bitkisinin turunçgil viroid etmenlerinden sadece CEVd'i replike etmesi ve bu viroidi diğer viroidlerden ayırmada oldukça başarılı bir indiktor bitki olduğu bu çalışma ile de ortaya konmuştur. Daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda mor kadife bitkisinin CEVd için iyi bir replikatör bitki olduğunu belirtmişlerdir (Weathers ve Greer, 1967; Semancik ve Vanderwoude, 1976; Rodriguez ve ark., 1978; Wahn ve ark., 1980; Flores ve Rodriguez, 1981; Roche ve ark., 1986; Skoric ve ark., 2001; Hadidi ve ark., 2003).

Turunçgillerden genelde karışık enfeksiyon halinde elde edilen HSVd izolatlarının tek olarak elde edilebilmesi amacıyla HSVd'in replikatör bitkisi olan hıyar bitkilerine seçilen izolatların purifiye edilmiş RNA'ları insülün injektörü yardımıyla aktararak inokulasyonu gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonu takip eden 21. günde aktarmanın başarılı olup olmadığı moleküler olarak teyit edilmiş ve 2. ayda gelişim gözlemleri farklılıkları ile ilgili gözlemler yapılmıştır (Şekil 4.18, Şekil 4.19). Hıyar bitkilerinde şiddetli bodurluk, boğum aralarında kısıalma ve kloroz oluşumu gözlenen başlıca belirtiler olmuştur. Hıyar bitkisinin HSVd'nin özelliklerini karakterize etmede anahtar olarak kullanılabileceğini Sasaki ve Shikata, (1977) yürüttükleri çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışmada farklı HSVd izolatları uygulanan bitkilerde farklı oranlarda belirtiler gelişimleri gözlenmiştir. Duran-Vila ve Semancik (2003) belirttiği gibi CCaVd'nin de içinde olduğu tüm CVd-II varyantları hıyarda bodurluk ve yaprak buruşukluğu belirtilerine neden olurken, Etrog citron'da değişen oranlarda; şiddetli ve/veya çok hafif belirtilere neden olabilmektedir. Ancak sadece cachexia'ya neden olan varyantlar 'Parson's Special' mandarini ve Minneola Tangelo'da belirtiler oluşturmaktadır.



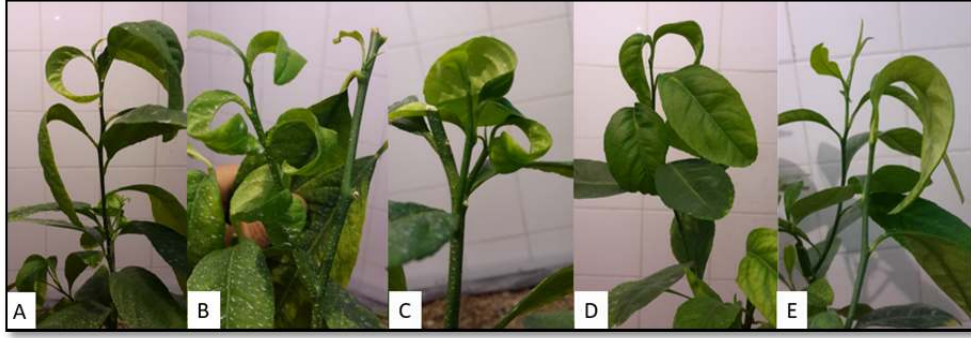
Şekil 4.18. Hıyar bitkisine turunçgillerden elde edilen HSVd'in farklı izolatlarının uygulanması (A) ve gözlenen belirtiler. Kontrol grubu (B), uygulamadan 21 gün sonra bitkilerde gözlenen kloroz (C) ve bodurluk (D) belirtileri



Şekil 4.19. Hıyar bitkisine uygulanan turunçgil HSVd izolatlarının (CCaVdH-10, CCaVdT-11, CCaVdT-17, CCaVdY-5 ve CCaVdA-1) oluşturduğu şiddetli bodurluk belirtileri

Etrog citron bitkisi tüm turunçgil viroidlerinin genel replikatör bitkisi olup bu çalışmada da viroidlerin aktarımında kullanılmıştır. Seçilen 10 izolatın TNA'leri Etrog citron bitkilerine mor kadife bitkilerinde olduğu gibi 1/1 oranında TKM ortamı ile sulandırılarak gövde çizme yöntemi ile aktarılmıştır. Mekanik inokulasyonda sıkça kullanılan gövde çizme yöntemi viroidlerin indikatör bitkilere aktarımında oldukça başarılı olmuştur. Mekanik aktarma işleminden yaklaşık 2 ay sonra etmenlerin oluşturduğu belirtiler gözlenmeye başlamıştır. Mekanik inokulasyondan 2 ay sonra moleküler olarak turunçgil viroidlerinin aktarıldığının teyidi yapılmış ve simptomatolojik gözlemler alınmıştır. Aktarım yapılan tüm

Etrog citron bitkilerinde genel bodurluk, boğum aralarının kısalması, yaprak epinastisi gözlenen başlıca belirtiler olmuştur. Şiddetli belirtileri geliştiren bitkilerde bir diğeri belirtili ise yaprak arka yüzeyinde oluşan damar nekrozları olmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkisi üzerinde oluşturduğu belirtiler. Yaprak epinastisi (A, B, C), yaprak düşüklüğü (D, E), boğum arası kısalığı (B, C) belirtileri

Gelişen bu belirtiler tüm turunçgil viroidlerinin genel belirtileridir (Roistacher ve ark.,1993). Gözlenen bu belirtiler bazı izolatlar için şiddetli bazıları için ise daha hafif gelişmiştir. Bunun nedeni inokule edilen izolatların nükleotid dizilimlerindeki farklılıklar olabilir. Viroid grubu etmenlerinin genetik yapısında patojenik bölgedeki nükleotid değişimlerinin patojenin belirtileri gelişiminde farklılıklar yarattığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Semancik ve ark.,1997; Ito ve ark., 2001). Elde edilen sekans sonuçlarından yapılan blast analizleri ile de bazı nükleotid farklılıklarının sekanslarda yer aldığı ve benzerliğin %96-98 aralığında olduğu belirlenmiştir. Etrog citron bitkilerinde gözlenen diğeri belirtili ise yaprak düşüklüğü belirtili (Şekil 4.21B). Mekanik olarak aktarılan bitkilerde gözlenen bu belirtili CDVd (CVd-III) tarafından oluşturulduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Roistacher et al.1993; Eiras ve ark., 2013).



Şekil 4.21. Turunçgil viroidlerinin Etrog citron bitkilerinde oluşturduğu yaprak epinastisi (A) ve yaprak düşüklüğü symptomu (B)

CDVd (CVd III) ile enfekteli bitkilerde yaprağın alt kısmında gözlenen orta damar nekrozu bazı izolatlar için hafif (Şekil 4.22 A), bazı izolatlar için şiddetli symptom gelişimi (Şekil 4.22 B) olarak gözlenmiştir. Bunun nedeninin inokule edilen izolatların nükleotid dizilimlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Murcia ve ark. (2009)'nın *Citrus dwarfing viroid* (CVdIII)'in bodurluk üzerine etkisini incelemek için, farklı şiddette symptom gösteren varyantları ile yaptıkları çalışmada, Etrog citronda oluşan symptomlar bodurlaşma özellikleri ile iyi bir korelasyon göstererek bitki boyutunu küçültmüştür. Ancak, CVd III varyantları ile enfekteli bitkilerde CVd IIIa ve CVd IIIb varyantlarında yoğun epinasti gözlenirken (Şekil 4.21 A), CVd IIIc ile enfekteli bitkilerde daha hafif symptomlar gözlendiği belirlenmiş, ayrıca tüm varyantlarda ortak symptom olarak yaprak sapı ve yaprak orta damarı boyunca uzanan orta damar nekrozunun varlığı belirlenmiştir. Murcia ve ark., (2009) ticari olarak üretim yapılacak alanlarda bitki boyutunu control etmek amacıyla bu etmenin kullanılabilmesi için

anaç/kalem kombinasyonlarında simptom gözlemlerinin daha uzun süre yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4.22. Turuncgil viroidlerinin Etrog citron bitkilerinde yaprağın alt kısmında oluşturduğu hafif (A, B) ve yoğun orta damar nekrozu (C,D)

Citron bitkilerinde gözlenen diğer bir belirti ise yaprağın tek noktadan bükülmesi (Şekil 4.23 A ve B) simptomudur. Bu belirtiyi turuncgil viroidlerinde CBLVd (CVd-I)'i oluşturmaktadır. Bu belirtiyi seçilen izolatlardan 4 tanesi geliştirmiştir. CBLVd bugüne kadar herhangi bir patojenle ilişkilendirilmemiştir (Calavan ve ark.,1964; Duran-Vila ve ark., 2009; Murcia ve ark.,2009; Wu ve ark.,2014; Vernière et al., 2002). Etrog citron bitkilerinde gözlenen viroid belirtilerinden seçilen izolatlarda viroidlerin bir karışım halinde bulunduğunun diğer bir kanıtı olmuştur.

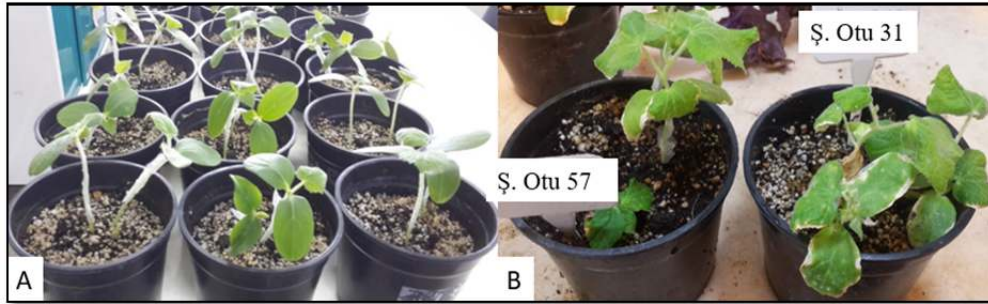


Şekil 4.23. CBLVd etmeninin Etrog citron bitkilerinde oluşturduğu yaprağın tek noktadan bükülmesi symptomu (A, B)

Çalışmada şerbetçi otu bitkilerinden elde edilen viroidlere (HSVd ve HLVD) ait 10 izolatin biyolojik indekslenmesinde hıyar ve lif kabağı bitkileri indikatör bitki olarak kullanılmıştır. İnokulasyondan yaklaşık 4-5 hafta sonrasında bitkilerde boğum arası kısalığı ve bodurlaşma symptomları gözlenmeye başlamıştır (Şekil 4.24, Şekil 4.25). Seçilen 10 izolattan 7 tanesinde her iki indikatör bitkide de şiddetli bodurluk symptomları gözlenmiştir. Yapraklarda küçülme ve hafif kloroz belirtileri her iki indikatör bitkide de gözlenen symptomlar olmuştur (Hadidi ve ark.,2003). Elde edilen bulgular literatürde araştırmacılar tarafından bildirilen symptomlarla benzerlik göstermektedir (Reanwarakorn & Semancik, 1998; Marquez-Molins ve ark., 2020). Negatif kontrol olarak sadece TKM tampon çözeltisi uygulanan bitkiler ise normal gelişimlerini sürdürmüşlerdir (Şekil 4.24, 4.26).



Şekil 4.24. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd ve HLVd izolatlarının lif kabağı bitkilerine uygulanması (A, B) ve oluşturdukları bodurluk belirtileri (C, D) ve Kontrol bitkisi (E)

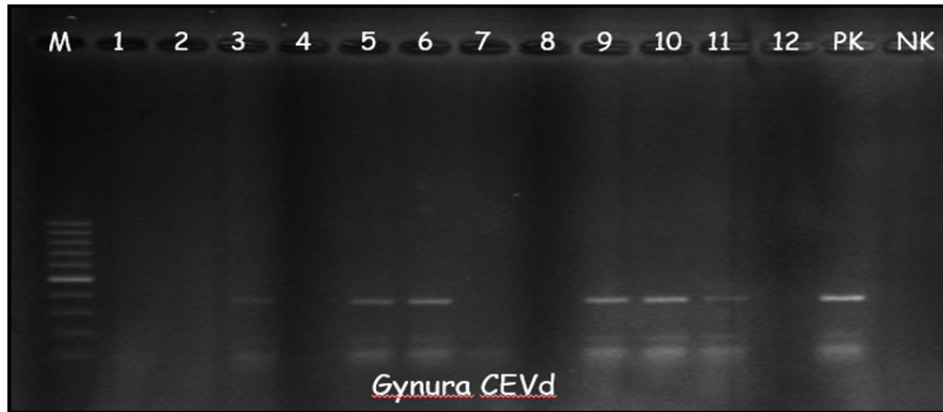


Şekil 4.25. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd izolatlarının (Şerbetçiotu 31 ve 57 nolu izolatların) hıyar bitkilerine uygulanması (A) ve oluşturdukları bodurluk belirtileri (B)

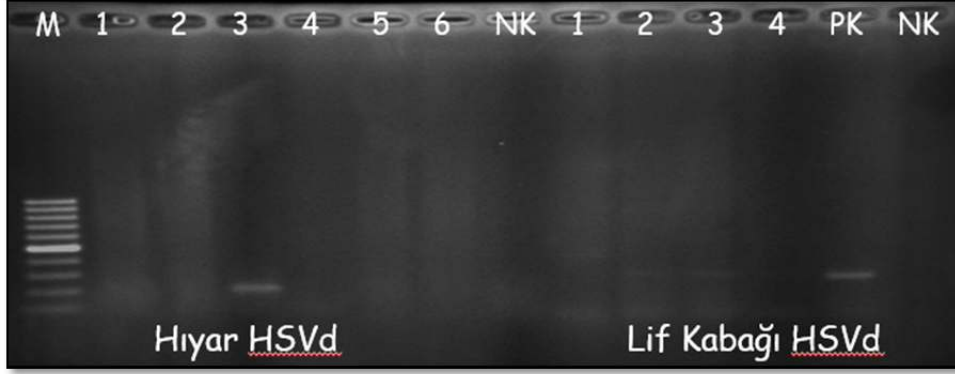


Şekil 4.26. Şerbetçi otundan elde edilen HSVd izolatlarının hıyar bitkilerinde oluşturduğu belirtiler. Boğum arası kısalığı (D) ve bodurlaşma belirtileri (B ve C) ve Kontrol bitkisi (A)

Otsu indikatör bitkilere aktarma işlemini takip eden 21. günde örnekleme yapılmış ve CEVd (Şekil 4.27), HSVd (Şekil 4.28) etmenlerine spesifik primerlerle yapılan RT-PCR sonuçlarına ait jel görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.27. *Gynura aurantiaca* indikatör bitkilerinden alınan örneklerde CEVd için yapılan RT-PCR sonuçlarına ait jel görüntüsü



Şekil 4.28. Hıyar ve Lif kabağı indikatör bitkilerinden alınan örneklerde HSVd F/R primer çifti ile çoğaltılmış gen bölgesinin 220 nt seviyesinde oluşturduğu bant görüntüleri

4.5. Viroidlerin Turunç Üzerine Aktarılması ve Gen bankasının oluşturulması

Araziden toplanan örneklerden 10 izolat RT-PCR çalışmasından sonra turunç fidanlarına aşı inokulasyonu yöntemi ile aktarılacak stok bitkiler elde edilmiş ve gen bankası oluşturulmuştur (Şekil 4.29). Gen bankasının oluşturulmasının amacı bakanlık kuruluşlarına pozitif örnek sağlama ve projelerde kaynağı belli kontrol bitkilerinin kullanılmasıdır. Bundan sonra yürütülecek çalışmalarda bu gen bankası kaynak bitki olarak kullanılacaktır.

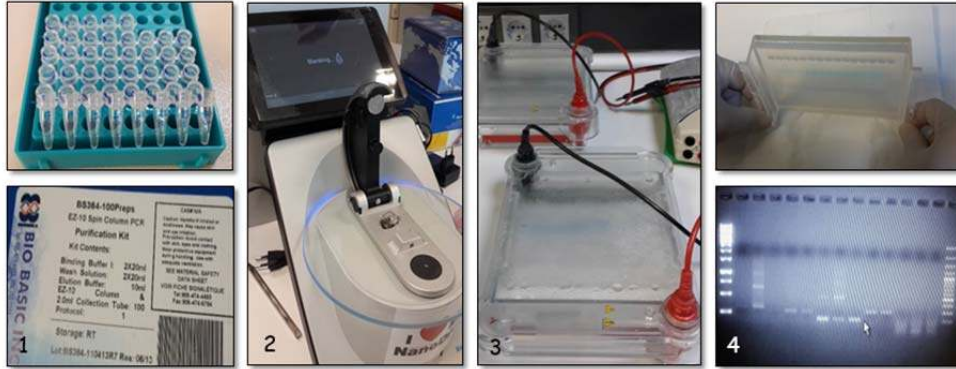


Şekil 4.29. Etrog citron (A) ve turunç (B) fidanlarına aşı inokulasyonu yöntemi ile stok bitki üzerinde gen bankası oluşturulması

4.6. Gen Klonlaması Çalışmaları

Moleküler klonlama çalışmalarında PCR ürünlerinin saflaştırılması

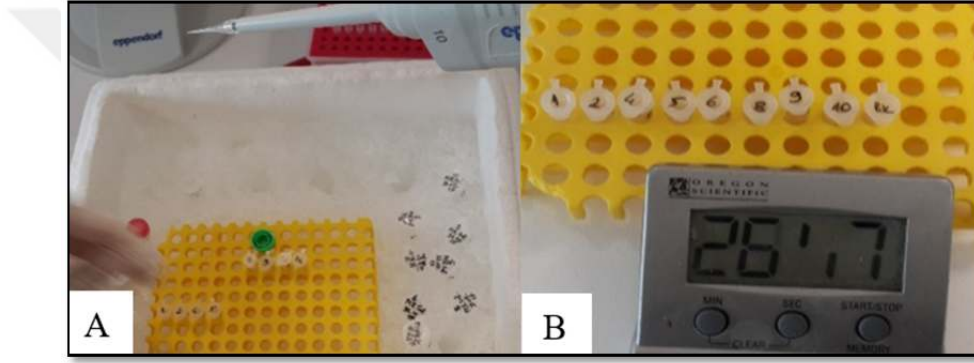
Survey çalışmaları sırasında yoğun simptom gözlenen ve moleküler çalışmalarda kuvvetli bant elde edilen örneklerden 6 izolat (2 adet CEVd, 2 adet CCaVd, 2 adet HSVd) seçilerek, seçilen izolatlarda viroidlere ait spesifik primerler ile elde edilen RT-PCR ürünleri EZ Coloumn PCR pürifikasyon kiti (Biobasic, Kanada) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda kit protokolüne uygun olarak saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.30.1). Saflaştırılan PCR ürünleri 100bp DNA markör ile %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez ile ayrıştırılmış ve Vilber Lourmat marka jel görüntüleme sisteminde ultraviyole ışık altında görüntülenerek tek bant elde edilen örneklerde: klonlama çalışmalarına devam edilmiştir (Şekil 4.30.2, 3, 4).



Şekil 4.30. PCR ürünlerinin Bio Basic Spin Column PCR Purifikasyon Kit ile saflaştırılması (1) ve gen klonlaması çalışmaları için seçim aşamaları. Saflaştırılan PCR ürününün nanodropla kalitesine bakılması (2), Agaroz jele yüklenmesi (3), Tek bant gözlenen örneklerin direk gen klonlama çalışmaları için seçimi (4)

Seçilen izolatlarda çoğaltılan viroid genomu T-A klonlama yöntemi ile pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmıştır.

Ligasyon (Birleştirme); Klonlanacak olan viroidlere ait genler RT-PCR yoluyla çoğaltıldıktan sonra pGEM-T Easy plazmid vektörü ile birleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. In-vitro transkripsiyon için, oda sıcaklığında 30 dakika yada +4 °C’de 16 saat bekletme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ligasyon çalışmalarına ait görseller Şekil 4.31’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.31. pGEM-T easy plazmidi ve PCR ürünü ile bir ligasyon karışımının hazırlanması ve PCR ürünü ile plazmidin birleştirilmesi aşaması

Transformasyon

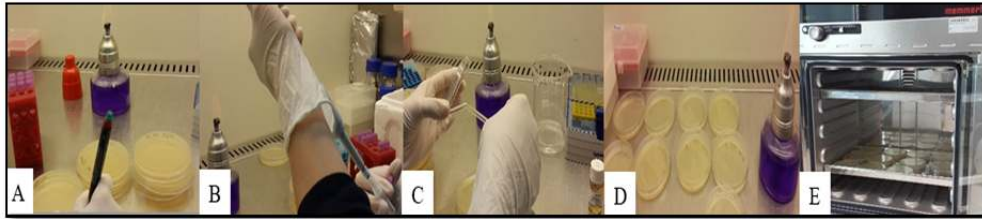
Hazırlanan ligasyon karışımının bir bölümü, hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisinin JM109 ırkına aktarılmıştır. Bu işlem sırasında -80°C’de dondurulmuş ve buz üzerinde çözündürülmüş bakteri hücreleri ependorf tüpüne aktarılıp, üzerine ligasyon karışımı eklenerek 30 dakika buz içerisinde ve daha sonra 42 °C’de 90 sn termal blokta tutularak ısı şoku uygulanmış ve hemen arkasından 5 dk süre ile tekrar buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır. Transformasyon işleminin aşamalarına ait görseller Şekil 4.32’de verilmiştir.



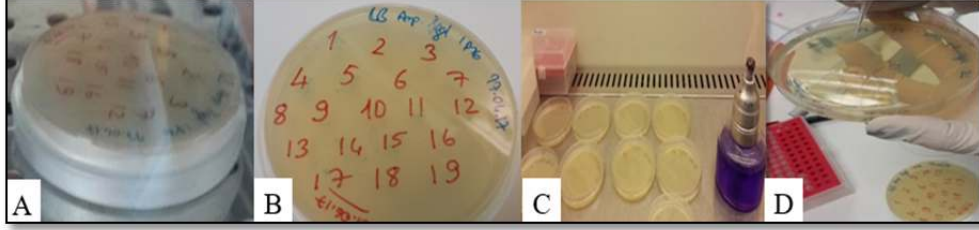
Şekil 4.32. 25µl Bakteri hücrelerine (Competent cell) 5 µl ligasyon karışımı eklenip 30 dakika buzda (A), 90 sn 42 °C’de termal blokta tutulup ısı şoku uygulaması (B) sonrası 5 dak buzda bekletilerek (C) gerçekleştirilen transformasyon işleminin aşamaları

Seleksiyon

Transformasyon yapılan ve Sıvı LB besi ortamında çoğaltılan bakteriler, 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-galacto-pyranoside (X gal) maddesi içeren 2X LB katı besi ortamı bulunan petri kaplarına ekilmiş ve 37 °C’de 16 saat (1 gece) inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.33). Bu süre sonunda viroid geni aktarılan pGEM-T Easy plazmidini içeren LB katı besi ortamında büyüüp beyaz renkli koloniler oluşturan bakteriler seçilerek gen aktarma işlemlerine devam edilmiştir. Viroid geni içermeyen bakteriler, mavi renkli koloniler oluşturmuş ve koloni seçiminde bunlar elenmiştir (Şekil 4.34).



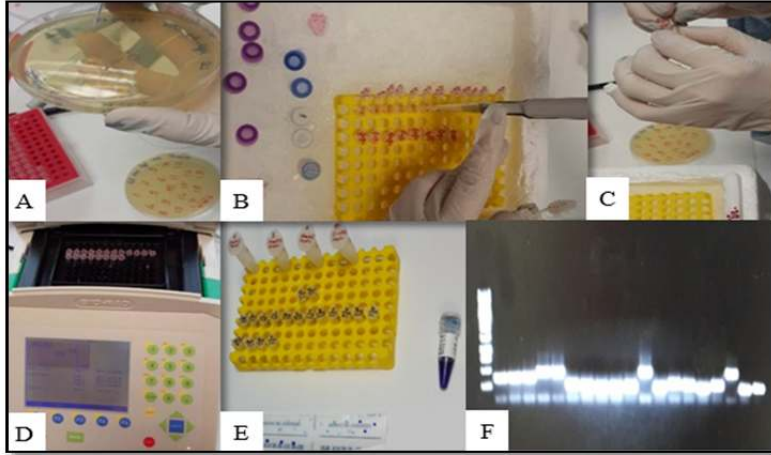
Şekil 4.33. Etikeplenip hazırlanmış olan ortam ve bakteri suşlarının, LB agarlı ortama ekimi ve inkübasyon aşaması. Etiketlenmesi (A), 50µl bakteri hücresinin (B) 100 µg/ml amphisilinli LB agarlı ortama ekimi (C) ve 37 °C’de 1 gece inkübasyon (E) aşamaları



Şekil 4.34. İnkübasyondan çıkan petrilere koloni gelişiminin gözlenmesi (A) ve beyaz kolonilerin seçilip, işaretlenmesi (B), ve seçilen tek kolonilerden ekim aşaması (C,D)

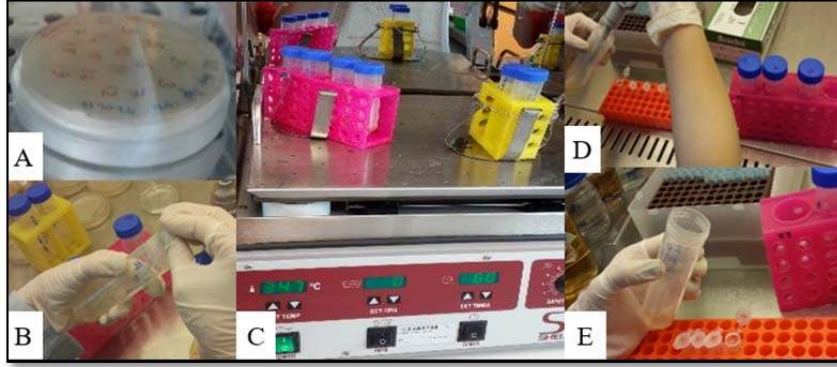
Koloni PCR

Oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten viroid genomunu taşıyan rekombinant plazmidleri içerip içermediğini belirlemek amacıyla tek koloni seçimi yapılarak, aynı koloniden Koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece seçilen kolonilerin herbiri tek tek taranarak, viroid genomunun aktarılıp aktarılmadığı daha kesin bir şekilde belirlenmiştir. Koloni PCR yöntemi rekombinant plazmidlerle yapılan klonlamayı desteklemek ve klonlamanın başarılı olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Seçilen beyaz kolonilere Koloni PCR işlemi ile viroid genomunun aktarmasının belirlenme aşamaları. Tek koloni çizimi (A) ve Koloni PCR işlemi (B, C) ve Koloni PCR aşaması (D, E) sonrasında viroid genomunun aktarıldığı belirlenen amplifikasyon ürünleri (F)

Koloni PCR’da beklenen bölgede bant veren örneklerle işleme devam edilmiştir. Tek kolonilerden alınarak çoğaltma amacıyla sıvı LB besiyeri yerine ekim yapılan örnekler 37°’de 1 gece inkübasyonda tutulmuştur. İnkübasyondan sonra Plazmit ekstraksiyon kiti ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. Gen aktarılmış beyaz kolonilerden seçim, çoğaltma ve stok olarak muhafazaya alma aşamaları. Beyaz kolonilerden seçim yapılması (A), sıvı LB besiyeri yerine ekim aşaması (b) ve 37 °C’de 1 gece inkübasyona tabi tutulması (C) ve çoğaltan plazmitlerin -20 ve -80 °C’de muhafazaya almak için hazırlık aşamaları

Plazmit İzolasyonu

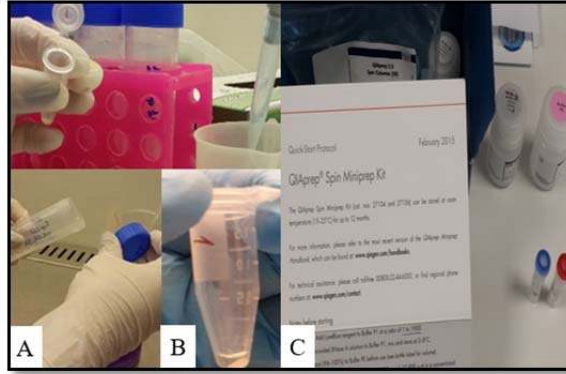
Koloni PCR sonucunda viroid genomunu taşıyan plazmidi içeren koloniler belirlendikten sonra plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için koloni PCR’da pozitif sonuç veren en az 1 adet koloni seçilerek plazmid izolasyonu ile plazmid saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Her bir viroid izolatu için seçilen koloniler 60 µg/ml ampisilin içeren 5 ml 2X LB sıvı besiyeri ortamına aktararak 37 °C’de 16 saat 180 dev/dk hızda çalkalamalı inkübatörde büyütülmüştür. Daha sonra steril bir mikrosantrifüj tüpüne 750 µl büyütülen bakterilerden alınıp üzerine 250 µl gliserol eklenerek gliserol stokları hazırlanmıştır. Bu şekilde elde edilen oluşturulan plazmitlerin gliserol stokları pozitif kontrol olarak kullanılmak amacıyla -20 ve -80 °C’de muhafazaya alınmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Viroid geni aktarılmış plazmitlere ait ürünlerin pozitif kontrol olarak gliserol stokta -20 ve -80 °C’de muhafaza edilen tüplerinin görüntüsü

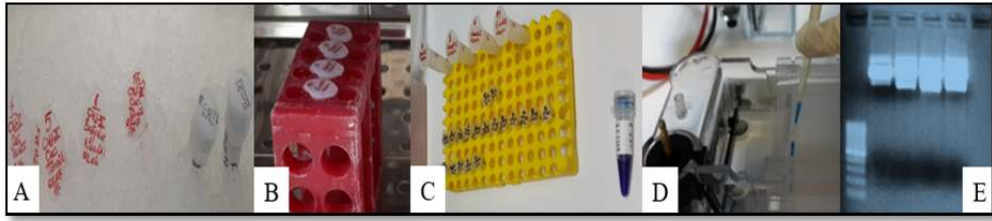
Sıvı LB besi yerinde çoğaltılan viroid izolatlarının genomunu taşıyan plazmitlerin izolasyonu için, BioBasic firmasından (Kanada) sağlanan plazmid saflaştırma kiti kullanılarak kit protokolüne uygun olarak plazmid saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Plazmit saflaştırma kiti (BioBasic-Kanada) ile plazmit saflaştırma işleminin aşamaları. Çoğaltılan plazmitlerin izolasyon için hazırlanması (A) ve kit protokolüne uygun olarak plazmid saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesi (B ve C)

EcoR I Restriksiyon Enzimi ile Kesme

Saflaştırılan plazmidlerin viroid genomunu taşıyıp taşımadıklarını kesin olarak belirlemek amacıyla plazmit izolasyonundan elde edilen ürünlerde EcoR I enzimi ile enzim kesimi ve 37 °C’de inkübasyon işlemi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 1.5’luk agaroz jelde görüntülenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Plazmit izolasyonu ile plazmit saflaştırması yapılan örneklerde EcoRI enzimi ile kesim ve görüntüleme aşamaları. EcoRI enziminin uygulanması (A), (B) ve enzim kesimi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin (C) % 1.5’luk agaroz jelde görüntülenmesi (D, E)

Plazmit saflaştırılması yapılarak enzim kesim sonucuna bakılan ürünlerde beklenen bölgelerde bant elde edilen izolatlar seçilerek daha önceden belirlenmiş olan firmaya hizmet alımı şeklinde dizi analizine gönderilmiştir.

Sıvı LB besi yerinde çoğaltılan plazmit örneklerinin bir kısmı da yukarıda belirtildiği gibi (Şekil 4.37) Gliserol stok yapılarak -20 °C’de ve -80 °C’de pozitif kontrol gen bankası olarak muhafazaya alınmıştır.

4.7. Filogenetik Analizler

Survey çalışma alanlarından en ağır simptom gösteren bitkilerden seçilerek toplanan örneklerden RT-PCR çalışmaları ile her bir etmen için genomik ve filogenetik analizlerin yapılabilmesi için her etmene spesifik primerler ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler çalışmalar sonucunda elde edilen RT-PCR ürünleri 50 µl olacak şekilde hazırlanarak BM-Labosis-MACROGEN firmasına

gönderilmiş ve çift yönlü genom dizileme (DNA dizi analizi; sekans) hizmeti hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sekans verilerine ait kromotogram dosyaları, ChromasPro 1.7.6 kromotogram analiz programıyla analiz edilerek, forward-reverse primerlerle sekans verileri birleştirilmiş, okumalara ait ortak bir dizilim (consensus) dizileri oluşturulmuştur. Bu gen dizilimlerinin diğer organizmaların gen dizilimleri ile kıyaslanması NCBI Blast (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) veri tabanında BLASTn analizleri gerçekleştirilmiştir. NCBI BLASTn veri tabanında eşleşme gösteren kayıtlardan seçilen izolatlar ile genomik ve filogenetik analiz aşamasına geçilmiştir. Her etmen için kayıtlı izolatlar ile kıyaslama yapıldıktan sonra yüksek benzerlik elde edilen, seçilen izolatlar ile Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizler gerçekleştirilmiştir. Her etmen için soyağaçları (phylogenetic tree) MEGA11 programında oluşturulmuştur (Tamura ve ark., 2021). Karşılaştırması yapılan taksonların oluşturduğu kümelere ait kopya yüzdeleri kümelerin oluşturduğu dalların yanında verilmiştir (Felsenstein, 1985). Karşılaştırılan kayıtlara ait dizilerin nükleotit dizileri Mega 11 programında, Maximum parsimony istatistik metodu kullanılarak dendogramlar oluşturulmuş, bootstrap analizleri ise 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Nei ve Kumar, 2000).

CEVd için gerçekleştirilen DNA dizi analizi çalışmalarında, MZ995262 CEVdA-1 (Adana-1), OQ366358 CEVdA-13 (Adana-13), OQ366359 CEVdM-7 (Mersin-7) ve OQ366360 CEVdH-12 (Hatay-12), OQ366361 CEVdM-2 (Mersin-2) izolatları kullanılmış ve bu izolatlar Uluslararası gen bankasında (NCBI) kayıtlı olan dünya izolatları ile blast analizleri ile karşılaştırılmıştır. MZ995262 nolu A-1 izolatı, KY646193 nolu İran izolatı ile % 99.64, MW013137 nolu Türkiye izolatı ile %99.64 ve MK911711 nolu İran izolatı ile %98.91, KJ538554 Tunus izolatı ile %98.18 oranında benzerlik göstermiştir. OQ366361 nolu CEVdM-2 (Mersin-2) izolatı; Tunus KJ538554 izolatı ile % 99.46, İran MK911711 izolatı ile %98.83, Çin GU592444 nolu izolatı ile %95.98 oranında benzerlik göstermiştir. OQ366359

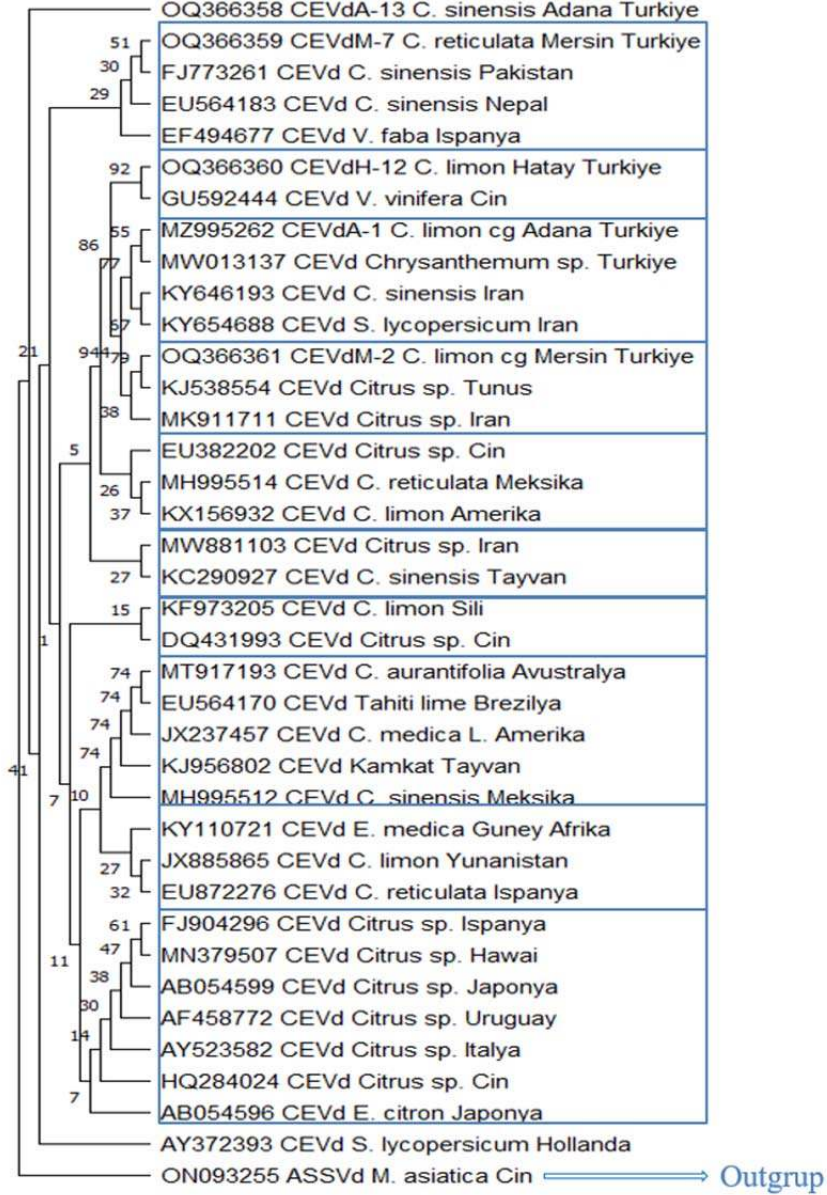
CEVdM-7 (Mersin-7) izolatu; Şili'den KF973205 izolatu ile % 98.32, Avustralya MT917193 izolatu ile %97.21, Çin'den DQ431991 izolatu ile %97.46 oranında benzerlik göstermiştir. OQ366360 CEVdH-12 (Hatay-12) izolatu; Çin'den GU592444 izolatu ile %99.40, Meksika'dan KY473932 izolatu ile %97.30, Tunus'dan KJ538554 izolatu ile %96.70 oranında benzerlik göstermiştir. OQ366358 CEVdA-13 (Adana-13) izolatu; Şili KF973205 izolatu ile %97.30, Çin DQ431991 izolatu ile %96.49, Avustralya MT917193 izolatu ile %96.24 benzerlik göstermiştir.

Çalışma kapsamında yüksek benzerlik yüzdeleri ile CEVd olduğu belirlenen izolatlar yukarıda belirtilen kayıt numaraları (MZ995262 CEVdA-1 (Adana-1), OQ366358 CEVdA-13 (Adana-13), OQ366359 CEVdM-7 (Mersin-7) ve OQ366360 CEVdH-12 (Hatay-12), OQ366361 CEVdM-2 (Mersin-2)) ile NCBI veri bankasına kaydedilmiştir. Blast analizi sonucunda elde edilen veriler içerisinde seçilen izolatlar ile soyağaçları çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.40). Maximum Parsimony Metod Tree Bisection Reconnection istatistik analizine göre, 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilen Bootstrap analizleri sonucunda izolatların hem birbirleri, hem de dünya izolatları ile benzerliklerinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada CEVd etmeni için Outgrup olarak Pospiviroidae familyası *Apscaviroid* cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. asiatica* L. Çin izolatu seçilerek kullanılmıştır.

CEVd için oluşturulan Filogenetik ağaç'ta en az 8 grubun (clade) olduğu gözlenmiştir. "AY372393 nolu *S. lycopersicum* Hollanda izolatu" out gruba en yakın olarak ayrılmasına rağmen "OQ366358 CEVdA-13 izolatu" ileri (gelişmiş) grupta yer almaktadır. OQ366359 CEVdM-7 izolatu da gelişmiş grup olarak belirlenmiş ve FJ773261 nolu Pakistan *C. sinensis* izolatu ile genetik olarak yüksek oranda benzerlik/akrabalık gösterdiği dendogramda gözlenmiştir. "MZ995262 CEVdA-1 izolatu" ve "*Chrysanthemum* sp. Türkiye" izolatu birbirleri ile yüksek benzerliğe sahip olmuştur. Bu durum CEVd etmeni açısından farklı bitkiler arasında bulaşma olabildiğini düşündürmektedir. Ayrıca "*Citrus* sp. Mersin

Türkiye” ile “*Citrus sp.* Tunus” izolatlarının birbirlerine yüksek derecede akrabalık gösterdikleri dendogramda görülmektedir. Bu durum bu viroid gurubunun Akdeniz ülkelerindeki turunçgillerde daha yaygın olabildiğini düşündürmektedir. Benzer olarak *C. limon* Yunanistan izolatı ile *C. reticulata* İspanya izolatının yüksek genetik benzerlik göstermesi ile açıklanabilmektedir. Ayrıca bu benzerlik oranlarının ticari turunçgil fidanı ihracat ve ithalatı ile de ilişkili olabileceğini de düşündürmektedir (Şekil 4.40).

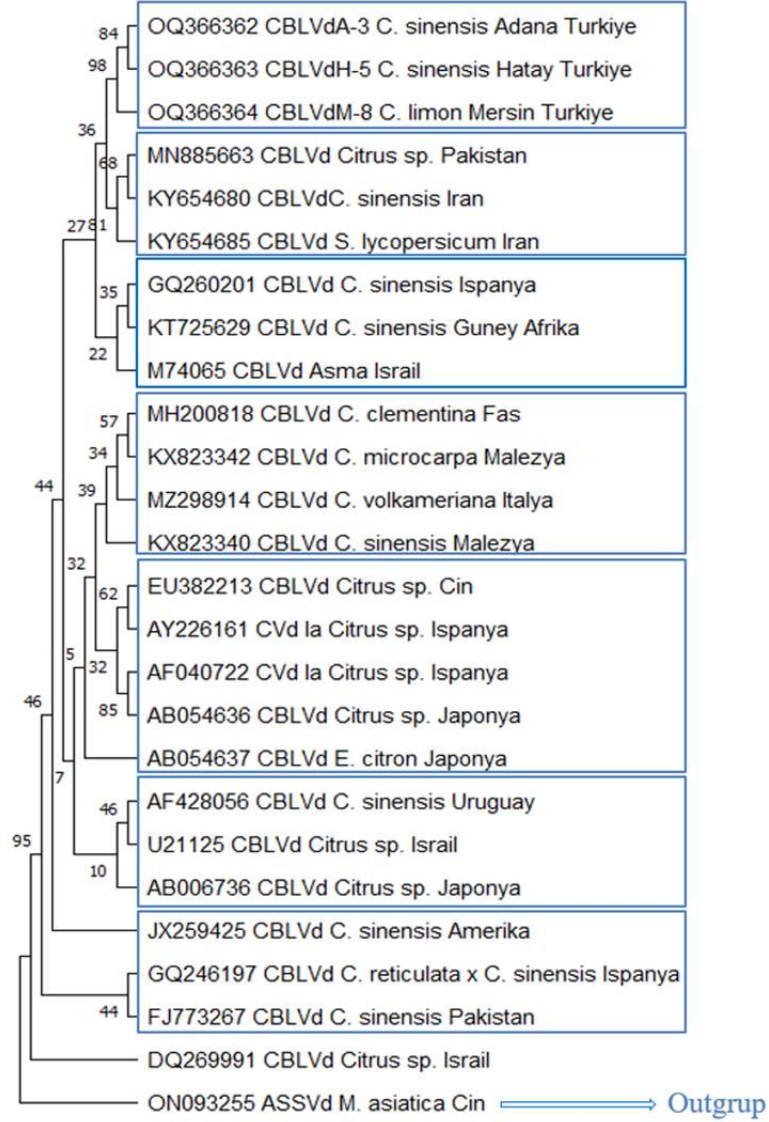




Şekil 4.40. CEVd'in 5 adet turunçgil izolâtının (MZ995262 CEVdA-1, OQ366358 CEVdA-13, OQ366359 CEVdM-7, OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2) dünyanın farklı bölgelerinden seçilen izolâtlar ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

CBLVd için gerçekleştirilen DNA dizi analizi çalışmalarında, OQ366362 CBLVdA-3 (Adana-3) , OQ366363 CBLVdH-5 (Hatay-5), OQ366364 CBLVdM-8 (Mersin-8) çalışmamız kapsamında elde edilip NCBI'a kaydı yapılmış olan izolatlar kullanılmıştır. Bu izolatlar gen bankasında kayıtlı olan diğer dünya izolatları ile karşılaştırılarak BLAST analizleri gerçekleştirilmiş ve en yüksek benzerlik gösterdikleri izolatlar ile teyitleri yapıldıktan sonra, filogenetik akrabalık ilişkileri ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. CBLVd etmenine ait seçilen izolatlar ile Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizler MEGA11 programında oluşturulmuştur. Maximum Parsimony Metod Tree Bisection Reconnection istatistik analizine göre, 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilen Bootstrap analizleri sonucunda izolatların hem birbirleri, hem de dünya izolatları ile benzerlikleri analiz edilerek akrabalık ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada CBLVd etmeni için Outgrup olarak Pospiviroidae familyası *Apescaviroid* cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. asiatica* L. Çin izolatı seçilerek kullanılmıştır (Şekil 4.41).

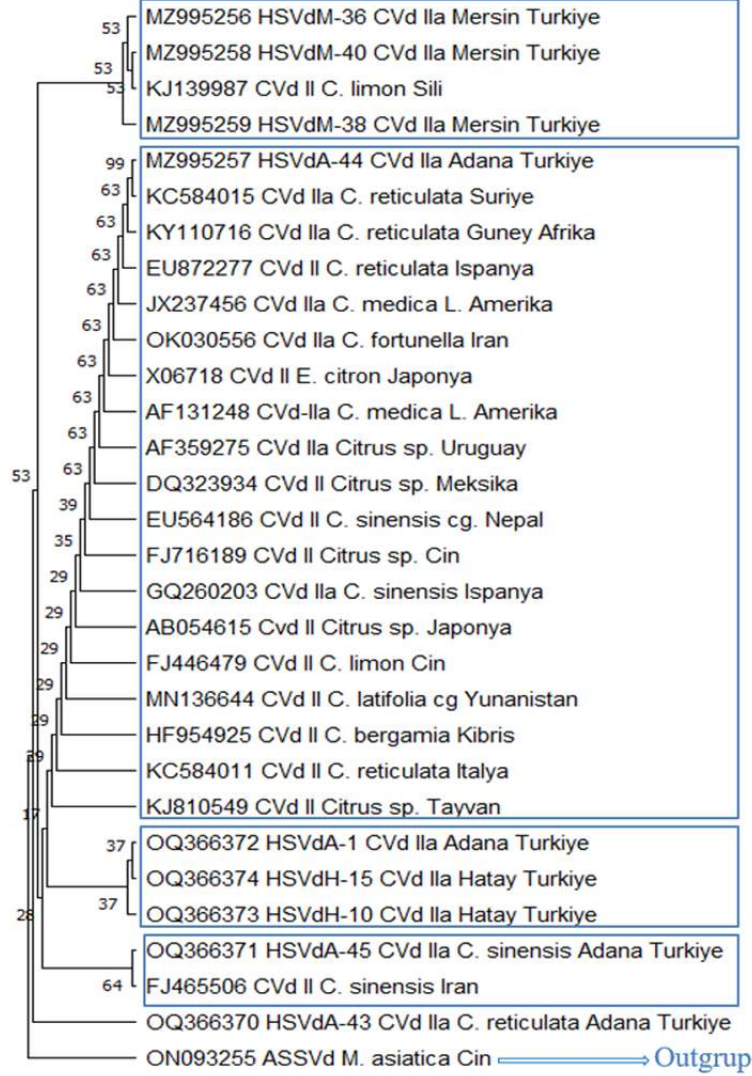
Çalışma kapsamında yüksek benzerlik yüzdeleri ile CBLVd için elde edilen OQ366362 CBLVdA-3 (Adana-3) , OQ366363 CBLVdH-5 (Hatay-5), OQ366364 CBLVdM-8 (Mersin-8) izolatlarına ait verilerin fasta formatı Uluslararası gen bankasında (NCBI) kayıtlı veriler ile BLAST yapılarak karşılaştırılmış ve kayıtlı izolatlar ile benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir. OQ366362 CBLVdA-3 izolatı, MN885663 Pakistan izolatı ile %97.05, KY654685 İran izolatı ile %96.70, MH200820 Fas izolatı ile %92.83 dizi benzerliği göstermiştir. OQ366363 CBLVdH-5 izolatı, MN885663 Pakistan izolatı ile %97.62, KY654685 İran izolatı ile %97.60, JX259425 Amerika izolatı ile %96.52 dizi benzerliği göstermiştir. OQ366364 CBLVdM-8 izolatı, MN885663 Pakistan izolatı ile %96.84, KY654685 İran izolatı ile %96.81, GQ246197 İspanya izolatı ile %96.10 oranında dizi benzerliğine sahip olmuştur. Yüksek benzerlik oranları ile CBLVd olduğu belirlenen 3 adet izolata ait fasta format verileri, NCBI veri bankasına OQ366362, OQ366363, OQ366364 aksesyon numaraları ile kaydedilmiştir.



Şekil 4.41. CBLVd etmeninin 3 adet izolatının (OQ366362 CBLVdA-3, OQ366363 CBLVdH-5, OQ366364 CBLVdM-8), dünyanın farklı bölgelerinden seçilen izolatlar ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

Oluşturulan filogenetik ağaçta OQ366362 CBLVdA-3 *C. sinensis*, OQ366363 CBLVdH-5 *C. sinensis* Türkiye izolatları yüksek genetik akrabalık ile aynı grupta yer alırken, OQ366364 CBLVdM-8 *C. limon* Türkiye izolatının ise bu izolatlara yakın özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen Türkiye izolatları ile MN885663 Pakistan ve KY654680 ve KY654685 İran izolatları birbirlerine yakın grupta yer almışlardır. Bu durum büyük olasılıkla ülkeler arasında bulaşık bitki materyali taşınması ile farklı ülkelere etmenin bulaştığını düşündürmektedir. Bu çalışma kapsamında Türkiyede elde edilen izolatlara ait grup (clade) diğer ülkelerden ayrılmıştır. Out gruba ise en yakın olarak DQ269991 *Citrus sp.* İsrail izolatı gözlenmiştir. Bu durum genetik olarak DQ269991 *Citrus sp.* İsrail izolatının dendogramda seçilmiş olan diğer izolatların ortak atası olabileceğini düşündürmektedir.

HSVd (CVd IIa) etmeni için elde edilen, izolatlar gen bankasında kayıtlı olan diğer dünya izolatları ile karşılaştırılarak BLAST analizleri gerçekleştirilmiş ve en yüksek benzerlik gösterdikleri izolatlar ile teyitleri yapıldıktan sonra, filogenetik akrabalık ilişkileri ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. CVd IIa etmenine ait seçilen izolatlar ile Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizinde MEGA11 programında, Maximum Parsimony metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatların evrimsel tarihini belirlemek için 1000 tekrarlı konsensüs ağacı oluşturulmuştur. Outgrup (Dışgrup) olarak Pospiviroidae familyası *Apscaviroid* cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. communis* L. Çin izolatı seçilmiştir (Şekil.4.42).

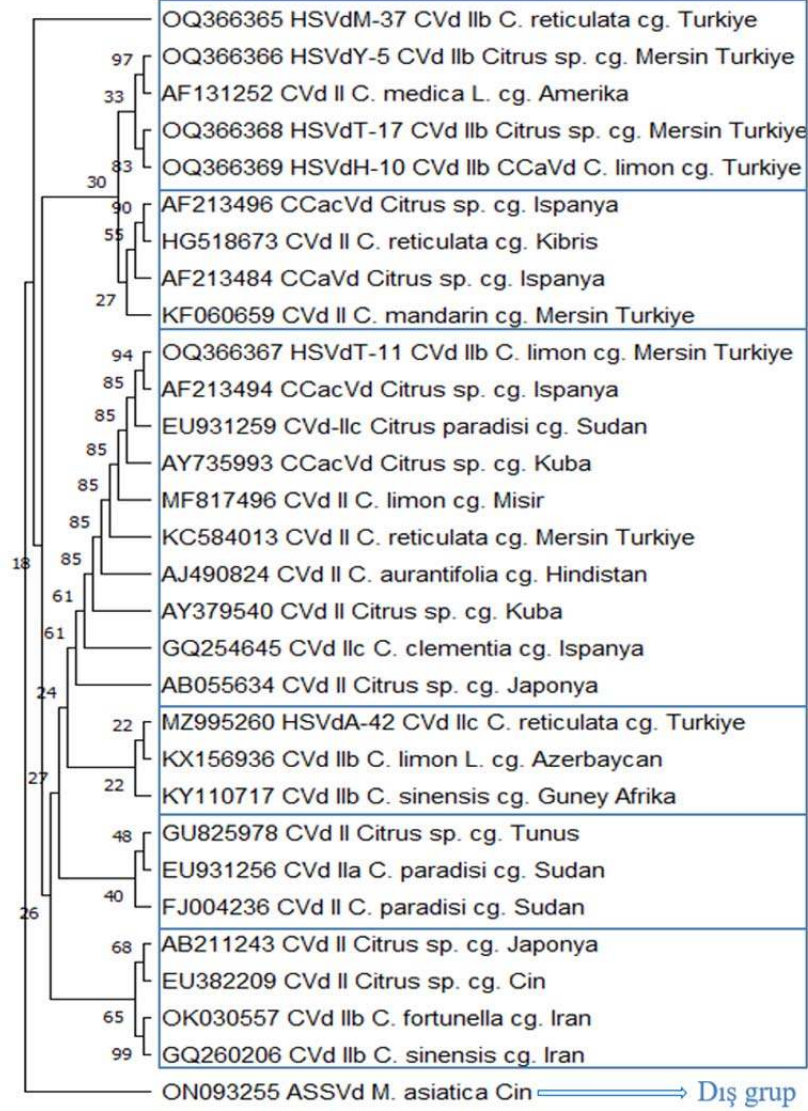


Şekil 4.42. HSVd (CVd IIa) etmeninin 9 adet izolatının (MZ995256 HSVdM-36, MZ995257 HSVdA-44, MZ995258 HSVdM-40, MZ995259 HSVdM-38, OQ366370 HSVdA-43, OQ366371 HSVdA-45, OQ366372 HSVdA-1, OQ366373 HSVdH-10, OQ366374 HSVdH-15), dünyanın farklı bölgelerinden tespit edilmiş diğer HSVd (CVd IIa) izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

Bu çalışma kapsamında elde edilmiş ve NCBI uluslararası veri bankasına kaydedilmiş olan 9 adet HSVd (CVd IIa) izolatlarının (MZ995256 HSVdM-36, MZ995257 HSVdA-44, MZ995258 HSVdM-40, MZ995259 HSVdM-38, OQ366370 HSVdA-43, OQ366371 HSVdA-45, OQ366372 HSVdA-1, OQ366373 HSVdH-10, OQ366374 HSVdH-15) BLAST analizleri sonucunda dünya izolatları içerisinde en yüksek benzerlik gösterdiği izolatlar seçilerek filogenetik akrabalık ilişkileri çalışmalarına devam edilmiştir. MZ995256 nolu M-36 izolatı, KJ810549 Tayvan izolatı ile %97.47, MZ995259 M-38 izolatı, AB054614 Japonya izolatı ile %100, MZ995258 M-40 izolatı KF060660 İtalya izolatı ile %100, OQ366370 nolu A-43 izolatı ve MZ995257 A-44 izolatları KJ810549 Tayvan izolatı ile %100, OQ366371 nolu A-45 izolatı HQ386726 Tunus izolatı ile %98.99, JX259398 Yunanistan izolatı ile % 97.32, A-1 izolatı, KY508372 Meksika izolatı ile %95.18, H-10 ve H-15 izolatları, KY508371 Meksika izolatı ile sırasıyla %99.55 ve %97.12 dizi benzerliği göstermişlerdir.

BLAST analizleri sonucunda en yüksek benzerlik gösteren izolatlar arasından seçim yapılarak, filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan ağaçta; MZ995258 M-40 ve MZ995256 M-36 izolatlarının Şili *C. limon* izolatı ile aynı grupta yer alarak, yüksek oranda genetik akrabalık gösterdiği belirlenmiştir. OQ366371 A-45 izolatı FJ465506 İran *C. sinensis* izolatı ile yüksek genetik benzerlik göstermiştir. Genel anlamda Türkiye izolatları (MZ995257 A-44 izolatı hariç) KJ810549 Tayvan *Citrus* sp., KC584011 İtalya *C. reticulata*, KJ139987 Şili *C. limon* ve FJ465506 İran *C. sinensis* izolatları ile aynı grup (clade)'ta yer almışlardır. Bu durum, bu ülkelerin ülkemiz ve bölgemiz için bulaş kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca MZ995257 nolu A-44 izolatı ise ikinci clade (grup)'ta en ileri (advance) seviyede yer almıştır.

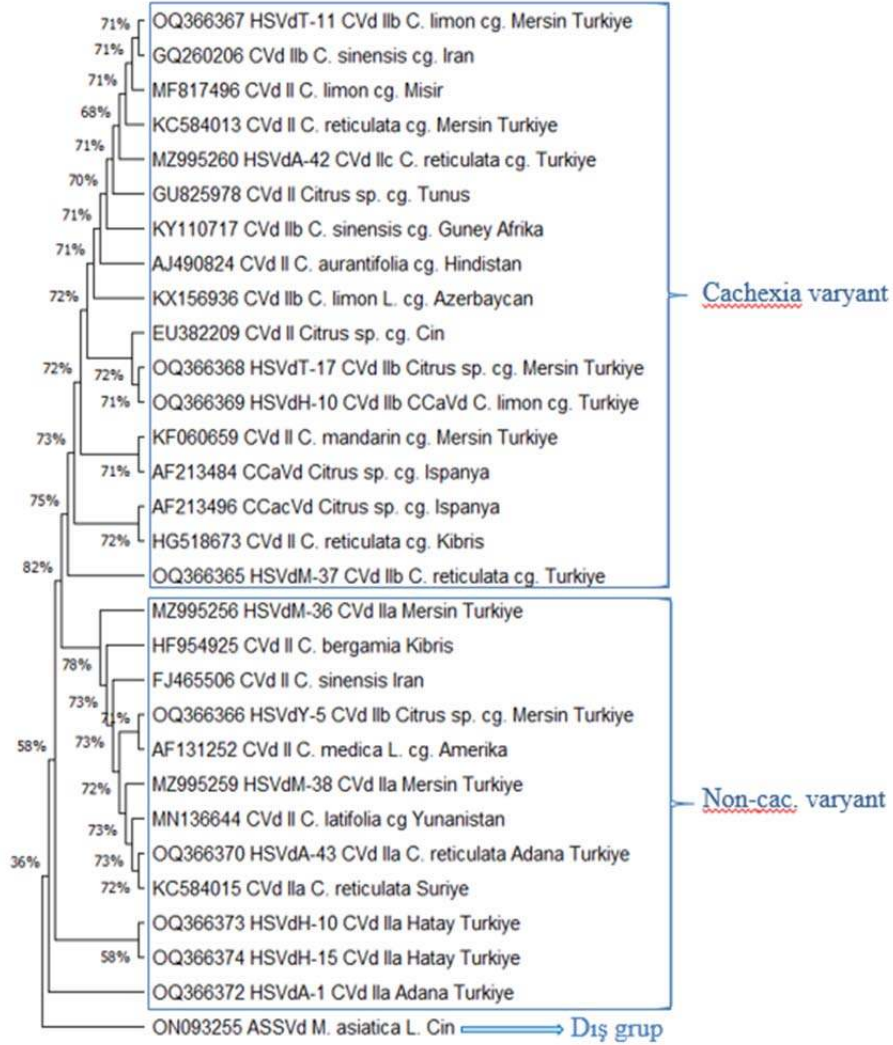
Bu çalışma kapsamında elde edilmiş ve NCBI uluslararası veri bankasına kaydedilmiş olan 6 adet HSVd (CVd IIb/c) (CCAcVd) izolatın NCBI gen bankasında kayıtlı veriler içerisinde BLAST analizleri gerçekleştirilmiştir. BLAST analizleri sonucunda NCBI'da kayıtlı izolatlar arasında en yüksek benzerlik gösteren izolatlar seçilerek, genetik akrabalık ilişkileri çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. CVd IIb/c etmeninin 6 adet izolatının (OQ366365 HSVdM-37, OQ366366 HSVdY-5, OQ366369 HSVdH-10, OQ366367 HSVdT-11, OQ366368 HSVdT-17, MZ995260 HSVdA-42) dünyanın farklı bölgelerinde tespit edilmiş diğer CVdIIb ve IIc'nin seçilen izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

CVd IIb/c için oluşturulan dendogramda Outgrup (Dış grup) olarak Pospiviroidae familyası *Apocaviroid* cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. communis* L. Çin izolatu seçilmiştir (Şekil 4.43).

OQ366365 HSVdM-37 izolatu AF213496 İspanya izolatu ile %97.57, OQ366366 HSVdY-5 izolatu AF131252 Amerika izolatu ile %99.66, OQ366367 HSVdT-11 izolatu AF213494 İspanya izolatu ile %99.66, OQ366368 HSVdT-17 izolatu GQ260205 İspanya izolatu ile %98.34, OQ366369 HSVdH-10 izolatu FJ716109 Çin izolatu ile %99.33, MZ995260 izolatu ise AB055634 izolatu Japonya izolatu ile %99.65 değeleri ile en yüksek dizi benzerliğine sahip olmuşlardır. Oluşturulan filogenetik ağaçta izolatların farklı grup (clade)'lara ayrıldığı görülmektedir. Türkiye izolatları da birçok grupta yer almaktadırlar. Bu durum başka konukçulardan veya çok farklı kaynaklardan izolatların bulaş tekrarının olabildiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.44. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CVD IIa izolatlarının (MZ995256 HSVdM-36, MZ995257 HSVdA-44, MZ995258 HSVdM-40, MZ995259 HSVdM-38, OQ366370 HSVdA-43, OQ366371 HSVdA-45, OQ366372 HSVdA-1, OQ366373 HSVdH-10, OQ366374 HSVdH-15) ve CVD IIb/c izolatlarının (OQ366365 HSVdM-37, OQ366366 HSVdY-5, OQ366369 HSVdH-10, OQ366367 HSVdT-11, OQ366368 HSVdT-17, MZ995260 HSVdA-42) dünyanın farklı bölgelerinden seçilen CVD II izolatları ile MEGA11 programında oluşturulmuş evrimsel soyağacı

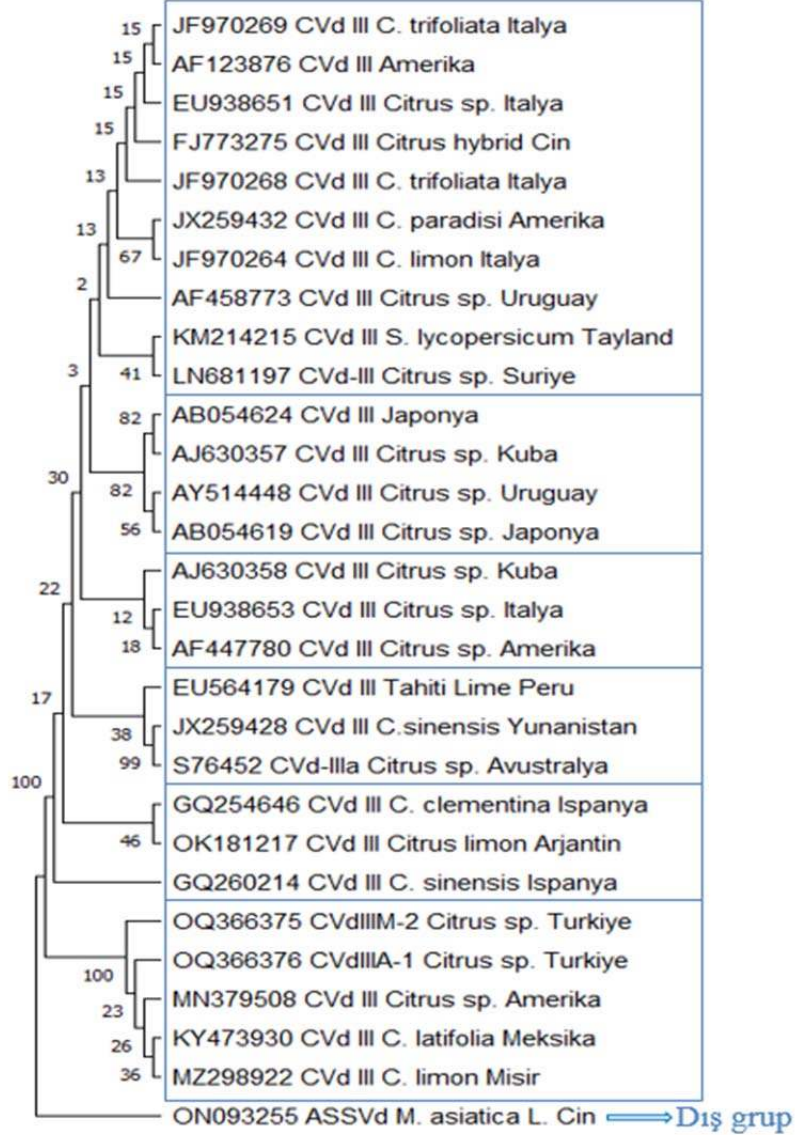
CVd IIa/b/c etmenlerine ait seçilen izolatlar ile Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizler MEGA11 programında, Maximum Parsimony metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatların evrimsel tarihini belirlemek için 1000 tekrarlı konsensüs ağacı oluşturulmuştur. Outgrup olarak Pospiviroidae familyası Apocaviroid cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. communis* L. Çin izolatı seçilmiştir (Şekil 4.44).

Çalışma kapsamında elde edilen HSVd izolatları Uluslararası Gen Bankasında kayıtlı izolatlar ile karşılaştırıldığında CVd IIa (non cachexia) ve CVd IIb/c (cachexia) izolatlarının birbirlerinden ayrı gruplarda yer aldığı ve böylece çalışmanın sonucunun doğruluğu teyid edilmiştir.

HSVd'in farklı türlerde bildirilen uluslararası gen bankasında kayıtlı olan izolatlarının karşılaştırılması ile elde edilen dendogram aşağıda görülmektedir (Şekil 4.45).

Filogenetik ağaçta farklı bitki gruplarından NCBI'a kaydedilmiş olan HSVd izolatları 5 grup (clade) oluşturduğu gözlenmiştir. Türkiye izolatlarından *Prunus domestica*, *P. hereophyla* Brezilya, *P. communis* Çin, *M. communis* İran izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Diğer grupta yer alan *C. reticulata* Mersin izolatı ise *C. sativus* Almanya izolatı ile yüksek genetik akrabalık göstermiştir. Bu durum etmenin farklı konukçular arasında da hızla yayılabildiğini düşündürmektedir. Aynı durum, farklı ülkelerden NCBI gen bankasına farklı ülkelere kaydı yapılmış şerbetçi otu izolatlarının (MW280148 Avustralya, AB039270 Japonya, MK425610 Amerika, EU365358 ve EU365352 Çin izolatlarının) aynı grupta yer alması da etmenin ülkeler arası bitkisel materyal akışı yoluyla taşınabildiğinin göstergesi olmaktadır. Dendogramda elde edilen gruplardan bir tanesi de farklı ülkelere kaydı yapılmış sert çekirdekli kendi içerisinde ayrı bir grupta yer alırken, yine farklı ülkelere asma ve yumuşak çekirdekli meyve türlerinden elde edilen izolatlar ayrı bir grup oluşturmuştur. Bu filogenetik ağaçta da görüldüğü gibi etmenin farklı bitki türlerini konukçu olarak kullanabilmesi ülkeler arası bitki alış verişinde özellikle virülensliği yüksek varyantların bulaşık materyaller ile tüm dünyaya taşınması ve yayılması söz konusudur (Şekil 4.45).

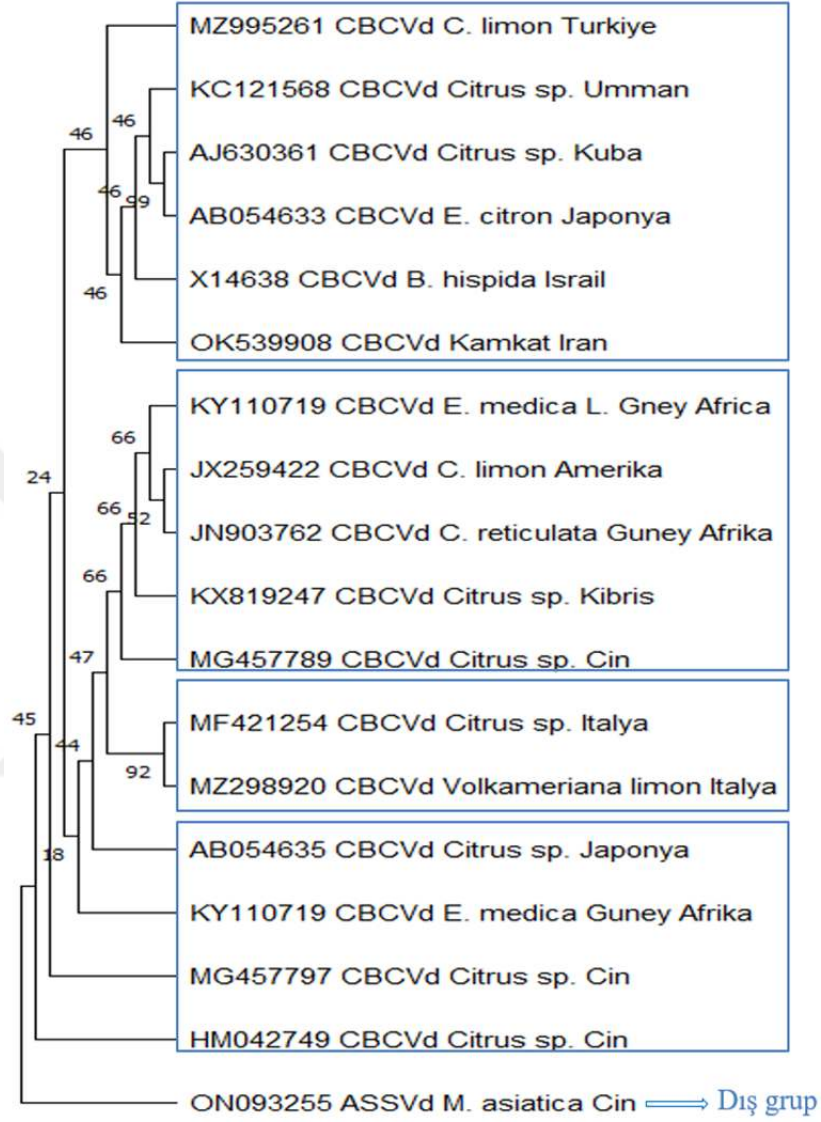
Çalışma kapsamında CDVd (CVdIII) için oluşturulmuş olan Filogenetik ağaçta birçok grup görülmektedir. *Citrus sp.* Türkiye izolatı ile *C. latifolia* Meksika izolatının aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum muhtemelen iklimle de ilişkili olarak, farklı konukçulardan mekanik olarak bulaşabildiğini ve/veya ortak konukçulardan turunçgillere ve turunçgillerdeki farklı cinslerden birbirlerine bulaşabildiğini düşündürmektedir (Şekil 4.46)



Şekil 4.46. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CDVd (CVd III) izolatlarının (OQ366375 CVd IIIM-2, OQ366376 CVd IIIA-1) dünyada tespit edilmiş ve NCBI veri bankasında kayıtlı seçilen CVd III izolatlarından MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

Çalışma kapsamında CDVd (CVdIII) için oluşturulmuş olan Filogenetik ağaçta birçok grup oluştuğu görülmektedir. OQ366375 CVd IIIM-2, OQ366376 CVd IIIA-1 *Citrus sp.* Türkiye izolatlarının MN379508 Amerika, MZ298922 Mısır, KY473930 Meksika izolatı ile biraz farklılıkla yakın grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum muhtemelen iklimle de ilişkili olarak, farklı konukçulardan mekanik olarak etmenin bulaşabildiğini ve/veya ortak konukçulardan turunçgillere ve turunçgillerdeki farklı cinslerden birbirlerine aktarılabilirdiğini düşündürmektedir. (Şekil 4.46).

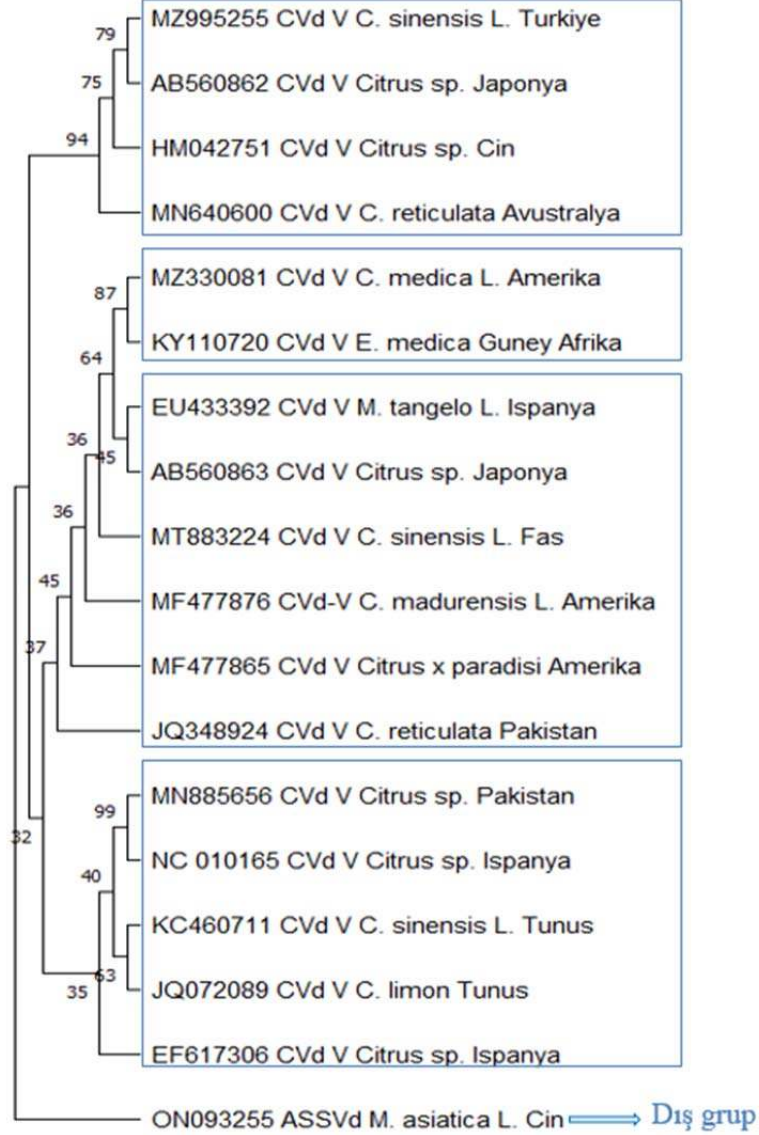
Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CBCVd (CVd IV) izolatının (MZ995261) dünyada tespit edilmiş ve NCBI veri bankasında kayıtlı izolatlardan seçilen CVd IV izolatları ile Maximum Parsimony Metod Tree Bisection Reconnection istatistik analizine göre, Booststrap değeri 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilen filogenetik akrabalık ilişkilerine ait MEGA11 programında oluşturulan evrimsel ağacı Şekil 4.47’de verilmiştir. CBCVd etmenine ait seçilen izolatlar ile gerçekleştirilen filogenetik analizde Dış grup olarak Pospiviroidae familyası Apscaviroid cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. asiatica* Çin izolatı seçilmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan CBCVd (CVd IV) izolatının (MZ995261) dünyada tespit edilmiş seçilen CVd IV izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan oluşturulan evrimsel soyağacı

CBCVd için bu çalışma kapsamında elde edilmiş olan DNA dizi eşleştirmeleri (BLAST analizi) sonuçlarında, MZ995261 limon izolatu, KY110719 nolu Güney Afrika izolatu ile %99.36, MG457789 nolu Çin izolatu ile %99.35 dizi benzerliğı göstermiştir. Elde edilen filogenetik ağaçta, ana olarak iki clade (grup) oluştuğı görölmektedir. MZ995261 kayıt nolu *C. limon* Türkiye, KC121568 kayıt nolu *Citrus sp.* Umman, AJ630361 kayıt nolu *Citrus sp.* Kuba, AB054633 kayıt nolu *E. citron* Japonya, X14638 kayıt nolu *B. hispida* İsrail ve OK539908 kayıt nolu *C. fortunella* (Kamkat) İran izolatları ile aynı grupta bulunduğı görölmektedir. Bu grup MZ995261 kayıt nolu *C. limon* Türkiye izolatu ile genetik benzer olarak bu gurubun üstünde yer almıştır.

CVd V izolatının (MZ995255) etmenine ait seçilen izolatlar ile Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizler MEGA11 programında oluşturulmuştur. Dış grup olarak Pospiviroidae familyası Apscaviroid cinsine giren ON093255 aksesyon numarası ile kayıtlı *Apple scar scin viroid* (ASSVd) *M. asiatica* L. Çin izolatu seçilmiştir (Şekil 4.48).



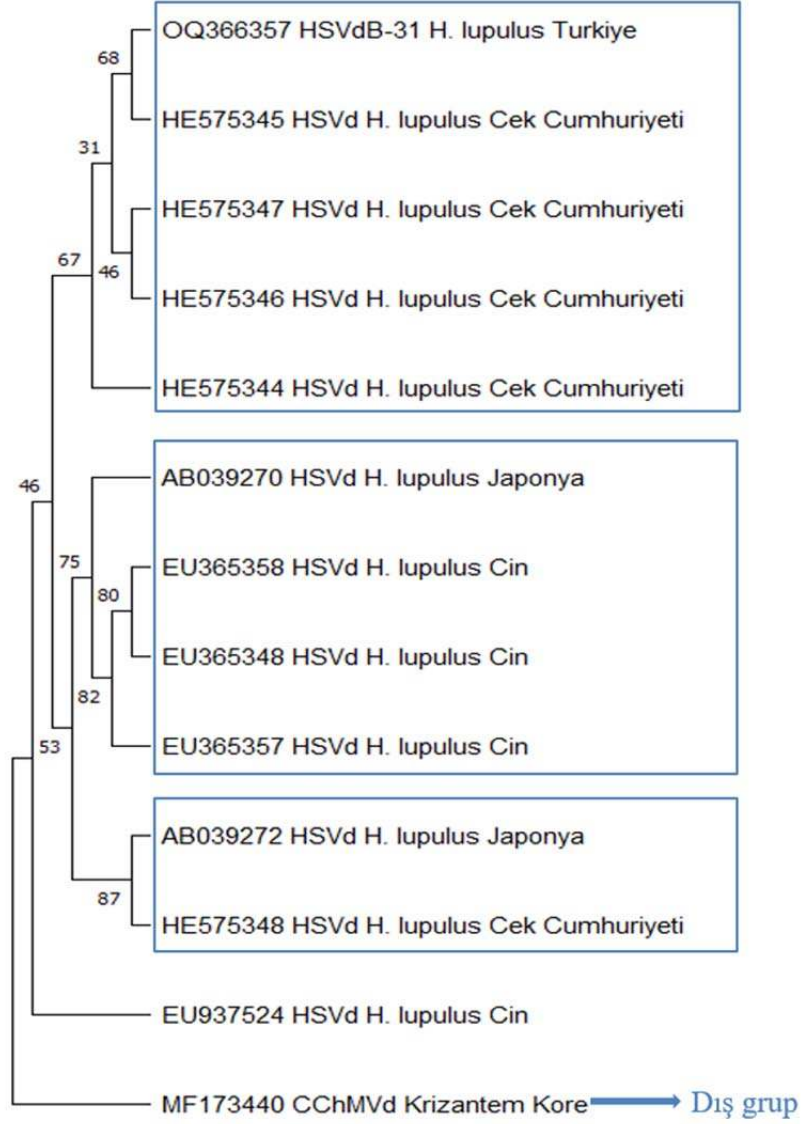
Şekil 4.48. Bu çalışma kapsamında elde edilmiş CVd V izolatının (MZ995255) dünyada tespit edilmiş seçilen CVd V izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

Çalışma kapsamında elde edilip NCBI'a kaydı yapılmış olan MZ995255 *C. sinensis* CVd V Türkiye izolatı, NCBI'da dizi karşılaştırması (BLAST) sonucunda, AB560862 nolu Japonya izolatı ile %98.64, HM042751 nolu Çin izolatı ile %98.30, MN640600 nolu Avustralya izolatı ile %97.96 gibi yüksek oranda dizi benzerliğine sahip olmuştur. BLAST analizi sonuçlarına göre CVd V için, en yüksek benzerlik gösteren NCBI'a kayıtlı izolatlardan seçim yapılarak Maximum Parsimony Metod Tree Bisection Reconnection istatistik analizine göre, Booststrap değeri 1000 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilen filogenetik akrabalık ilişkilerine ait MEGA11 programında oluşturulan evrimsel ağaç Şekil 4.48'de verilmiştir.

Genel anlamda oluşturulan filogenetik ağaç 3 gruba ayrılmıştır. MZ995255 *C. sinensis* CVd V Türkiye izolatı, AB560862 kayıt nolu *Citrus sp.* Japonya izolatı ile aynı grupta yer alarak, yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Ayrıca HM042751 kayıt nolu *Citrus sp.* Çin izolatı ve MN640600 kayıt nolu *C. reticulata* Avustralya izolatı ile aynı grupta yer almıştır.

Çalışma kapsamında incelenen ikinci bitki grubu olan Şerbetçi otu bitkisinde HSVd etmenine ait elde edilen OQ366357 HSVdB-31 izolatı ile NCBI veri bankasındaki seçilen izolatlar ile filogenetik çalışmalara devam edilmiştir. Filogenetik akrabalık ilişkilerine ait evrimsel analizler MEGA11 programında gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatların benzerliğini belirlemek için soy ağacı oluşturulmuştur. Dış grup olarak Pospiviroidae familyası Apscaviroid cinsine giren MF173440 kayıt numarası ile kayıtlı *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) *Krizantem* Kore izolatı seçilmiştir (Şekil 4.49).

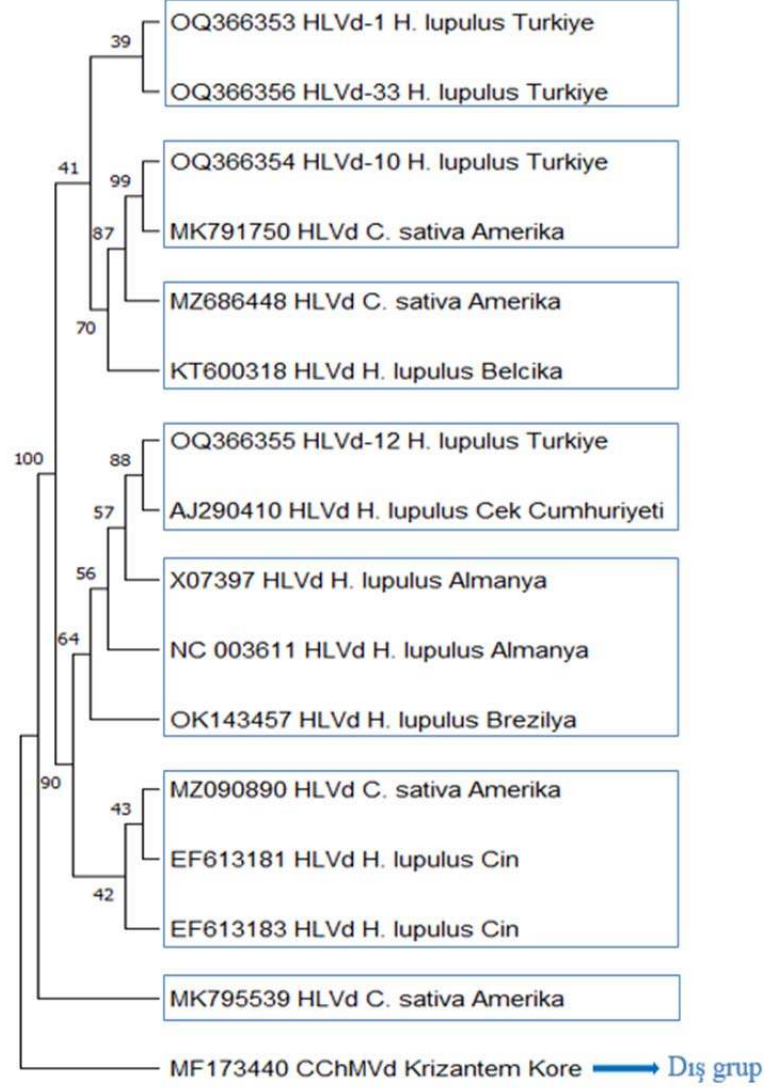
Çalışma kapsamında Şerbetçi otunda elde edilen HSVd etmenine ait OQ366357 HSVdB-31 izolatı HE575345 ve HE575347 Çek Cumhuriyetinden Slovenya izolatları ile %98.30 ve %97.60 benzerlik göstermiştir. Oluşturulan Filogenetik ağaçta *H. lupulus* Türkiye ile *H. lupulus* Çek Cumhuriyeti izolatları aynı grupta yer almış ve yüksek oranda genetik benzerlik göstermişlerdir. Bu durum bitki materyalleri taşınma yolu ile etmenin Türkiye'ye geldiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.49. Bu çalışma kapsamında Şerbetçi otu bitkisinden elde edilmiş HSVd (OQ366357 HSVdB-31 nolu) izolatının dünyada tespit edilmiş seçilen şerbetçi otu HSVd izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan evrimsel soyağacı

Şerbetçi otu HLVd etmenine ait seçilen (OQ366353 HLVd-1, OQ366354 HLVd-10, OQ366355 HLVd-12, OQ366356 HLVd-33) izolatlar ile dünyada tespit edilmiş diğer HLVd izolatları ile Maximum Parsimony Metod Tree Bisection Reconnection istatistik analizine göre, Bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilen filogenetik akrabalık ilişkilerine ait MEGA11 programında oluşturulan evrimsel ağaç Şekil 4.50’de verilmiştir. Soy ağacında dış grup olarak Pospiviroidae familyası Apscaviroid cinsine giren MF173440 aksesyon numarası ile kayıtlı *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) Krizantem Kore izolatı seçilmiştir (Şekil 4.50).

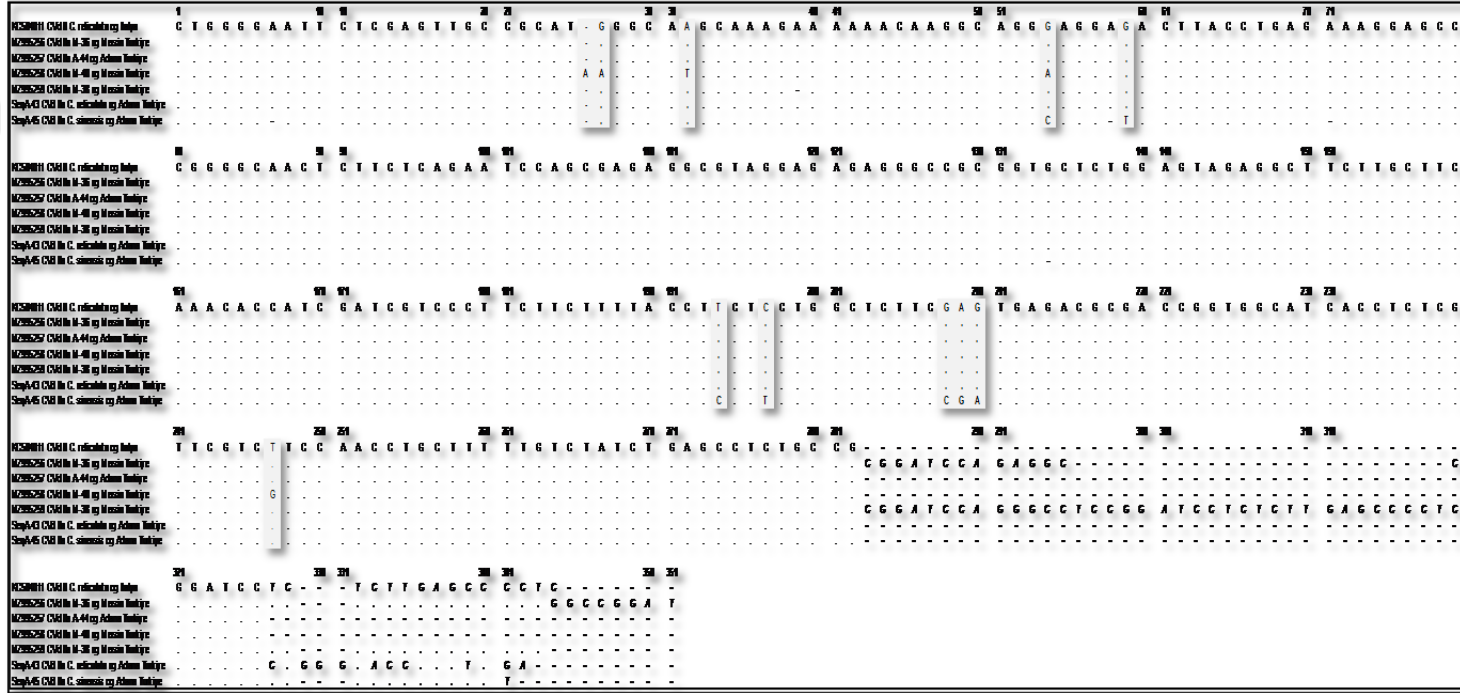
OQ366353 HLVd-1 ve OQ366356 HLVd-33 Türkiye izolatları aynı grupta yer alırken, ortak ataya (MK795539 Çin izolatı ile) en yakın izolatlar olarak bulunmuşlardır. OQ366354 nolu HLVd-10 Türkiye izolatı, MK791750 nolu *Cannabis sativa* Amerika izolatı ile aynı grupta yer alarak, yüksek oranda genetik akrabalık göstermiş ve diğer Türkiye izolatları ile iki farklı grupta (clade) yer aldıkları gözlenmiştir. OQ366355 HLVd-12 nolu Türkiye izolatı AJ290410 nolu Çek Cumhuriyeti izolatı ile aynı grupta yer almıştır. Türkiye’den elde edilen izolatların farklı grupta yer alması ve izolatların MK791750 nolu *Cannabis sativa* Amerika izolatı ve AJ290410 nolu Çek Cumhuriyeti izolatı gibi farklı izolatlar ile akrabalık göstermesi farklı üretim alanlarında yetiştirilen çeşitlerin temin edildiği bitki materyallerinin farklı ülkelerden yada kurumlardan temin edildiğini düşündürmektedir. Özellikle Bilecik ilinde yetiştiricilik yapılan alanlarda çiftçilere ürünlerinin alınması karşılığında kooperatifler tarafından bitkisel materyalin verilmesi ve aynı materyalle aynı yerde en az 20 yıl yetiştiriciliğin yapılması nedeniyle bahçe tesisindeki temiz üretim materyali çok büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4.50. Bu çalışma kapsamında Şerbetçi otu bitkisinden elde edilmiş HLVd izolatlarının (OQ366353 HLVd-1, OQ366354 HLVd-10, OQ366355 HLVd-12, OQ366356 HLVd-33) dünyada tespit edilmiş seçilen HLVd izolatları ile MEGA11 programında oluşturulan oluşturulan evrimsel soyağacı

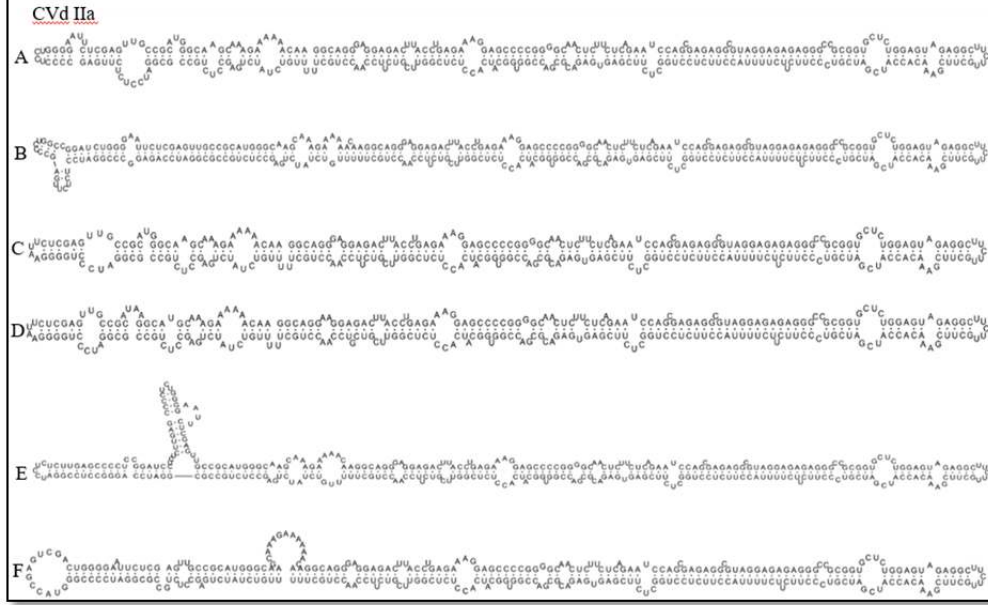
4.8. Viroidlerin İkincil Yapılarının oluşturulması

Bu çalışma kapsamında full genom çalışmalarına CEVd ve HSVd etmenlerinin varyantları alınmıştır. CEVd ve HSVd etmenlerinin cachexia ve non-cachexia varyantlarına ait izolatlar olarak elde edilen dizilerin Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat ile dizi hizalama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında analiz edilen izolatların, moleküler varyantlarının dizi hizalaması Megal1 programı kullanılarak elde edilmiş ve gözlenen değişiklikler ve bunların konumları CVd IIa için Şekil 4.51, CVdIIb/c için Şekil 4.53 ve CEVd için Şekil 4.55'te verilmiştir. Hizalama çalışmalarından sonra, RNAeval web server kullanılarak çalışma kapsamında elde edilen viroidlerin RNA dizilerinin çubuk şeklindeki ikincil yapıları DeRijk ve ark. (2003) ve Gruber ve ark. (2008)'na göre oluşturulmuştur. Oluşturulan ikincil yapılar CVd IIa için Şekil 4.52'de, CVd IIb/c için Şekil 4.54'te ve CEVd için ise Şekil 4.56'da verilmiştir. Bu varyantlardan elde edilen veriler her bir etmen için NCBI'da kayıtlı olan ve en çok benzerlik gösterdikleri referans izolatlar ile karşılaştırması yapılmıştır.



Şekil 4.51. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat ile bu çalışma kapsamında analiz edilen CVD-IIa'nın 6 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin (koyu renkli kutular) konumları

CVd-IIa (non-cachexia) etmeni için full genom olarak çalışılan 6 adet izolata referans olarak KC584011 kayıt numaralı izolat kullanılarak elde edilen hizalanmış veriler ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Filogenetik çalışmalar ve ikincil yapılar ile ilgili diğer çalışmalar DNA dizi hizalama çalışmalarından sonra gerçekleştirilmiştir. Referans izolat ile yapılan karşılaştırmada, 26. ve 27. bazlarda tüm izolatlarda herhangi bir okuma elde edilmemişken, MZ99528 nolu izolatta hem 26., hem de 27. bazda Adenin okuması elde edilmiştir. 32.'de Timin ve 54.'de Adenin Baz farklılıkları gözlenmiştir. OQ366371 HSVdA-45 izolatında da referans izolattan (KC584011) farklılık gösteren dizi sıraları 54. Baz (Citozin), 59. Baz (Timin), 194. Baz (Citozin), 197. Baz (Timin), 208. Baz (Citozin), 209. Baz (Guanin), 210. Baz (Adenin) okumaları gerçekleşmiştir. 248. Bazdan 282. Baza kadar izolatlar birbirleri ile aynı dizi benzerliği gösterirmiş, 282. Bazdan sonra MZ995257 HSVdA-44, MZ995258 HSVdM-40, OQ366370 HSVdA-43, OQ366371 HSVdA-45 izolatlarında referans izolat ile aynı olan dizi benzerliği devam etmiştir. 282. Bazdan sonra MZ995256 HSVdM-36 ve MZ995259 HSVdM-38 nolu izolatlar referans izolattan daha yoğun farklılıklar göstermişlerdir. OQ366370 HSVdA-43 izolatı ise, 327. Bazda Citozin, 329., 330 ve 331. Bazda Guanin, 333. Bazda Adenin, 334 ve 335. Bazda Citozin, 339. Bazda Timin, 341. Bazda Guanin, 342. Bazda Adenin okumaları ile farklılık göstermiştir (Şekil 4.51). Wang ve ark., (2018)'nın çalışmalarında belirttiği gibi, varyantlar arasında gözlenen bu baz farklılıklarının mutasyon kaynaklı olabileceğini ve bunun viroidlerin oluşturduğu ikincil yapıları etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Ito ve ark. (2002), çalıştıkları turuncgil izolatları arasında bazı nükleotid değişikliklerinin, viroidle infekteli Etrog citron bitkilerinde açığa çıkan varyantların, viroidin patojenitesini etkileyebileceğini bildirmişlerdir (Owens ve ark., 1999, Semancik ve ark., 1997).



Şekil 4.52. CVd IIa için referans izolatla (A: KC584011) çalışma kapsamında elde edilen (B: MZ995256, C: MZ995257, D: MZ995258, E: MZ995259, F: OQ366370) izolatların birlikte görülen çubuk şeklinde ikincil yapıları

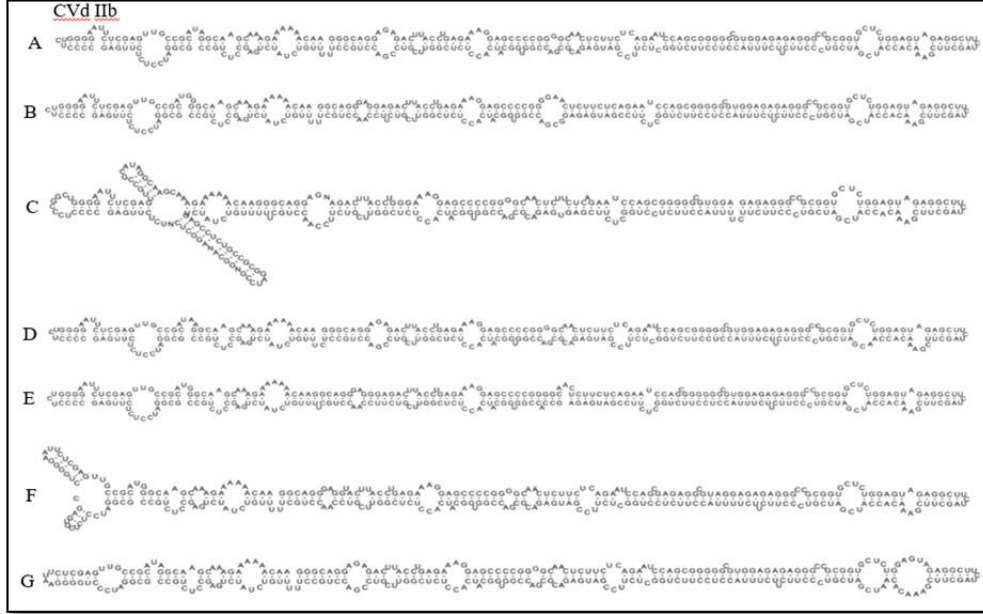
RNAeval web server kullanılarak çalışma kapsamında elde edilen viroidlerin RNA dizilerinin çubuk şeklinde ikincil yapıları oluşturulmuştur (DeRijk ve ark., 2003; Gruber ve ark., 2008). Non-cachexia varyantları için; yapılan hizalamada gözlenen farklılıklar ikincil yapıların oluşturulmasında da kendini göstermiştir. Özellikle MZ995256 HSVdM-36, MZ995259 HSVdM-38 ve OQ366370 HSVdA-43 izolatları oluşturdukları çıkıntılar ile diğer izolatlardan farklılıklar göstermişlerdir (Şekil 4.52).

CVd-IIb/IIc'nin 6 moleküler varyantı (OQ366369 HSVdH-10, OQ366365 HSVdM-37, OQ366367 HSVdT-11, OQ366368 HSVdT-17, OQ366366 HSVdY-5, MZ995260 HSVdA-42) ve Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolatın (AB055634 Japonya) dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin konumu ile ilgili bilgiler Şekil 4.53 üzerinde yorumlanmıştır. Referans izolata göre; 26. Bazda OQ366366 HSVdY-5, OQ366368 HSVdT-17, OQ366369 HSVdH-10 izolatlarında

Adenin bazı yerine Guanin Bazının varlığı gözlenirken, 27. Baz referans izolatta boş olarak belirlenirken, OQ366367 HSVdT-11 izolatında Adenin, OQ366368 HSVdT-17, OQ366369 HSVdH-10 izolatlarında ise Guanin bazı varlığı belirlenmiştir. 45. Bazda Citozin yerine OQ366368 HSVdT-17 izolatında Adenin, 46. Bazda Adenin yerine OQ366368 HSVdT-17, OQ366369 HSVdH-10 izolatlarında Citozin, 50, 51, 52. Bazlarda sırasıyla da Guanin, Citozin ve Adenin bazları yerine OQ366366 HSVdY-5 izolatında Citozin, Adenin ve Guanin bazları gözlenmiştir. OQ366368 HSVdT-17, OQ366369 HSVdH-10 izolatlarında 55, 56, 57, 58 ve 59. Bazlarda referans izolattan farklı bazlar gözlenmiştir. 60. Bazda OQ366366 HSVdY-5 izolatında Adenin bazı yerine Guanin, 71. Baz sırasında, OQ366365 HSVdM-37 izolatında Adenin bazı yerine Guanin bazı görülmüştür. OQ366366 HSVdY-5 izolatında 110, 112, 114 ve 118. Bazlarda referans izolata göre (G,G,-,-) farklı olarak, A, A, G, A bazları, OQ366368 HSVdT-17'de 114. Bazda Guanin bazının varlığı belirlenmiştir. 169. Bazda referans izolatta görülen Citozin bazı yerine MZ995260 HSVdA-42 izolatında Adenin bazı gözlenmiştir. 171. Bazda referans izolatta gözlenen Timin yerine, OQ366367 HSVdT-11 izolatında Adenin bazı belirlenmiştir. 191 ve 196. Bazda OQ366365 HSVdM-37 ve OQ366366 HSVdY-5 izolatlarında referans izolattan farklı olarak Timin, 199. Bazda ise Citozin bazlarının varlığı belirlenmiştir. OQ366365 HSVdM-37 izolatında 210, 211, 212 nolu bazlarda sırasıyla C, G, A bazları yerine, G, A, G bazlarının varlığı belirlenmiştir. OQ366368 HSVdT-17 izolatında, 218 ve 219. Bazlarda ise C, G yerine, G, C bazları, OQ366369 HSVdH-10 izolatında ise 218. Bazda Citozin bazı yerine Guanin bazı belirlenmiştir. Referans izolattan farklı olarak, OQ366365 HSVdM-37, OQ366368 HSVdT-17 ve OQ366369 HSVdH-10 izolatlarında 247. Bazda Timin bazı, 248. Bazda ise Citozin bazının, 253. Bazda Adenin, 260. Bazda Timin bazının varlığı belirlenmiştir. 262. Bazda referans izolattaki Timin yerine OQ366367 HSVdT-11 izolatında Citozin bazının varlığı gözlenmiştir. 293 ve 320. Bazlar arasında ise sadece OQ366365 OQ366365 HSVdM-37 izolatında farklılık belirlenirken, diğer izolatlar referans izolat ile aynı baz dizisi sıralarına sahip olmuştur (Şekil 4.53).

AB055634 CVAE II C. Japonya	1	CTGGGGGAATTCCTCGAGTTC	21	CGCATAGGCAAGCAAAAGAA	31	AAAAACAAGG	41	CAGG	51	CAGGAG	61	AGACTTACCTGA	71	GAAAGGAGC
Shayk-37 CVAE II C. Irak														
Shayk-5 CVAE II C. İran														
Shayk-11 CVAE II C. İran														
Shayk-17 CVAE II C. İran														
Shayk-18 CVAE II C. İran														
M295258 CVAE II C. Irak														
AB055634 CVAE II C. Japonya	81	CCCCGGGG	91	AACTCTTCTCAGAAATCCAGCGG	101	GGGCGGTGGAGAGAGGGCC	111	CGGGTGGCTCTGGAGTAGAGG	121	CTCTAGCTT				
Shayk-37 CVAE II C. Irak														
Shayk-5 CVAE II C. İran														
Shayk-11 CVAE II C. İran														
Shayk-17 CVAE II C. İran														
Shayk-18 CVAE II C. İran														
M295258 CVAE II C. Irak														
AB055634 CVAE II C. Japonya	131	CGAAACAC	141	ATCGATCGTCCCTTCTCTTT	151	ACCTCTCTCTGGCTCTTCC	161	GATGASACGCG	171	ACCGGTGGCATCACCTCTC				
Shayk-37 CVAE II C. Irak														
Shayk-5 CVAE II C. İran														
Shayk-11 CVAE II C. İran														
Shayk-17 CVAE II C. İran														
Shayk-18 CVAE II C. İran														
M295258 CVAE II C. Irak														
AB055634 CVAE II C. Japonya	201	GGTTCG	211	TCCGACCTGCTTTTGTGCTA	221	TGTGAGGCTCTGCCGCGGAT	231	CTCTCTTGAGCCCTT	241	CTCTCTTGAGCCCTT				
Shayk-37 CVAE II C. Irak														
Shayk-5 CVAE II C. İran														
Shayk-11 CVAE II C. İran														
Shayk-17 CVAE II C. İran														
Shayk-18 CVAE II C. İran														
M295258 CVAE II C. Irak														
AB055634 CVAE II C. Japonya	251	CCCCG												
Shayk-37 CVAE II C. Irak														
Shayk-5 CVAE II C. İran														
Shayk-11 CVAE II C. İran														
Shayk-17 CVAE II C. İran														
Shayk-18 CVAE II C. İran														
M295258 CVAE II C. Irak														

Şekil 4.53. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat (AB055634 Japonya izolatı) ile bu çalışma kapsamında elde edilen CVd-IIb/IIc'nin 6 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin (koyu renkli kutular) konumları



Şekil 4.54. Cvd Iib Referans izolatı (A: AB055634 Japonya) ile çalışma kapsamında elde edilen (B: OQ366369 HSVdH-10, C: OQ366365 HSVdM-37, D: OQ366367 HSVdT-11, E: OQ366368 HSVdT-17, F: OQ366366 HSVdY-5), Cvd Iic (G: MZ995260 HSVdA-42) 6 moleküler varyanta ait izolatlardan elde edilen çubuk şeklinde ikincil yapılar

Çalışma kapsamında elde edilen viroidlerin RNA dizileri, RNAeval web server kullanılarak oluşturulan ikincil yapılarına bakıldığında OQ366369 HSVdH-10, OQ366367 HSVdT-11, OQ366368 HSVdT-17 ve MZ995260 HSVdA-42 izolatları referans izolatlar ile benzer ikincil yapılara sahip olurken, OQ366365 HSVdM-37 ve OQ366366 HSVdY-5 izolatları referans izolatından farklı olarak iki benzersiz çıkıntı oluşturmuşlardır (Şekil 4.54).

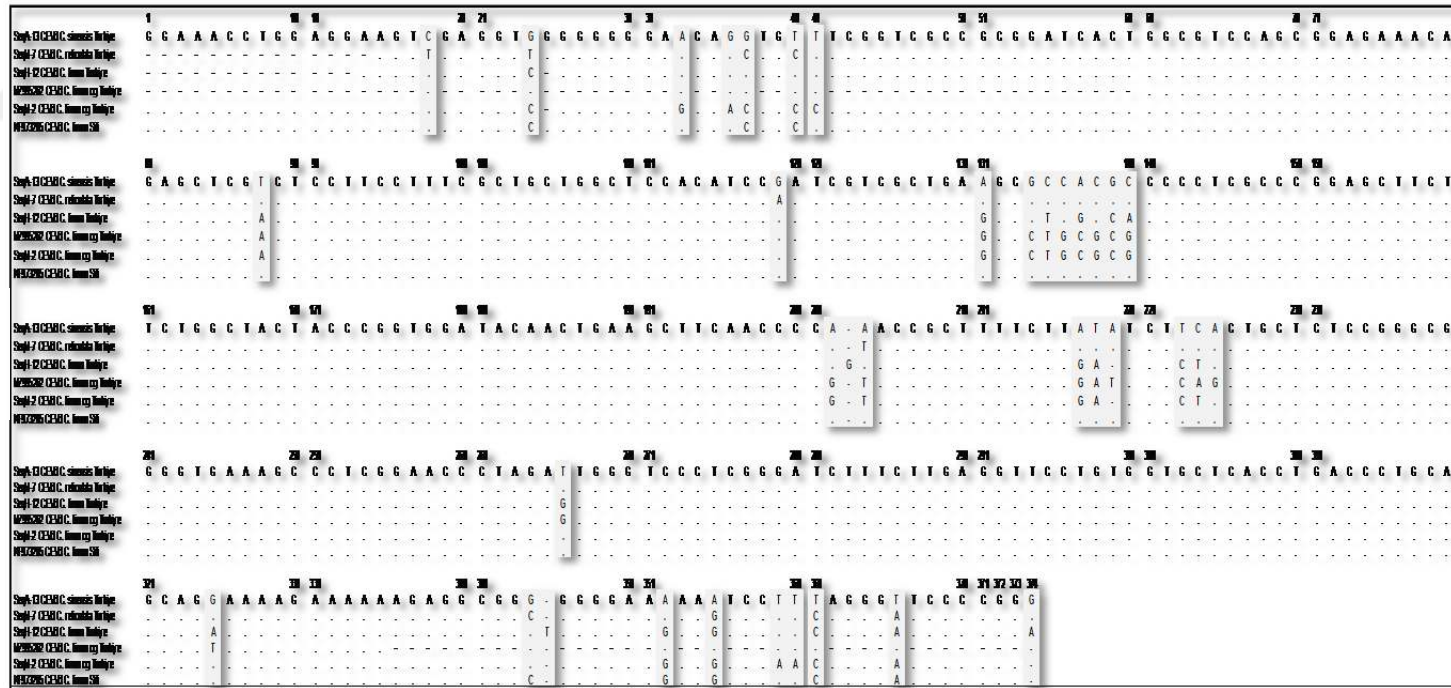
Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat (KF973205) ile bu çalışma kapsamında analiz edilen CEVd'in 5 varyantının (OQ366358 CEVdA-13, OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2, OQ366359 CEVdM-7, MZ995262 CEVdA-1) dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin konumları Şekil 4.8.5'te verilmiştir. Referans izolatından farklı olarak, 18. Bazda OQ366359 CEVdM-7

izolatında Timin bazı, 24. Bazda ise OQ366358 CEVdA-13 ve OQ366359 CEVdM-7 izolatlarında Guanin ve Timin bazı, 33. Bazda ise OQ366361 CEVdM-2 izolatında Adenin bazı yerine Guanin bazı, 36. Bazda ise OQ366361 CEVdM-2 izolatında Guanin bazı yerine Adenin bazının varlığı belirlenmiştir. 37. Bazda OQ366359 CEVdM-7 izolatu referans izolat ile aynı baza (Citozin) sahip olurken, diğer izolatlarda Guanin bazı belirlenmiştir. 40. Bazda ise referans izolattaki Citozin bazı yerine, OQ366358 CEVdA-13, OQ366360 CEVdH-12 ve MZ995252 CEVdA-1 izolatlarında Timin bazı gözlenmiştir. 40. Bazda ise referans izolattaki Timin bazı yerine, OQ366361 CEVdM-2 izolatında Citozin bazının varlığı belirlenmiştir. 88. Bazda, Timin yerine OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2 ve MZ995262 CEVdA-1 izolatlarında Adenin bazı, 119. Bazda OQ366359 CEVdM-7 izolatında yine Adenin bazı, 131. Bazda Referans izolattaki Adenin bazı yerine OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2 ve MZ995262 CEVdA-1 izolatlarında Guanin bazı belirlenmiştir. OQ366361 CEVdM-2 ve MZ995262 izolatlarında 134. Bazda Citozin, 135. Bazda Timin, 136. Bazda Guanin, 137. Bazda Citozin, 138. Bazda Guanin, 139. Bazda Citozin 140 ve 202. Bazda Guanin bazının varlığı gözlenmiştir. Referans izolattan farklı olarak, OQ366360 CEVdH-12 izolatında 203. Bazda Guanin, 204. Bazda OQ366361 CEVdM-2, OQ366359 CEVdM-7 ve MZ995262 CEVdA-1 izolatlarında Timin, OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2 ve MZ995262 CEVdA-1 izolatlarında 217. Bazda Guanin, 218. Bazda Adenin bazları gözlenirken, 219. Bazda referans izolattaki Adenin Bazı yerine MZ995262 CEVdA-1 izolatında Timin bazının varlığı görülmüştür. OQ366360 CEVdH-12, OQ366361 CEVdM-2 ve MZ995262 CEVdA-1 izolatlarında 223. Bazda Timin yerine Citozin, 224. Bazda Citozin yerine, sırasıyla Timin, Adenin ve Timin, MZ995262 izolatında 225. Bazda Adenin yerine Guanin, 266. Bazda OQ366360 CEVdH-12 ve MZ995262 izolatlarında Timin yerine Guanin, 325. Bazda Guanin yerine OQ366360 CEVdH-12'de Adenin, MZ995262 izolatında Timin bazı, 344. Bazda OQ366358 CEVdA-13 izolatında Citozin yerine Guanin, 345. Bazda OQ366360 CEVdH-12'de Timin,

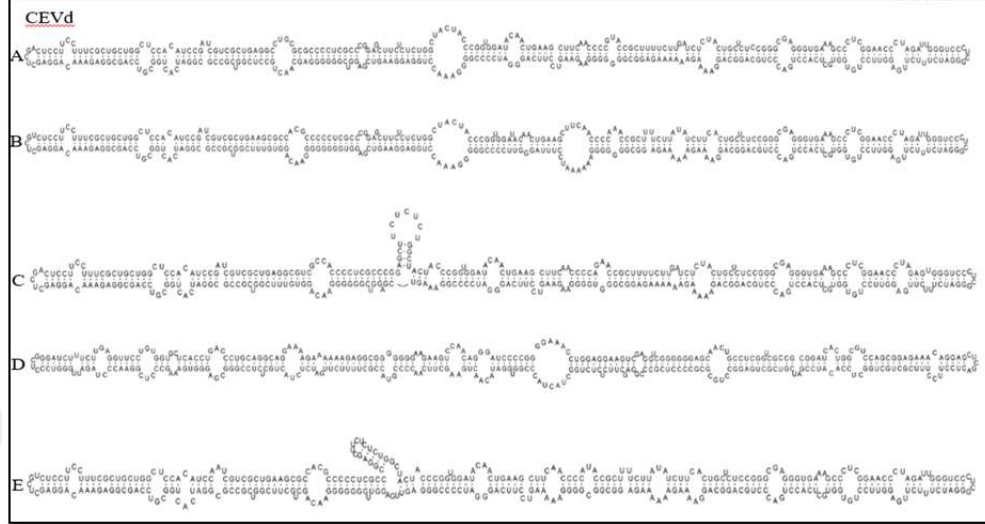
352. Bazda Guanin yerine OQ366358 CEVdA-13 ve OQ366359 CEVdM-7 izolatlarında Adenin, 355. Sırada Guanin bazı yerine OQ366358 CEVdA-13 izolatında Adenin bazının varlığı belirlenmiştir. 359, 360 ve 361. Bazda referans izolatta görülen Timin, Timin, Citozin bazları yerine OQ366361 CEVdM-2 izolatında Adenin, Adenin, Citozin bazları, OQ366358 CEVdA-13 izolatında ise 361, 366 ve 374. Sıradaki referans izolattaki Citozin, Adenin, Guanin bazları yerine Timin, Timin, - olarak belirlenmiştir (Şekil 4.55).

Genel olarak, Etrog citron bitkilerinde farklı şiddette açığa çıkan semptomların, bazı turunçgil viroid kombinasyonlarının CEVd kadar şiddetli semptomlara neden olabileceği bildirilmiştir (Ito ve ark., 2002). Turunçgil viroidlerinin karışık enfeksiyon halinde bulunması durumunda CEVd dışındaki turunçgil viroidlerinin sırasıyla CBLVd, HSVd, CVd-III ve CVd-IV'ü birlikte bulunması durumunda, üçyapraklı anaçlarında exocortis hastalığının şiddetli kabuk pullanma semptomlarının gözlemlendiği bildirilmiştir (Hadas ve Bar-Joseph, 1991). Ayrıca, yapısal alanlardaki nükleotid değişikliklerinin bazı kombinasyonlarının, yaprak epinastisi, bodurluk ve damar nekrozu gibi semptomlarla ilişkili olabileceği de farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Sano ve ark., 1992). Bu sonuçlar, çalışmamız kapsamında farklı şiddette semptom gösteren örneklerde elde ettiğimiz varyantlar arasındaki nükleotid farklılıkları ile de örtüşmektedir.

Çalışma kapsamında CEVd etmeni için elde edilen viroid RNA dizileri, RNAeval web server kullanılarak oluşturulan ikincil yapılarına bakıldığında OQ366358 CEVdA-13 ve OQ366361 CEVdM-2 izolatları referans izolatlar ile çok az farklılıkla benzer ikincil yapılara sahip olurken, OQ366360 CEVdH-12 ve OQ366359 CEVdM-7 izolatları birbirlerinden ve referans izolattan farklı olarak iki benzersiz çıkıntı oluşturmuşlardır (Şekil 4.56).



Şekil 4.55. Uluslararası Gen Bankasından seçilen referans izolat (KF973205 Şili) ile bu çalışma kapsamında analiz edilen CEVd'in 5 moleküler varyantının dizi hizalamasında gözlenen değişikliklerin (koyu renkli kutular) konumları



Şekil 4.56. CEVd için seçilen Referans izolat (KF973205 Şili) ve çalışma kapsamında elde edilen (OQ366358 CEVdA-13, OQ366360 CEVDH-12, OQ366361 CEVdM-2, OQ366359 CEVdM-7) 4 moleküler varyanta ait izolatlardan elde edilen çubuk şeklinde ikincil yapılar

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile öncelikle, Türkiye’de turunçgil üretiminin önemli bir kısmının yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesi’nde, yetiştiriciliği yapılan portakal, mandarin, limon ve altıntop türlerinde viral hastalık belirtisi gösteren turunçgil türlerinde ekonomik zarar oluşturan *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (CVd II) (CCaVd: Cachexia ve HSVd: Non-Cachexia), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd; CVd III), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd: CVd-IV), *Citrus viroid V* (CVd-V), *Citrus viroid VI* (CVd-VI) varlığının son durumu belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca Bilecik ili şerbetçi otu üretim alanlarında bulunan viroidlerin varlığı ülkemizde ilk olarak bu çalışma ile araştırılmıştır. Bu ürün grubunda bulunan HLVd etmeninin ülkemizde varlığı belirlenmiştir. Bir diğer etmen olan ve her iki ürün grubunda da bulunan HSVd’in varlığı ve tür içinde ve türler arasında moleküler olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

Turunçgil viroidlerinde seçilen izolatlarda simptomatolojik gözlemler için turunçgil viroidlerinin genel replikatörü olan Etrog citron (*Citrus medica* L.) bitkisine TNA’lerin gövde çizme yöntemi ile mekanik olarak bulaştırılmış ve simptom gelişimi gözlenmiştir. Aktarım yapılan tüm Etrog citron bitkilerinde genel bodurluk, boğum aralarının kısalması, yaprak epinastisi gözlenen başlıca simptomlar olmuştur. Şiddetli simptom geliştiren bitkilerde gözlenen bir diğer belirti ise yaprak arka yüzeyinde oluşan damar nekrozları olmuştur.

Turunçgillerde seçilen izolatlar genelde karışık enfeksiyon halinde bulunduğu için bu izolatlardan CEVd’i tek olarak izole etmek için enfekteli turunçgil ağaçlarından elde edilen TNA örnekleri mor kadife bitkilerine mekanik inokulasyon çalışmaları ile aktarılmış ve bitkilerde simptom gelişimleri gözlenmiştir. Mor kadife (*Gynura aurantiaca* L.) bitkilerinde gözlenen simptomların başlıcaları boğum arasında kısalma nedeniyle kontrol bitkilere oranla daha bodur bitki gelişimi ve yaprak epinasti simptomları olmuş, ayrıca enfekteli

Turunçgil izolatlarda, hıyar bitkilerinde şiddetli bodurluk, boğum aralarında kısılma ve kloroz oluşumu gözlenen başlıca belirtiler olmuştur.

Elde edilen ve seçilen 10 adet viroid izolatının turunc fidanlarına aşı inokulasyonu yöntemi ile aktararak stok bitkiler elde edilmiş ve böylece canlı bitki üzerinde gen bankası oluşturulmuştur. Gen bankasının oluşturulması kaynağı belli sekansla teyidi yapılmış pozitif kontrollerin canlı bitki üzerinde muhafazası amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Survey çalışması; 2016 ve 2019 yılları Nisan-Kasım ayları arasında Adana, Hatay, Mersin ve Osmaniye illerinde turunçgil üretimi yapılan alanlarda ve 2016 ve 2018 yıllarında Haziran ve Ağustos aylarında Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarında gerçekleştirilmiştir. Turunçgillerde toplamda 1212368 dekar turunçgil üretim alanından 385 adet örnek toplanmış ve 285 adet örnekte turunçgil viroidleri ile ikili, üçlü ve dörtlü olarak karışık enfekteli olduğu belirlenmiştir. Şerbetçi otunda ise toplamda 1400 dekar alandan 214 adet örnek toplanmış ve örneklerden 131 adedi HLVD etmeni, 51 adedi HSVd etmeni ile enfekteli bulunurken, 39 adet örneğin her iki etmen ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında turunçgillerde 8 adet viroid hastalık etmeninin belirlenmesi amacıyla RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiş ve 7 farklı turunçgil viroidinin

varlığı çalışılan örneklerde belirlenmiştir. Ancak CVd VI etmeni RT-PCR çalışmaları ile belirlenmesine rağmen dizi analizi çalışmalarında teyidi yapılamadığı için saptanmamış olarak kabul edilmiştir. Şerbetçi otu bitkisinde ise günümüze kadar bildirilmiş olan 4 adet viroid hastalık etmeninin varlığı çalışılmış ve 2 adet etmenin varlığı belirlenmiştir. AFCVd etmeni ile ilgili RT-PCR çalışmalarında bant elde edilmesine rağmen dizi analizi çalışmalarında sonuç elde edilememesi nedeniyle saptanmamış olarak kabul edilmiştir. Son yıllarda yapılan yeni nesil dizileme çalışmaları ile şerbetçi otu bitkilerinde varlığı bildirilen CBCVd etmeni ikinci yıl örneklerinde çalışılmış ancak hiçbir örnekte varlığı belirlenememiştir.

Turunçgiller için yapılan survey çalışmaları türler bazında incelendiğinde;

Portakalda incelenen 100 adet örnekten 17'i CEVd, 10'u CBLVd, 15'i CCaVd, 11'i HSVd (non-cachexia), 9'u CDVd, 11'i CBCVd, 4'ü CVd-V olmak üzere 77 adedi (%77) turunçgil viroidleri ile enfekteli bulunmuştur.

Mandarinde incelenen 100 adet örnekten 18'i CEVd, 9'u CBLVd, 14'ü CCaVd, 15'i HSVd (non-cachexia), 6'sı CDVd, 5'i CBCVd, 3'ü CVd-V olmak üzere 70 adedi (%70) turunçgil viroidleri ile enfekteli bulunmuştur.

Limonda incelenen 120 adet örnekten 20'si CEVd, 11'i CBLVd, 17'si CCaVd, 18'i HSVd (non-cachexia), 10'u CDVd, 11'i CBCVd, 6'sı CVd-V olmak üzere 93 adedi (%77.5) turunçgil viroidleri ile enfekteli bulunmuştur.

Altıntopta incelenen 65 adet örnekten 12'si CEVd, 3'ü CBLVd, 11'i CCaVd, 15'i HSVd (non-cachexia), 5'i CDVd, 4'ü CBCVd, 2'si CVd-V olmak üzere 45 adedi (%69.2) turunçgil viroidleri ile enfekteli bulunmuştur.

Şerbetçi otu için yapılan survey çalışmaları çeşitler bazında incelendiğinde;

Erciyes çeşidinde incelenen 75 örnekten 51'inde HLVd, 24'ünde HSVd ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Brewers Gold çeşidinde incelenen 74 örnekten 42'si HLVd, 14'ü HSVd ile enfekteli olarak belirlenmiştir.

Aroma çeşidinde incelenen 45 örnekten 26'sı HLVd, 13'ü HSVd ile enfekteli olarak belirlenmiştir. Ege çeşidinde ise, incelenen 20 örnekten 12'si HLVd ile enfekteli olarak belirlenmiştir.

Her iki bitki grubunda da yapılan tüm bu survey çalışmalarının sonucunda; viroid hastalık etmenlerinin üretim alanlarında var olduğu ve ağır simptom oluşumu ile zarar oluşturduğu ve üretim alanlarının birçoğunda yaygın olarak bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu hastalık etmeni indikatör ve stok bitkiler üzerinde çoğaltılmış, ayrıca seçilen izolatlarda gen klonlaması yapılarak klonlanmış ürünler -20 °C, -80 °C'de saklanarak gen bankası oluşturulmuştur. Bu örnekler ileride pozitif kontrol olarak bilimsel çalışmalarda ve gerekli görüldüğünde karantina kuruluşlarıyla paylaşılacak üzere değerlendirilecektir.

Turunçgillerde elde edilmiş olan izolatlar;

Çalışma kapsamında yüksek benzerlik yüzdeleri ile CEVd olduğu belirlenen izolatların, MZ995262 CEVdA-1 (Adana-1), OQ366358 CEVdA-13 (Adana-13), OQ366359 CEVdM-7 (Mersin-7) ve OQ366360 CEVdH-12 (Hatay-12), OQ366361 CEVdM-2 (Mersin-2) kayıt numaraları ile Uluslararası gen bankasına (NCBI) kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Yüksek benzerlik oranları ile CBLVd olduğu belirlenen 3 adet izolata ait fasta format verileri, NCBI veri bankasına OQ366362 (CBLVdA-3), OQ366363 (CBLVdH-5), OQ366364 (CBLVd M-8) kayıt numaraları ile kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamında yüksek benzerlik yüzdeleri ile CVd IIa olduğu belirlenen 9 adet HSVd (CVd IIa) izolatu, Uluslararası gen bankasına (NCBI); MZ995256 (HSVdM-36), MZ995257 (HSVdA-44), MZ995258 (HSVdM-40), MZ995259 (HSVdM-38), OQ366370 (HSVdA-43), OQ366371 (HSVdA-45), OQ366372 (HSVdA-1), OQ366373 (HSVdH-10), OQ366374 (HSVdH-15) kayıt numaraları ile kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamında yüksek benzerlik yüzdeleri ile CVd IIb/c olduğu belirlenen 6 adet izolatın Uluslararası gen bankasına (NCBI), OQ366365 (HSVdM-37), OQ366366 (HSVdY-5), OQ366369 (HSVdH-10), OQ366367 (HSVdT-11),

OQ366368 (HSVdT-17), MZ995260 (HSVdA-42) kayıt numaraları ile kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilmiş olan ve yüksek benzerlik yüzdeleri ile CDVd (CVd III) olduğu belirlenen izolatların Uluslararası gen bankasına (NCBI), OQ366375 (CVd IIIM-2), OQ366376 (CVd IIIA-1) kayıt numaraları ile kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilmiş olan 1 adet CBCVd (CVd IV) izolatının MZ995261 kayıt numarası ile Uluslararası gen bankasına (NCBI) kaydı gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilmiş 1 adet CVd V izolatı, Uluslararası gen bankasına (NCBI) MZ995255 kayıt numarası ile kayıt yapılmıştır.

Şerbetçi otu bitkisinde HSVd etmenine ait elde edilen izolat izolatın Uluslararası gen bankasına (NCBI), OQ366357 (HSVdB-3) kayıt numarası ile kaydı gerçekleştirilmiştir.

Şerbetçi otunda ise çalışılan, HLVd etmenine ait belirlenen 4 adet izolat, OQ366353 (HLVd-1), OQ366354 (HLVd-10), OQ366355 (HLVd-12), OQ366356 (HLVd-33) kayıt numaraları ile Uluslararası gen bankasına (NCBI) kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Survey çalışmaları sonucunda çalışılan örneklerde, viroid hastalık etmenlerine ait belirtilerin turuncğil tür ve çeşitlerine göre farklılık gösterdiği, viroid hastalık etmenlerinden birden fazlasının aynı bitkide karışık enfeksiyon halinde bulunması durumunda simptom yoğunluğunun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Portakallarda yapılan surveylerde en ağır simptomların (bodurluk, sarılık, uçtan geriye doğru kuruma) gözlemlendiği Adana ili üretim alanlarından Spring Navel çeşidinden alınan örnekte CVd I, CVd II, CVd III ve CVd V etmenlerinin karışık enfeksiyon halinde olduğu belirlenmiştir. Limonlarda ise en ağır simptomların (ana gövde, yan ve uç dallarda yoğun çatlama ve zamk çıkışları, genel sarılık, bodurluk, geriye doğru kuruma ve ölüm) gözlemlendiği Adana ve Mersin ilinde Meyer limon çeşidine ait üretim alanlarından alınan örneklerde CVd I, CVd

II, CVd III, CVd-IV ve CVd V etmenlerinin karışık enfeksiyon halinde bulunduğu belirlenmiştir. Mandarinlerde ise en ağır semptomların (genel sarılık, bodurluk, uçtan geriye doğru kuruma ve ölüm) gözlemlendiği Hatay ve Mersin illeri satsuma mandarin çeşidi üretim alanlarından alınan örneklerde CVd I, CVd IIa, CVdIIb, CVd III ve CVd V etmenlerinin karışık enfeksiyon halinde bulunduğu bitkilerde belirlenmiştir.

Survey çalışmaları sırasında seçilerek moleküler karakterizasyon çalışmalarına alınan örneklerde yapılan dizi analizlerinin sonuçları Uluslararası gen bankasında (NCBI) kayıtlı farklı ülkelere ait izolatlar ile %96-99 arasında yüksek benzerlikler göstermesi bu ülkeler arasında bitkisel üretim materyali alış verişi olması nedeniyle ülkelerin birbirleri için bulaş kaynağı olabildiğini düşündürmektedir. Bu nedenle bahçe tesisinde temiz üretim materyali çok büyük önem taşımaktadır. Surveyler sırasında bu kadar yoğun ve ağır semptomlar ile karşılaşılan üretim alanlarında bulaşıklığın fidan aşamasından aşı kalemi ile geldiğini düşündürmektedir. Ağır semptomların görüldüğü ve viroid hastalık etmenlerinin belirlendiği bahçelerde üreticilerin fidan teminini aynı bölgedeki fidancılardan yaptığını bildirmesi bunun kanıtı olmuştur. Bu nedenle viral hastalık etmenlerinin yayılmasını engellemede sağlıklı ve sertifikalı fidan kullanılarak bahçe tesisinin yapılması, viroid hastalıklarının yayılımını önlemede ilk önlem olacaktır.

Şerbetçi otunda viroid hastalık etmenlerinin varlığı ve yaygınlığı ile ilgili yapılan bu çalışma ülkemizde bir ilk olmuştur. Bu açıdan şerbetçi otu üretim alanlarında HLVd ve HSVd'in varlığının belirlenmesi, ilk kayıtlarının yapılması ve dünya izolatları ile karşılaştırılması açısından ilk çalışma olmuştur. Yapılan bu çalışmada şerbetçi otu bitkisinde HLVd'in ülkemizde varlığı ile ilgili ilk kayıt bildirimi yapılmış ve bu konu ile ilgili Zararlı Risk Analizi Raporu hazırlanmıştır.

Ayrıca HSVd'in dünya üzerinde varlığının bildirildiği ilk bitki grubu olan şerbetçi otunda elde edilen izolatlar ile bölgemiz turuncgil üretim alanlarından elde edilen HSVd varyantlarının karşılaştırılması yapılarak filogenetik akrabalıkları

ortaya konmuştur. Her iki bitki grubundan elde edilen HSVd'nin moleküler olarak karşılaştırılması sonucunda filogenetik ağaçta bu iki viroid turunçgil grubu ve şerbetçi otu grubu olarak ayrı gruplarda yer almışlardır.

Turunçgil tür ve çeşitlerinde bulunan viroid hastalık etmenleri bitkisel üretim materyalleri (aşı kalemi, aşı gözü) ve mekanik olarak (aşı bıçağı, budama makası gibi alet ve ekipmanlar üzerinde bulunan bitki özsuğu ile) kolaylıkla taşınabilmektedir. Bu nedenle, kültürel işlemler sırasında % 2'lik sodyum hipoklorit kullanımının mekanik taşınmaları engellemede başarılı olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir.

Şerbetçi otu türlerinde belirlenen iki adet viroidin de yine ülkeye girişlerinin bitkisel üretim materyalleri olduğunu düşündürmektedir. Bilecik ili Pazaryeri ilçesi şerbetçi otu üretim alanlarında fidanların temini kooperatifler tarafından sağlandığı için bu kurumların üretim materyallerinin viral etmenlerden arı olduğu testlemesini yaptırarak üretim alanlarına temiz bitkisel materyallerinin dağıtılması çok önemlidir. Ayrıca polikültür üretimin yapıldığı Pazaryeri ilçesi için geniş bir konukçu dizisine sahip olan HSVd etmeni açısından temiz üretim materyali ile üretime başlanması hastalığın yayılmasını önlemede en önemli aşamadır.

Çalışmamız sonucunda, özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi için önemli bir ürün olan turunçgillerde görülen en önemli viroid hastalık etmenleri için bir broşür hazırlanarak etmenin yayılmasını önleyici tedbirler konusunda bilgilendirmeler yapılmıştır.



KAYNAKLAR

- Adams, A. N., Barbara, D. J., and Morton, A. (1991). Effects of hop latent viroid on weight and quality of the cones of the hop cultivar Wye Challenger. *Ann. Appl. Biol.* 118(Supplement), 126–127
- Ali A., Umar U., Akhtar S., Shakeel M.T., Rehman A., Tahir M.N., Atta S., Moustafa M., Ölmez F. & Parveen R., 2022. Identification and primary distribution of Citrus viroid V in citrus in Punjab, Pakistan. *Molecular Biology Reports* volume 49, pages 11433–11441 (2022).
- Amari K., Canizares, M.C., Myrta A., Sabanadzovic, S., Shrir, M., Gavriel, I., Çağlayan, K., Varveri C., Gatt, M., Di Terlizzi, B., Pallas, V., 2000. First report on Hop stunt viroid (HSVd) from some Mediterranean countries. *Phytophologia Mediterranea* 39: 271-276.
- Ashulin L, Lachman O, Hadas R, Bar-Joseph M., 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res* 19: 4 767
- Bağcı, İ., 2005, Şerbetçiotu Tarımı. TARBES (Tarım Ürünleri ve Besicilik Sanayi ve Ticaret A.Ş.) Yayını, Pazaryeri.
- Barbara, D. J., Morton, A., Adams, A. N., and Green, C. P. (1990). Some effects of hop latent viroid on two cultivars of hop (*Humulus lupulus*) in the UK. *Ann. Appl. Biol.* 117, 359–366.
- Barbara, D. J., and Adams, A. N. 1983. American hop latent virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 262.
- Başkaya, Z., 2017, Bilecik İlinde Şerbetçiotu Üretiminin Coğrafi Esasları, Doğu Coğrafya Dergisi, Cilt:16, Sayı 25, s: 209-230.
- Baytop, T. (1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 3255, İstanbul, 520 s.

- Belabess Z., Radouane N., Sagouti T., Tahiri A. and Lahlali R., 2021. A Current Overview of Two Viroids Prevailing in Citrus Orchards: Citrus Exocortis Viroid and Hop Stunt Viroid. P.330. DOI: 10.5772/intechopen.77939.
- Benton, R. J., Bowman, F.T., Fraser, L., and Kebby, R.G., 1949. Section of citrus budwood to control scally butt in trifoliata rootstock. Agr. 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 and Cellular Probes 20, 105-13.
- Bora, T. ve Karaca, İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No.167. İzmir.
- Bove J. M., 1995. Virus and virus-like disease of citrus in the near East region. Rome, FAO: 518.
- 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.
- Cao M. J., Liu Y. Q., Wang X. F., Yang F. Y., and Zhou C. Y. 2010. First Report of Citrus bark cracking viroid and Citrus viroid V Infecting Citrus in China. July 2010, Volume 94, Number 7, Page 922, DOI: 10.1094/PDIS-94-7-0922C.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., ... Ding, S.-W. (2014). Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(40), 14613–14618.
- Chambers G. A., Bogema D. R., Englezou A., and Donovan N. J., 2020. First Report of Citrus Viroid V and Citrus Viroid VI in Australia Infecting Citrus. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2662-PDN>

- Childs, J.F.L., 1950. The cachexia disease of Orlando tangelo. Plant Dis. Rep. 34: 295-298.
- Conway, S.; Snyder, R., 2008. "*Humulus lupulus* - Hops" (PDF). College Seminar 235 Food for Thought: The Science, Culture, & Politics of Food. Hamilton College. Retrieved July 31, 2008.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S., and SAS, G. 1993. Citrus Virus and Virus like Diseases in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. In: P. Moreno, J.V. da Graca and L.W. Timmer, (eds.), Proc.12 Conf. IOCV, Riverside, CA, USA, pp. 397-400.
- De Rijk, P., Wuyts, J., & De Wachter, R. (2003). Rna Viz 2: An improved representation of RNA secondary structure. Bioinformatics, 19(2), 299–300. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.299>
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.T.J., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J.W., Sano, T., Vidalakis, G., Owens, R.A., 2014. Current status of viroid taxonomy. Arch. Virol., 159, 3467–3478.
- Diener, T. O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. Arch.Virol. Suppl. 15, 203–220.
- Diener, T.O., D.R. Smith, R.H. Hammond, G. Albanese, R. Larosa, M. Davino, 1988: Citrus-B viroid identified as a strain of hop stunt viroid. Plant Disease 72, 691-693.
- Diener, T. O., and Raymer, W.B., 1971. Potato Spindle Tuber Virus: A Plant Virus with Properties of Nucleic Acid Science, 158:378-381.
- Duran-Vila, N. and Semancik, J. S., 2003. Citrus viroids. Pages 178-194 In: Viroids. A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles and J. S. Semancik, eds. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Duran-Vila, N., and Semancik, J.S., 2003. in Viroids : Citrus Viroids, Pages 184-185.

- Duran-Vila, N., Pina, J.A., and Navarro, L., 1993. Improved Indexing of Citrus Viroids. Pages 202-211 in : Proc. 12th Conf. Int. Organ. of Citrus Virol. P. Moreno, J. V. da Graça, and L.W. Timmer, eds. IOCV: Riverside.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballesta, J.F., Juarez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamenta, R., and Semancik, J. S., 1988. The Citrus Exocortis Disease: A Complex of Viroid-RNAs. pp. 152-165. In. Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballesta, J.F., Juarez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamenta, R., and Semancik, J. S., 1988b. The Citrus Exocortis Disease: A Complex of Viroid RNAs. Pages 152-164 in: Proc 10 th Conf. Int. Org. Citrus Virol. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro, eds. IOCV:Riverside, CA.
- Eastwell, K. C. and Nelson, M. E. 2007. Occurrence of viroids in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) production areas of Washington State. Online.Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007-1127-01-RS.
- Eiras M, Silva SR, Stuchi ES, Targon MLPN, Carvalho SA (2013) Viroides em citros. Tropical Plant Pathology 34: 275-296.
- Elleuch, A., I. Hamdi, O. Ellouze, M. Ghrab, H. Fakhfakh, N. Drira, 2013: Pistachio (*Pistacia vera* L.) is a new natural host of Hop stunt viroid. Virus Genes 47, 330-337.
- Fadda, Z., J.A. Daròs, C. Fagoaga, R. Flores and N. Duran-Vila. 2003. Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family Avsunviroidae (hammerhead viroids). J Virol. 77(11):6528-32.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N., 1996. Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetable crops. Plant Pathol., 45:45-53.
- Fagoaga, C., Semancik, J. S., and Duran-Vila, N. 1995. A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): Infectivity and patho-genesis. J. Gen. Virol. 76:2271-2277. (6) (PDF) Host Effect on the Molecular and Biological Properties of a Citrus exocortis viroid Isolate from *Vicia faba*.

- FAO, 2017. www.fao.gov.tr. Erişim Tarihi-8-12-2022
- FAO, 2019. www.fao.gov.tr. Erişim Tarihi-18-12-2022
- FAO, 2020. www.fao.gov.tr. Erişim Tarihi-18-12-2022
- Fawcett, H.S., and Klotz, L.J., 1948. Exocortis on trifoliate orange. *Citrus Leaves* 28, 8.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Flores, R.; Navarro, B.; Delgado, S.; Hernández, C.; Xu, W.X.; Barba, M.; Hadidi, A.; Di Serio, F. 2017. Peach latent mosaic viroid in infected peach. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Academic Press: London, UK, 2017; pp. 307–316. ISBN 9780128014981.
- Flores, R., J. A. Daros, F. Di Serio, C. Hernandez, and A. E. Martinez de Alba. 2004. Viroids and Viroid host interactions. *Annual Review of Phytopathology*:117-139.
- Flores R., Randles J.W., Owens R.A., 2003. Classification. In: Hadidi, A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. (Eds.), *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, pp. 71-75 .
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., and Diener, T.O., 2000. Subviral Agents: Viroids. Pages 1009-1024 in: *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- Flores, R., Duran-Vila, N., Pallas, V., and Semancik, J.S., 1985. Detection of Viroid and Viroid-like RNAs from Grapevine. *J. Gen. Virol.* 66:2095-2102.
- Futch, S.H., and Brlansky, R.H., 2004. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus, *Citrus Industry Magazine* 85 (7):22-23.
- Füßy, Z., J. Patzak, J. Stehlík, J. Matoušek, 2013: Imbalance in expression of hop (*Humulus lupulus*) chalcone synthase H1 and its regulators during hop stunt viroid pathogenesis. *J. Plant Physiol.* 170, 688-695.

- Galitelli D, Minafra A (1994) Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, October 15-30. Adana-Turkey. Page: 89-99.
- García-Arenal, F., Pallás, V., and Flores, R. 1987. The sequence of aviroid from grapevine closely related to severe isolates of citrus exocortisviroid. *Nucleic Acids Res.* 15:4203-4210
- (6) (PDF) Host Effect on the Molecular and Biological Properties of a Citrus exocortis viroid Isolate from *Vicia faba*.
- Garnsey, S.M., Zies, D.L., Irey, M., Sieburth, P.J., Semancik, J.S., Levy, L., and Hilf, M.E. 2002. Practical field detection of citrus viroids in Florida by RT-PCR, p. 219-229. In: N. Duran-Vila, R.G., Milne, and J.V. da Graça (eds.). *Proc. 15th Conf. Intl. Org. Citrus Virol., IOCV, Riverside, Calif.*
- Gazel, M., Serçe ,Ç.U., Çağlayan, K. ,Faggioli, F. 2008. Sequence variability of Hop stunt viroid isolates from stone fruits in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 90, 23-28.
- 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.
- Grimm, G.R., Grant, T.J. & Childs, J.F.L.1955. A bud-union abnormality of rough lemon rootstock with sweet orange scion. *Plant Dis. Rep.*, 39: 810-811.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 70–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Guo L, Lui S, Wu Z, Mu L, Xiang B, Li S (2008) Hop stunt viroid (HSVd) newly reported from hop in Xinjiang. *China Plant Pathol* 57:764
- Güldür, M. E., 1988. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgil tür ve çeşitlerinde Xyloporosis-Cachexia Hastalık Etmeninin İndeksleme Yöntemi ile Saptanması. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. 46 p.

- 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.
- Gümüş, M., Paylan, I.C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H.M., Erkan, S., 2007. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of prunus species in Western Anatolia, Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89: 265-268.
- Hadas, R., and Bar-Joseph, M. 1991. Variation in tree size and rootstock scaling of grapefruit trees inoculated with a complex of citrus viroids. Pages 240-243 in: *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 11th. IOCV, Riverside, CA.
- Hadas R, Ashulin L, Bar-Joseph M(1992)Transmission of a citrus viroid avocado by heterologous grafting. *Plant Dis* 76: 357–359
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., 2017. (Eds.) *Viroids and Satellites*; Elsevier: London, UK, ISBN 9780128014981.
- Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S., 2003. (Eds.) *Viroids*. CSIRO Publishing: Collingwood, Australia, ISBN 0643067892.
- Hamdi I, Elleuch A, Bessaies N, Fakhfakh H (2011) Insights on genetic diversity and phylogenetic analysis of Hop stunt viroid(HSVd) population from symptomatic citrus tree in Tunisia. *Afr J Microbiol Res* 5(21):3422–3431
- Hammond, W.R., Owens, R.A., 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. Doi: 10.1094/APSnet Feature-2006-11068, 8 pp.
- Hanold, D., and Randles, J.W., 1991. Coconut Cadang Cadang Disease and Its Viroid Agent. *Plant Disease*, 75:330.
- Haunold, A., 1981. Hop Production, Breeding, and Variety Development in Various Countries. *J. Amer. Soc. Brewing Chemists*, 39: 27-34.
- Hızal, A. Y., Göral, V. T., 1987. Türkiye Turunçgil Üretimi- İhracatı ve Virüs Hastalıkları Yönünden Durumu. *Derim*, 4(1):32-42.

- Ito T, Ohta S, 2010. First report of citrus viroid V in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 76, 348– 50.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., Iwanami, T., Nakahara, K., Hataya, T., Ito, T., Isaka, M., and Kano, T. 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92:542-547.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K. and Ito, T. 2001. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed citrus viroid OS. *Arch. Virol.* 146: 975-982.,
- Ito T. & Yoshida K., 1998. Reproduction of apple fruit crinkle disease symptoms by apple fruit crinkle viroid. *Acta Horticulturae* 472, 587-594.
- Ito, T., Kanematsu, S., Koganezawa, H., Tsuchizaki, T., and Yoshida, K. 1993. Detection of viroid associated with apple fruit crinkle disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 59, 520-527.
- İncekara, F., 1964, Endüstri Bitkileri ve Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Cilt:4 No:84, İzmir.
- Jakse, J., Radisek, S. and Pokorn, T., 2015. Deep-sequencing revealed *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64 (4): 831-842.
- KarahocagıL, P., 2003. Turunçgiller, T.E.A.E Bakış, 2:11.
- Knabel, S., Seigner, L., and Wallnöfer, P.R. 1999. Nachweis des Hop latent viroids (HLVd) mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Gesunde Pflanzen* 51: 234-239.
- Koday, S., 2000, Türkiye’de Kivi Üretimi, Doğu Coğrafya Dergisi, Sayı: 3, Erzurum.
- Koganezawa, H.; Ohnuma, Y.; Sakuma, T.; Yanase, H. “Apple fruit crinkle,” a new graft transmissible fruit disorder of apple. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* 1989, C16, 57–62.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA-7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054. Epub 2016 Mar 22.
- Kunta M, Da Graca J, Skaria M, 2007. Molecular detection and prevalence of citrus viroids in Texas. *HortScience* 42, 600– 4.
- Lee JY, Lee SH, Sanger HL (1990) Viroid diseases occurring on Korean hop plants. *Korean J Plant Pathol* 6(2):256–260
- Li, R., Mock, R., Huang, Q, Abad, J., Hartung, J., Kinard, G., 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.
- Loconsole, G. Önelge, N., Yokomi, K. R. , Kubaa, R. A., Savino, V., Saponari, M., 2013. Rapid differentiation of citrus Hop stunt viroid variants by real-time RT-PCR and high resolution melting analysis. Molecular and Cellular Probes 2013, 27, 5-6, 221-229.
- Luigi, M., Manglli, A., Tomassoli, L. & Faggioli, F. (2013) First report of *Hop stunt viroid* in *Hibiscus rosa-sinensis* in Italy. *New Disease Reports*, 27, 14.
- Maddahian, M., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseinipour, A., Khezri, A. & Sano, T.(2019) Biological and molecular characterization of hop stunt viroid variants from pistachio trees in Iran. *Journal of Phytopathology*, 9, 1– 11.
- Malfitano M., Barone M., Duran-Vila N. and Alioto D., 2005. Indexing Of Viroids In Citrus Orchards Of Campania, Southern Italy. *Journal of Plant Pathology* (2005), 87 (2), 115-121.
- Matoušek, J., L. Orctová, J. Patzak, P. Svoboda, I. Ludvíková, 2003: Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil Environ.* 49, 168-75.

- Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R., Diener, T. O. (1991) Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *Journal of General Virology* 72:1-5.
- Moreira, S., 1965. Cachexia and Xyloporosis. Are they Caused by The Same Virus? Pp. 52-56. In Proc. 3rd Conf. IOCV. Univ. of Fla. Press Gainesville.
- Murcia, N.; Hashemian, S.B.; Serra, P.; Pina, J.A.; Durán-Vila, N. Citrus viroids: Symptom expression and performance of Washington navel sweet orange trees grafted on Carrizo citrange. *Plant Dis.* 2015, 99, 125–136. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Najar A., Duran-Vila N., 2004. Viroid prevalence in Tunisian orchards. *Plant Disease* 88: 1286.
- Navarro, J.A., Daròs, J.A., Flores, R., 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology*, 253, 77–85.
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Norman, P.A., 1963. Report to The Government of Turkey on Citrus Virus Diseases. FAO Report No: 1641. 16pp.
- Nour-Eldin, F. (1959). Citrus virus research in Egypt. In: *Citrus virus diseases*, 219-227. Berkeley, Div. Agric. Sci. Univ. Calif. Berkeley, CA.
- Owens RA, Sano T, Duran-Vila N., 2012. Plant viroids: isolation, characterization/detection and analysis. *Methods Mol Biol.* 2012; 894:253-71.
- Owens, R. A., Thompson, S. M., Feldstein, P. A., and Garnsey, S. M. 1999. Effects of natural sequence variation on symptom induction by citrus viroid III. *Ann. Appl. Biol.* 134:73-80.
- Önelge, N.; Yurtmen, M. 2012. First report of Citrus viroid V in Turkey. *Journal of Plant Pathology*; Dec. 2012, Supplement 4, Vol. 94, pS4.88.

- Önelge, N., 2007. Proceedings of The International Organization of Citrus Virologist : IOCV 2007.
- Önelge, N., Çınar, A., Szychowski, J.A., Vidalakis, G., and Semancik, J.S. 2004. Citrus viroid II variants associated with ‘Gummy Bark’ disease. European Journal of Plant Pathology 110: 1047-1052, 2004.
- Önelge, N., Kersting, U., Guang, Y., Bar-Joseph, M., Bozan, O. 2000. Nucleotide sequences of citrus viroids CVd-IIIa and CVd-IV obtained from dwarfed Meyer lemon trees grafted on sour orange. Journal of Plant Diseases and Protection, 107 (4), 387-391, 2000, ISSN 0340-8159.
- 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 Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 103(5), 482-487.
- Önelge, N., 1994. Turunçgillerde Hastalık Oluşturan Viroidlerin Biyolojik ve Biyokimyasal (PAGE) Tanısı Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Doktora Tezi 93s.
- Özalp, O., ve Azeri, T., 1967. Ege Bölgesi turunçgil virus hastalıkları surveyi. Bitki Koruma Bülteni 7(4): 167-187.
- Pallas, V., Navarro, A., and Flores, R. 1987. Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. J. Gen. Virol. 68:3201-3205.
- Parkinson, P. ReedRapid Pest Risk Analysis for Hop Stunt Viroid UK Food and Environment Research Agency (2013)
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., and Svoboda, P. 2001. Hop latent viroid (HLVd)- caused pathogenesis: Effects of HLVd infection on lupulin composition of meristem culture-derived *Humulus lupulus*. Biol. Plant. 44:579-585.
- Puchta, H., Ramm, K., and Sängner, H. 1991. The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. Nucleic Acids Res. 16:4197-4216.

- Puchta, H., Ramm, K., and Sanger, H. L. 1989. Hop latent viroid (HLVd), a new viroid occurring worldwide in hops. Pages 181-191 in: Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen.
- Radisek S, Majer A, Jakse J, Javornik B, Matoušek J (2012) First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia. Plant Dis 96(4):592.
- Rakowski A., Szychowski J.A., Avena Z.S., and Semancik J.S., JGen Virol 75, 358-3584, 1994.
- Randles, J.W., 2003. Economic Impact of Viroid Diseases. In: Viroids, pp. 3-11. Edited by A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 p.
- Reanwarakorn, K., and Semancik, J. S. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. Phytopathology 89:568-574.
- Reanwarakorn, K., and Semancik, J. S. 1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. J. Gen. Virol. 79:3163-3171.
- 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 Agric Res. Station (Rehovot) 12:1-49.
- Riesner, D., and Gross, H.J., 1985. Viroids. Annual Reviews of Biochemistry 54: 531-564.
- Roistacher, C.N., Bash, J.A., and Semancik, J.S., 1993. Proceedings of the Twelfth Conference of the International Organization of Citrus Virologist: IOCV 1993. P 173-179.
- Roistacher, C.N., 1991. Graft transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis, Publ. Div., FAO, Rome, 151 pp.
- Roistacher, C.N., and S.L. Kitto 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. Plant Dis. Rep. 61: 594-96.

- 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. 2013. History, Origin, And Diversity Of Hop Stunt Disease And Hop Stunt Viroid. ISHS Acta Horticulturae 1010: III International Humulus Symposium. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.1010.9
- Sano, T. 2003. Hop stunt viroid. Pages 207-212 in: Viroids. A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, and J.S. Semancik, eds. CSIRO Publ., Collingwood, Australia.
- Sano T, Mimura R, Ohshima K., 2001. Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of Hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *Virus Genes* 22:53–59.
- 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., Terai, Y., and Shikata, E., 1989. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70: 1311-1320.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Meshi, T., Ohno, T. & Okada, Y. 1985. A viroid like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *Journal of general Virology* 66, 333-338.
- Sano T., Sasaki M., Shikata E. 1981; Comparative studies on hop stunt viroid, cucumber pale fruit viroid and potato spindle tuber viroid. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 47:599–605
- Sasaki, M., and Shikata, E. 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 53:109-112.
- Scoric D., 2017. Viroid Biology. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 2017;pp. 53-61, ISBN 9780128014981.

- Semancik J.S., Duran-Vila, N., 1999. Viroids in plants: Shadows and footprints of primitive RNA. Pages 37-64 In: Origin and evolution of viruses. E. Dominge, R. Webster and J. Holland, eds. , Academic Press New York.
- Semancik J.S., Rakowski A.G., Bash J.A. & Gumpf D. J. 1997 Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of 'Valencia' orange, Journal of Horticultural Science, 72:4, 563-570, DOI: 10.1080/14620316.1997.11515544
- Semancik J.S., Duran-Vila N. 1991. The grouping of citrus viroids: Additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. In: Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, editors. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): University of California. p. 178-188.
- Semancik, J.S., Roistacher, C. N., and Duran-Vila, N., 1988. A new viroid is the casual agent of the citrus cachexia disease, p. 125-135. *In* Proc. 10th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.
- Semancik, J.S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R., Duran-Vila, N., 1988b. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. J. Gen. Virol 1988:69:3059-68.
- Semancik, J. S., Rivera-Bustamante, R., and Goheen, A. C., 1987. Widespread Occurrence of Viroid-like RNAs in Grapevines. Am. J. Enol. Viticult. 38: 35-40.
- Semancik, J.S., and Weathers, L.G., 1972. Exocortis Disease An Infectious Free-Nucleic Acid Plant Virus with Unusual Properties. Virology, 47: 456-566.
- Serra P., Eiras M., Bani-Hashemian S. M., Murcia N., Kitajima E. W., Daròs J. A., Flores R., and Duran-Vila N., 2008. Citrus viroid V: Occurrence, Host Range, Diagnosis, and Identification of New Variants. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1199>

- Serra, P., Barbosa, C. J., Daros, J. A., Flores, R., & Duran-Vila, N., 2008. Citrus Viroid V: Molecular Characterization and Synergistic Interactions with Other Members of The Genus Apscaviroid. *Virology*, 370, 102–112. doi:10.1016/j.virol.2007.07.033.
- Serra, P., Gago, S., Duran-Vila, N. 2008. A single nucleotide change in Hop stunt viroid modulates citrus cachexia symptoms. *Virus Res.* 138:130–134.
- Shikata, E. 1990. New viroids from Japan. *Semin. Virol.* 1: 107-115.
- Sipahioglu H.M., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Myrta A., 2002. Survey for detection of Peach latent mosaic (PLMVd) and Hop stunt (HSVd) viroids by dot-blot hybridization in stone fruits in Malatya. *Workshop on detection of stone fruit viruses by molecular techniques, Ankara 2002*: 8-13.
- Sipahioglu H.M., Demir S., Myrta A., Al Rwahnih M., Polat B., Schena L., Usta M., Akköprü A., Selçuk M., Ippolito A., Minafra A., 2006. Viroid, phytoplasma and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 1-6.
- Sofy, A. R., Soliman, A. M., Mousa, A. A., Ghazal, S. A. and El-DougDoug, K. A. 2010. First record of Citrus Viroid II (CVD-II) Associated with Gummy Bark Disease in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) in Egypt. *New Disease Rep.*, 21: 24.
- Soliman, T., Mourits, M.C.M., Lansink, A.G.J.M.O., Vander Welf, W., 2012. Quantitative economic impact assessment of an invasive plant disease under uncertainty e A case study for potato spindle tuber viroid (PSTVd) invasion into the European Union. *Crop Protection* 40, 28-35.
- Steger, G., & Perreault, J.-P. 2016. Structure and associated biological functions of viroids. *Advances in Virus Research*, 94, 141–172
- Steger, G., Riesner, D., 2003. Molecular Characteristics. Pages 15-29 In: Viroids, A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik (Eds.), CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 pp.

- Suzuki T, Fujibayashi M, Hataya T, Taneda A, He YH, Tsushima T, Duraisamy GS, Siglova K, Matousek J & Sano T 2017. Characterization of host-dependent mutations of apple fruit crinkle viroid replicating in newly identified experimental hosts suggests maintenance of stem-loop structures in the left-hand half of the molecule is important for replication. *Journal of General Virology* 98, 506-516.
- Svoboda, P. (1991). Clonal propagation of hop in vitro. *Crop Production* 37, 643-648 (In Czech)
- Şimşek, Ö., 2009. Bazı Turunçgil Anaçlarında Demir (Fe) Klorozuna Dayanıklılıktan Sorumlu Genlerin Sscp Markılarıyla Allelik Çeşitliliğinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Tabler, M., and M. Tsagris. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.*9:339-348.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S., 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tessitori M., Rizza S., Reina A., Causarano G., Di Serio F., 2013. The genetic diversity of Citrus dwarfing viroid populations is mainly dependent on the infected host species. *Journal of General Virology*, Volume 94, Issue 3.
- TİM, 2017. <https://www.tim.org.tr/tr/raporlar-2017>. Erişim Tarihi-26-12-2022

- Torres H., Gomez G., Pallás V., Stamo B., Shalaby A., Aouane B., Gavriel I., Kominek P., Caglayan K., Sipahioğlu M., Michelutti R., Myrta A., Fiore N., 2004. Detection by tissue printing of stone fruit viroids, from Europe, the Mediterranean and North and South America. *Acta Horticulturae* 657: 379-383.
- TÜİK, 2018. www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi-28-12-2022
- TÜİK, 2020. www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi-28-12-2022
- TÜİK, 2021. www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi-28-12-2022
- Vamenani, R., Rahimian, H., Alavi, S.M., Pakdin Parizi, A. & Mirza Razzaz, T. (2019) Genetic diversity of hop stunt viroid from symptomatic and asymptomatic citrus trees in Iran. *Journal of Phytopathology*, 167, 484–489.
- Van Cleemput, M.; Cattoor, K.; De Bosscher, K.; Haegeman, G.; De Keukeleire, D.; Heyerick, A., 2009. Hop (*Humulus lupulus*)—Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1220–1230.
- Van Dorst, H. J. M., and Peters, D., 1974, Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber, *Neth. J. Plant Pathol.* 80:85.
- Verhoeven, J.Th.J., 2010. Identification and epidemiology of pospiviroids. Thesis. Wageningen
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Phytopathology*, 96, 356–368.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., 2004. Citrus viroids: symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Disease*, 88, 1189–1197.

- Vidalakis G., Pagliaccia D., Bash J.A., Afunian M.& Semancik J.S.. 2011. Citrus dwarfing viroid: effects on tree size and scion performance specific to Poncirus trifoliata rootstock for high-density planting. *Annals of Applied Biology*. Ann Appl Biol 158 (2011) 204–217. ISSN 0003-4746. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00454.x
- Villalobos W., Rivera C., and Hammond R.W., 1997. *Rev Biol Trop* 45,983-987
- Wallace, J. M. (1978) Virus and virus-like diseases. *The Citrus Industry*, Univ. Caf. Div. Agr. Sel., 67-184.
- Wang Y, Atta S, Wang X, Yang F, Zhou C, Cao M 2018. Transcriptome sequencing reveals novel Citrus bark cracking viroid (CBCVd) variants from citrus and their molecular characterization. *PLoS ONE* 13(6): e0198022. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0198022](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198022)
- Wang, M. B., X. Y. Bian, L. M. Wu, L. X. Liu, N. A. Smith, D. Isenegger, R. M. Wu, C. Masuta, V. B. Vance, J. M. Watson, A. Rezaian, E. S. Dennis, and P. M. Waterhouse. 2008. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3275-3280.
- Yamada, S. and Tanaka, H., 1972. Damage from Eocortis in Japan . pp. 99-101. In *Proc. 5th Conf. IOCV*, Univ. Fla. Press Gainesville.
- Yamada, S., and Tanaka, H. 1972. Damage from exocortis in Japan. Pages 99-101 in: *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.*, 5th. University of Florida Press, Gainesville.
- Yamamoto, H., Kagami, Y., Kurokawa, M., Nishimura, S., Ukawa, S., and Kubo, S. 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd.* 16:49-62.

Ziegler A., Kawka M., Przybys M., Doroszevska T., Skomra U., Kastirr U., Matoušek J., Schubert J., 2014. Detection and molecular analysis of Hop latent virüs and Hop latent viroid in hop samples from Poland. Journal Für Kulturpflanzen, 66 (7). S. 248–254, 2014, ISSN 1867-0911, DOI: 10.5073/JFK.2014.07.04





ÖZGEÇMİŞ

Pakize GÖK GÜLER, İlk, orta ve lise eğitimini İçel ili Erdemli İlçesinde tamamladı. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden başarılı bir şekilde mezun oldu. 2002 yılında Yüksek Lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Bölümünde tamamladı. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümünde Doktora çalışmasına başladı. 1998-1999 yılları arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Kırıkhan MYO, Bağcılık ve Bahçe Bitkileri Programında bir süre öğretim görevliliği yaptı. 1999-2002 yılları arasında Gazi Üniversitesi Kırşehir MYO Seracılık Programında Öğretim Görevlisi olarak çalıştı. 2002-2008 yılları arasında Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitü Müdürlüğünde Mühendis olarak görev yaptı. 2008 yılından itibaren Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsünde, Bitki Hastalıkları Bölümü Viroloji biriminde Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktadır.