

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZ

Johana Yiceth MEDİNA GİL

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE *TURUNÇGİL TRİSTEZA*
VİRÜSÜNÜN YENİ İZOLATLARININ BELİRLENMESİ VE
BU İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE *TURUNÇGİL TRİSTEZA VİRÜSÜNÜN*
YENİ İZOLATLARININ BELİRLENMESİ VE BU İZOLATLARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Johana Yiceth MEDİNA GİL

YÜKSEK LİSANS TEZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 26/10/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KÜSEK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE *TURUNÇGİL TRİSTEZA VİRÜSÜNÜN* YENİ İZOLATLARININ BELİRLENMESİ VE BU İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Johana Yiceth MEDİNA GİL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Yıl:2018, Sayfa:109
Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN
: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KÜSEK

Bu çalışma, Doğu Akdeniz Bölgesi Adana, Mersin ve Hatay illerinde *Turunçgil tristeza virüsünün* (CTV) yeni izolatlarının saptanması amacıyla yapılmıştır. Toplam 11 tane turunçgil bahçesinden CTV semptomları gösteren ağaçlardan 75 tane örnek toplanmıştır. Bahçelerde bulunan bu örnekler turunç anacı üzerine aşırı portakal, altıntop, mandarin, kamkat ve kalamondin çeşitlerini içermektedir. Örneklerin moleküler karakterizasyonu belirlemek için TT-PZR uygulanmış ve primer olarak CTV-CPU primeri kullanılmıştır. Toplam 75 örnekten 8 tanesi örnek CTV ile pozitif olarak bulunmuştur. Bu örneklerden Karataş ve Mersin'den toplanan CTV-T1, CTV-T2 CTV-T3 ve CTV-T4 olarak belirlenen 4 izolat için sekans analizi yapılmış, çalışmalar sonrası elde edilen bu 4 izolat Genbank verileri ile karşılaştırılarak % 96 ile % 99 oranında eski Türkiye izolatları ile benzerlik saptanmıştır. Tüm örnekler Kaliforniya T525 izolatı ile aynı grupta kendini göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda T525 izolatı T30 ve T36 ılımlı ve şiddetli genotiplerini içermektedir. Ek olarak Türkiye izolatları Adriyatik bölgesinde Bosna, Hırvatistan, Karadağ ve Sırbistan ile yakın ilişkide olduğu saptanmıştır. Ayrıca *P. trifoliata* CTV dayanıklılık kırılması gösteren Yeni Zelanda izolatı da bu izolatlar benzer özellikler göstermiştir. Bu çalışma daha önce Çevik tarafından yapılan çalışmayı doğrulamaktadır. Bu veriler turunçgillerde gelecekte cross protection çalışmalarında kullanılması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Turunçgil tristeza virüsü*, TT-PZR, CTV izolatı, turunçgil, turunç

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF NEW <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> ISOLATES IN THE EASTERN MEDITERRANEAN REGION, AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THESE ISOLATES.
--

Johana Yiceth MEDİNA GİL

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

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN
: Year:2018, Pages:109
Jury : Asst. Prof. Dr. Orhan BOZAN
: Prof. Dr. Nüket ÖNELGE
: Asst. Prof. Dr. Mustafa KÜSEK

This study was carried out to determine the occurrence of new isolates of the *Citrus tristeza virus* (CTV) in the eastern Mediterranean region of Turkey, specifically in Adana, Mersin and Hatay provinces. 75 samples from 11 citrus orchards in which were observed symptoms of CTV were collected. Orange, grapefruit, mandarin, kumquat and calamondin most grafted on sour orange were present at the orchards. For the samples' molecular characterization, the RT-PCR test was applied using the CTV-CPU primers. 8 of the amplified samples showed positive results for CTV. These samples were designated as CTV-T1, CTV-T2, CTV-T3, and CTV-T4 and came from Karatas and Mersin orchards. The results revealed that the samples had an identity of 96-99% between our isolates and the Turkish isolates found in the GenBank databases. All our samples were grouped within the first clade together with the isolated T525 from California, which has been previously reported as containing mild and severe genotypes T30 and T36 respectively (Wang et. al. 2013). Additionally, Turkish isolates showed closeness with isolates from the eastern part of the Adriatic region (Bosnia, Croatia, Montenegro, and Serbia) which are closely related to New Zealand isolates that have been reported broken resistance in *Poncirus trifoliata*. This study confirms reports previously made by Cevik et al 2013, which suggest that Turkish isolates are a mixture of severe and mild strains of CTV. These data can be useful for the application of cross-protection programs and to avoid futures CTV epidemics in regions where rootstocks such as *P. trifoliata* are used.

Keywords: *Citrus tristeza virus*, RT-PCR, CTV isolate, citrus, sour orange

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgil üretimi, 100'den fazla ülkede dünya çapında son 10 yılda çok gelişme göstermiş ve 2016 yılında dünya çapında 124 milyon tona ulaşmıştır (FAO-STAT, 2017). Dikimi yapılan çeşitler içinde portakal, mandarin, limon ve altıntop bulunmaktadır. Türkiye, dünya çapında turunçgil üretiminde dokuzuncu sırada yer almakta ve Doğu Akdeniz bölgesi ulusal düzeyde % 84,2 oranında taze turunçgil meyvesi üretmektedir (Turunçgil tanıtım gurubu 2016).

Turunçgillerde 80'den fazla virüs ve virüs benzeri hastalıktan etkilenmektedir (Roichaster, 1991). *Turunçgil tristeza virüsü* (CTV), Asya kökenli bir hastalık olup ve geçmişte Kaliforniya, İspanya ve İsrail gibi ülkelerde ciddi ekonomik kayıplara nedeni olmuştur. Bu hastalık, *Closteroviridae* familyası içindeki virüslerin en büyük ve en karmaşık genomu içeren bir RNA virüsüdür. *Göçüren hastalığı*, *Citrus* cinsinin türlerinde, yaprak ve meyvelerde azalma ve deformasyon, verim azalması, kloroz, bodurlaşma ve en kötü durumda ağaçların ölümünü neden olmaktadır. Tür içerisinde CTV'ye en hassas türler, turunç (*Citrus aurantium*) ve bir indikatör bitkisi olarak kullanılan Meksika laym (*Citrus aurantifolia*) bulunmaktadır (Bar-Joseph ve ark, 1989).

CTV, konukçu bitkilerin floemine bulunmaktadır. CTV doğal olarak *Toxoptera citricida* ve *Aphis gossypii* gibi böcek vektörleri tarafından taşınmaktadır. Fakat *T. citricida* en etkili vektörüdür (Hermoso de Mendoza ve ark., 1988a).

Bu vektörün varlığı ülkemizde bulunmamaktadır, ancak Ilharco 2006 tarafından yapılan raporlara göre, böcek Portekiz ve İspanya'nın kuzeyinde bulunmuştur. Türkiye'de dahil olmak üzere, Akdeniz turunçgil üreten ülkelerin büyük bir kısmında patojene çok duyarlı olan turunç anacı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *Aphis gossypii* Türkiye genelinde yaygın olarak bulunmaktadır ve bu vektör geçmişte İspanya ve İsrail'de bildirilen büyük epidemilerin ortaya çıkmasına nedeni olmuştur (Ruiz ve ark., 2006). Ayrıca virüs, mekanik olarak veya

önceden infekte olmuş bitki materyalinin taşınmasıyla yayılmaktadır (Bar-Joseph ve ark, 1989).

CTV'nin üç ırk bilinmektedir (Bar-Joseph ve ark, 1989). Ani ölüm/Quick decline (D) en ölümcül ırktır, çünkü bitkilerin çok kısa zamanda geriye doğru kurumasına ve ölümüne neden olur ve hemen hemen tüm turunçgil türlerinin çoğu bu virüs ırkına karşı çok duyarlıdır. İkinci sırada gövde çukurlaşması/stem pitting (SP) olup, Meksika laymda çok belirgin bir şekilde gözlenir, genellikle bitkinin gövdesinde ciddi deformasyonlar gösterir ve ağaçların verimliliğini büyük ölçüde etkilemektedir. Son olarak, çöğür sarılığı/Seedling yellows (SY), genellikle sera koşullarında görülür ve çoğunlukla Meksika laymı ve altıntopu etkilenmektedir (Rocha Peña ve ark., 1995).

CTV'nin ilk salgını, 1931 yılında, Güney Afrika'dan Arjantin'e ithal edilen 1400 turunçgil fidanından sonra Arjantin'de rapor edilmiştir. Daha sonra, birçok yazar, Brezilya, Kaliforniya, Florida, Venezüella ve daha sonra Avrupa kıtasında ve Asya'da İspanya ve İsrail'de sırasıyla virüsün salgınlarını rapor etmişlerdir (Bar-Joseph ve ark, 1989).

Göçüren hastalığı, geleneksel olarak virüsün patojenik özelliklerini bilmek için biyolojik endeksleme yoluyla tespit yapılmakta, aynı zamanda virüsü tanılamak için pratik ve kolay bir yöntem olan ELISA, DTBIA olarak immünoenzimatik teknikleri geliştirilmiştir. Son olarak, TT-PZR gibi moleküler teknikler, virüs dizisinin çoğaltılmasına izin veren primer kullanımıyla bitkilerde virüsün varlığının doğrulanmasını sağlamaktadır.

Türkiye'de 1966'da CTV'nin varlığı bildirilmiştir (Bové 1966). Sonra ülkedeki başka turunçgil yetiştirme alanlarında varlığı belirlenen, ılımlı ırk olduğu bildirilen birçok izolat bulunmuştur. Ancak 2013'de Western blot testi ve BD-RT-PCR ile Çevik ve ark., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, daha önce Iğdır izolat hafif ve şiddetli CTV genotiplerinin bir kombinasyonu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesinde yeni izolatlar bulunmuş ve bu izolatların moleküler özellikleri ortaya konmuştur.

Bu çalışmada Adana, Mersin ve Hatay illerinde turunçgil üretim bahçeleri ziyaret edilmiştir. Arazide CTV simptomlarının görüldüğü 11 bahçede farklı türlerde turunçgil ağaçlarında 75 örnek toplanmıştır. Bahçelerde, kloroz, bodurluk, deforme meyve ve küçük yaprakları ve aşı/anaç birleşim yerinde kabuk kaldırıldığında, bitkinin odun dokusunda çıkıntılar, kabuk dokusunda girinti belirtileri gözlemlenen ağaçlardan laboratuvarında işlem ve analiz için örnekler toplanmıştır.

Total nükleik asitlerin (TNA) ekstraksiyonu için ekstraksiyon tamponu CTAB ve modifiye Murray ve Tomphson, (1980) protokolü kullanılmıştır. Virüs tanımlama, numunelerin amplifikasyonu için CTV-CPU primerlerin kullanıldığı (IDT Inc[®], USA firmadan sağlanmıştır), TT-PZR testi ile gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2013). Amplifiye edilmiş ürünleri gözlemlemek için % 1 agaroz jeli kullanılıp etidyum bromür içine daldırılmıştır. Bantlar bir UV transilluminatörü aracılığıyla görülmüştür. Sonuçlar analiz edilen 75 örneklerinin 8'in CTV için TT-PZR kullanılarak pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. 672 bp pozisyonunda net bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Bu çalışmada elde edilen izolatlardan dördü sekanslanmıştır (CTV T1, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4). Diziler, GenBank'ta yer alan bilgilerle benzerlik oranlarının karşılaştırılması için bir BLAST olan NCBI veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Türkiye izolatlarının (CTV-T) benzerlik yüzdesini, aralarındaki benzerliği %96 ile %99'u arasında ve karşılaştırıldıkları diğer ülkelerin izolatları arasında %91 ile %100 olduğu bulunmuştur. Kaliforniya'dan T525 ve CCTEA-108, Bosna'dan B11 ve Hırvatistan ve Karadağ gibi doğu Adriyatik ülkelerinin sekansları, Türkiye izolatları ile yüksek derecede benzerlik gösterilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen izolatların nükleotid dizilimler ve filogenetik analizleri MEGA10 programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen 4 izolatın nükleotid dizilimler 50 farklı nükleotid dizisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar 7 genotip grubun oluşumunda ortaya çıkmıştır. CTV T1, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4 izolatları, Wang ve ark (2013)'a göre hafif şiddetli olarak karakterize edilen

Kaliforniya'dan T525 izolatu ile birlikte aynı filogenetik grup bulunmaktadır. Ayrıca T30 ve T36 genotiplerinin bir kombinasyonuna sahiptir, bu nedenle daha önce Türkiye'de bildirilen çalışmaların yanı sıra genotiplerin bir karışımı olduğu düşünülmektedir (Çevik ve ark., 2013).

Buna ek olarak varlığı (Şekil 4.25) Adriyatik ülkeleri bu çalışmada elde edilen izolatların çok yakın bir genetik benzerlik görülmüştür. Cerni ve ark., (2009), bitki materyallerinin Türkiye ve Japonya'dan Adriyatik bölgesine taşındığını; sekanslarındaki benzerliklerin nedenlerinden biri olabileceğini, taşınan bitki materyali CTV izolatlarının bir kaynağı oluşturabileceğini bildirilmiştir.

Bu çalışma, daha sonraki çalışmaların yanı sıra çapraz koruma programlarının uygulanması ve iyileştirilmesi için bir referans görevi göreceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Her Őeyden önce, profesyonel meslek yaŐamımda bu büyük adımı atmamı sağladığı için Tanrı'ya Őükrediyorum. Bu süreçte beni uzaktan desteklediği için aileme teşekkür ediyorum. Orhan Bozan hocama bana inandığı için, Őefkatli davrandığı için, bitki hastalıkları hakkında bana öğrettikleri için, Türkiye'nin ve Türk insanlarını en güzel yüzünü bana gösterdiği için ona teşekkür ederim.

Nüket Önelge'e sevgiyle birçok Őeyi öğrettiği ve kalbini bana açtığı için ve Çukurova Üniversitesi'nin Turunçgil Virüsleri Laboratuvarındaki tüm çalışma gurubuma bana yardımları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	11
2.1. Dünyada CTV hastalığı.....	11
2.2. Türkiye de CTV.....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	31
3.1.2. Total Nükleik Asitleri (TNA) ekstraksiyonu için kullanılan Materyal.....	31
3.1.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR/RT-PCR) için kullanılan Materyaller.....	32
3.1.4. Elektroforez için kullanılan materyal.....	33
3.1.5. Araştırma Alanı.....	33
3.2. Metot.....	35
3.2.1. Arazide Belirtilerin tanınması ve bitki materyali elde edilmesi.....	35
3.2.2. TNA ekstraksiyonu Çalışmaları.....	36
3.2.3. Primerler.....	38
3.2.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR) Testi.....	38
3.2.5. Elektroforez Çalışmaları.....	39

3.2.6. PZR ürünlerinin sekans analizi ve filoetik karşılaştırılma çalışmalar	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Örnek toplanma ve arazide semptomları gözlenme çalışmaları ilgili bulgular	41
4.2. Moleküler çalışmalar ilgili bulgular	58
4.3. Sekansların analizi.....	59
4.4. Dendogram oluşturmasının ve analizleri.....	75
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	2016'da turunçgil üretimi miktarları.	1
Çizelge 1.2.	Türkiye'de Turunçgil Üretim miktarları ve Üretim Alanları	2
Çizelge 1.3.	Türkiye'de ticari üretim yapılan alanlarda kullanılan anaçlar	6
Çizelge 2.1.	Türkiye'de bulunan bazı virüs ve virüs benzeri hastalıklar.....	24
Çizelge 3.1.	TNA ekstraksiyonlarının yapılması için kullanılan CTAB protokol malzemeler.....	32
Çizelge 3.2.	TT-PZR işlemi için kullanılan kimyasallar.	32
Çizelge 3.3.	Örnek alınan bahçelerle ilgili bilgiler.....	36
Çizelge 3.4.	100 ml CTAB bufferin hazırlanmasını için gerekli malzemeler.	37
Çizelge 3.5.	PZR çalışması için aşamalar ve zamanlar.	39
Çizelge 4.1.	RT-PZR ile pozitif olduğu belirlenen örnekler, bulunduğu yerler (bahçeleri) görülmektedir.....	59
Çizelge 4.2.	CTV -T1 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.....	68
Çizelge 4.3.	CTV- T2 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.....	70
Çizelge 4.4.	CTV- T3 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.....	72
Çizelge 4.5.	CTV- T4 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1.	CTV'nin ülkeler bazında dağılımı,	12
Şekil 2.2.	Harper (2013) yılı çalışmasında analiz edilen CTV izolatlarının filogenisi, virüsün en önemli ırkları belirtilmiştir. Kırmızı işareti HA16-5 (Hawaii'dan) şüpheli ve gurupsuz yeni bir izolat ifade edilmektedir.	17
Şekil 2.3.	Turunçgil bahçelerinde CTV nin semptomları: <i>A-B</i> (stem pitting, balık dişi gibi çıkıntılar) <i>C</i> (kabukta bu çıkıntılara uygun girintiler (pin holing)), <i>D-E</i> (ağaçların bodurluğu ve kloroz).....	19
Şekil 3.1.	Doğu Akdeniz Bölgesi'nde gezilmiş turuncgillerin bahçelerin haritası.....	34
Şekil 4.1.	Doğu Akdeniz bölgesi'nde illere göre alınan örnek sayıları.....	42
Şekil 4.2.	Bodurluk veya gelişme geriliği (Sarı yapraklar).....	43
Şekil 4.3.	Bodurluk veya gelişme geriliği (Bodurluk ve az yapraklar).....	44
Şekil 4.4.	Ağaçta kloroz.....	45
Şekil 4.5.	Ağaçta dal kurumaları.....	46
Şekil 4.6.	Ağaçta genel az yapraklık, küçük yaprak oluşumu.....	47
Şekil 4.7.	Ağaçta küçük yaprak oluşumu, genel olarak çalılışma. Sağlıklı ağaç (A), ve infekteli ağaç (B) görüntü nasıl olduğunu gözlenmektedir.....	48
Şekil 4.8.	Aşı birleşme noktasında kahverengileşme (uyumsuzluk ve nekroz); odun ve kabukta gözükmektedir.....	49
Şekil 4.9.	CTV nin varlığını uyumsuzluğu birleşme noktasında deformasyon oluşturur (A,B).	50
Şekil 4.10.	Kabukta çıkıntılara uygun girintileri (pin holing) gözükmektedir.....	51
Şekil 4.11.	Kabukta çıkıntılara uygun girintileri (pin holing) gözükmektedir.....	52

Şekil 4.12. Tam aşı birleşme noktasında turunç bölümünde çıkıntılar, bulunmaktadır.....	53
Şekil 4.13. CTV sebebiyle Aşı birleşme noktasından aşağıya doğru turunç bölümünde 'balık dişi' (parankima dokularında anormal bir büyümesi meydana getirir) şekilde çıkıntılar görülmektedir.	54
Şekil 4.14. CTV sebebiyle Aşı birleşme noktasından aşağıya doğru turunç bölümünde 'balık dişi' (parankima dokularında anormal bir büyümesi meydana getirir) şekilde çıkıntılar görülmektedir.	55
Şekil 4.15. CTV infekteli ağaçta aşı birleşme nokta farklıları görülmektedir.....	56
Şekil 4.16. Sağlıklı bir ağaçta aşı birleşme noktası.....	57
Şekil 4.17. CP'den TT-PZR ile amplifikasyonun analiz jel görüntüsü. Yaprak sapları ve kabuktan elde edilen cDNA, CTV-CP-U primer ve cDNA sentezi için kullanılan adaptör dizisi primerinin bir kombinasyonu kullanılarak TT-PZR için template olarak kullanılmıştır. Agaroz %1 jel elektroforezi ile elde edilen TT-PZR ürünlerinin bromid boyaması yapılmıştır.....	58
Şekil 4.18. MEGA10 ile analiz edilen sekansların dizileme görüntüsü.....	61
Şekil 4.19. NCBI GenBank platformunda kayıtlı bazı izolatların genom dizileri ve CTV-T2 izolatla karşılaştırılmasının görüntüsü.	62
Şekil 4.20. NCBI GenBank CTV-T1 izolatı ile sekans karşılaştırılmada bazı yüzdeleri göstermektedir, en yakın ilişki Kaliforniya izolatları görülmektedir.....	63
Şekil 4.21. NCBI GenBank CTV-T2 sekans karşılaştırılmada bazı yüzdeleri göstermektedir. Bu sekans Iğdır izolatla ve farklı çevik tarafından rapor edilmiş Türkiye izolatları ile en yakın ilişkileri gösterilmektedir.	64

- Şekil 4.22. NCBI GenBank CTV-T3izolatı sekans karşılaştırılmalarında bazı yüzdeler gözlemlenmektedir. Bu izolat, Iğdır izolatı % 99 bir benzerlik yüzdesi bulunmuş ve Bosna izolatları en yakın ilişkileri görülmüştür.....65
- Şekil 4.23. NCBI GenBank CTV-T4 izolatının sekans karşılaştırılmasındaki yüzdeler görülmektedir. Iğdır izolatı % 99 bir benzerlik bulunmakta ve çevik tarafından rapor edilmiş Türkiye izolatları ile en yakın ilişkileri gösterilmektedir.....66
- Şekil 4.24. Evrimsel olarak Türkiye’de bu çalışmadaki izolatlar ile eski Türkiye izolatları arasındaki genetik ilişkiler gösterilmektedir.77
- Şekil 4.25. Benzerlik gösteren ilk 50 sekanstan dendogram filogenetik ilişkileri gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre 7 tane büyük gurup gözlemlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar (CTV-T1, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4) T525 Kaliforniya izolatları ile aynı grubunda yer almıştır.78

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrad Derece
CTV	: <i>Citrus tristeza virus</i>
cDNA	: Complementary DNA
CP	: Coat Protein
CPm	: Coat Protein Minor
D	: Decline
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich ELISA
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
diRNA	: Defective Ribonucleic Acid
dsRNA	: Double Stranded Ribonucleic Acid
DTBIA	: Direct Tissue Blot Immunoassay
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ha	: Hektar
MT	: Milyon Ton
MY	: Market Yılı
g	: Gram
gRNA	: Genomic Ribonucleic Acid
H ₂ O	: Su
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
RB	: Resistance Breaking
BD- RT-PCR	: Bidirectional Reverse Transcriptase Polymerease Chain Reaction
RNA	: Ribonucleic Acid
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
sgRNA	: Subgenomic Ribonucleic Acid
SP	: Stem Pitting

SSCP	: Single Strand Conformation Polymorphism
ssRNA	: Single Stranded Ribonucleic Acid
SY	: Seedling Yellows
TNA	: Total Nükleik Asitleri
TT-PZR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Revolutions Per Minute
μ l	: Microlitre
u	: Unite

1. GİRİŞ

Turunçgil tarımı, Dünyada ve Türkiye’de son yıllarda önemli ve hızlı gelişmeler göstermiştir. Altı kıtada (Afrika, Kuzey Amerika, Güney Amerika, Asya, Avrupa (Akdeniz) ve Okyanusya) ve 100'den fazla ülkede ticari turunçgil üretimi yapıldığı bildirilmiştir (FAO, 2017).

2016 yılında Dünyanın turunçgil toplam üretimi 124,3 milyon ton (MT) olarak gerçekleşmiştir (FAO, STAT 2017). Dünyadaki üretimi ve ticareti yapılan en önemli turunçgil gurupları portakal, mandarin, limon ve altıntoptur. 2016 yılında 67,2 MT portakal, 33,0 MT mandarin, 16,0 MT limon ve 8,3 MT altıntop üretilmiştir (FAO, STAT 2017). En önemli turunçgil üreticileri: Çin, Brezilya ve Hindistan olup Türkiye dokuzuncu sırada bulmaktadır (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. 2016’da turunçgil üretimi miktarları. (FAO, STAT., 2017)

Ülke	Toplam Üretim (bin ton)
<i>Dünya</i>	<i>124. 246,0</i>
Çin	32. 705,9
Brezilya	16. 555,1
Hindistan	9. 755,8
ABD	7. 829,0
İspanya	6. 882,0
Meksika	6. 634,0
Mısır	4. 930,4
Iran	4. 067,6
Türkiye	3. 652,1

2016/2017 yıllarında Türkiye’de: yaklaşık 3,7 MT portakal, limon, mandarin ve altıntop üretilmiştir (Çizelge 1.2.). Türkiye % 2.7 pay ile turunçgil üretiminde dünyada dokuzuncu sırada yer almaktadır. Türkiye’de üretilen turunçgillerin % 63’ü iç piyasada tüketilmektedir (USDA–FAS, 2017). Toplam

880 milyon dolar değerinde turunçgil ihraç edilmektedir. En çok ihracat yapılan yerler Rusya ve Irak, ardından Ukrayna'dır (USDA-FAS, 2017).

Türkiye'de 2016 yılında turunçgil üretim alanları yaklaşık 135 bin hektar alana çıkmıştır (TÜİK, 2017). Türkiye'nin turunçgillerinin %84,2'si Akdeniz bölgesinde üretilmektedir (Turunçgil tanıtım gurubu, 2016). Türkiye genelinde toplam turunçgil üretiminin % 26,6'sı Adana, % 24,5'i Mersin, % 21,1'i Hatay'da üretilmektedir. Adana bölgesinde turunçgil üretiminin % 60'ını mandarin, % 10'unu portakal, % 5'ini limon ve % 5'ini altıntop oluşturmaktadır (TÜİK, 2017).

Çizelge 1.2. Türkiye'de Turunçgil Üretim miktarları ve Üretim Alanları (TÜİK, 2017).

Ürün	Toplam Üretim (ton)	Toplam Alanı (ha)
Portakal	1.850.000	52.696
Mandarin	1.337.037	46.569
Limon	850.600	30.033
Altıntop	253.120	6.155

Türkiye turunçgil üretim miktarlarında 2007 yılından 2016 yılına kadar % 44'lük bir artış gerçekleşmiştir. Günümüzde toplam 4,29 milyon ton turunçgil meyvesi üretimi gerçekleşmiştir (TÜRKTÖB, 2017). Turunçgil üretim alanlarına 24 bin hektar eklenmesi, daha verimli çeşitlerin kullanılması, profesyonel bakım tekniklerinin gelişmesi, tarımsal desteklerin artması ve Doğu Akdeniz Bölgesinin uygun ekolojik özellikleri nedeniyle turunçgil üretim yıldan yıla artmış ve artmaya devam etmektedir.

Turunçgillere ve diğer bitkilere zarar verebilen; hastalık, zararlı ve yabancı otlar bulunmaktadır. Turunçgil üretiminde karşılaşılan sorunların başında hastalıklar ve bu hastalıklar içinde virüs ve virüs benzeri hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıklar; ağaçlarda verim azalması, meyve, kök, gövde ve yapraklarda deformasyonlar bunun yanında, bitkilerde

anormal gelişimler, bodurluk problemleri ve hatta ağaçların ölümüne neden olabilmektedir.

Turunçgil virüs hastalıkları; bulaşık üretim materyali, mekanik taşınma ve vektörler aracılığı ile yayılmaktadır (Timmer ve ark., 2002). Dünyadaki turunçgil üretim alanlarında yaklaşık 80 virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmiştir (Roistacher, 1991).

Turunçgil yetiştiriciliği için en önemli viral hastalıklardan biri *Turunçgil tristeza virüsü* [*Citrus tristeza virus* (CTV)]'dür (Bar-Joseph ve ark., 1989). CTV'ye karşı turunç anacı (*Citrus aurantium*) oldukça duyarlıdır, ayrıca turunç anacı Türkiye turunçil üretiminde kullanılan en önemli anaçtır. Hastalığın dünyadaki önemi kaçınılmazdır ve turunçgiller tarihinde en çok araştırılan hastalıktır. Dünya genelinde turunç (*Citrus aurantium*) üzerine aşılanan milyonlarca ağacın geriye doğru kurummasına ve ölümlerine sebep olmuştur (Garnsey and Lee, 1988). Aynı zamanda altıntop ve portakal gibi çeşitlerde de ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Moreno ve ark., 2008; Rocha-Pena ve ark., 1995); Üreticiler ve araştırmacılar küresel turunçgiller endüstrisini sürekli tehdit eden bu sorunun çözümünde sürekli bir mücadele içindedirler.

Turunçgil tristeza virüsü (CTV), *Closterovirus* cins, *Closteroviridae* familyası), turunçgil üretiminin seyrini değiştiren, yıkıcı epidemilere neden olan bir hastalık etmenidir (Moreno ve ark., 2008). Bu hastalık, *Rutaceae* familyasına ait türlerin floem hücrelerinde bulunmakta ve farklı afid türleri (*Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. crassivora*, *T. aurantii* vb) ile taşınmaktadırlar. CTV; *Poncirus* cinsi gibi virüse tolerant gösteren anaç gurupları olsa bile, pek çok turunçgil türlerini, çeşitlerini, hibritlerini, bazı akraba turunçgil türlerin infekte edebilmektedir (Bar-Joseph ve ark., 1989).

CTV, yaklaşık 2.000 nm uzunluğunda ve 10-12 nm çapında uzun, esnek ve lifli virionlara sahiptir (Karasev ve ark., 1995, Moreno ve ark., 2008). Virionlar, 5.4-6.5 x 16 daltonluk tek iplikçikli bir RNA (ssRNA) içerir, pozitif ve bölünmemiş polariteye sahiptir (Cambra ve Moreno, 2000; Moreno ve ark., 2008).

CTV, bitkileri etkileyen tüm virüsler içinde en uzun RNA genomuna sahiptir (Manjunath ve ark., 2000).

RNA virüslerinin çoğunda olduğu gibi, CTV'de bitkide bir arada bulunan ve yüksek düzeyde genetik ve fenotipik çeşitlilik gösteren bir genetik varyant vardır; CTV'nin Closterovirus cinsinin belki de en karmaşık türlerinden biri olduğu düşünülmektedir (Moreno ve ark., 2008). Enfekte olan ağaçlarda, daha önce tarif edilen (ssRNA) basit iplikler ve subgenomik RNA (sgRNA) ve defektif RNA (diRNA) tarafından oluşturulan çift iplikli RNA (dsRNA) gibi farklı tiplerde RNA'nın bulunmaktadır (Manjunath ve ark., 2000).

Yıllar boyunca ağaçlarda bulunan farklı CTV ırklarının RNA'sı, CTV ile enfekte edilen yaprak bitleri tarafından tekrarlanan enfeksiyonların yanısıra anormal veya kusurlu viral RNA (birikmiş mutasyonlar) ve homolog rekombinasyonlar; bunlar içinde değişkenlik sonucu farklı bir CTV genotipler oluşmuştur. Buna ek olarak, bu farklı sekanslar, yarı tür özelliklerini gösteren çok özel yapılar sunabilmektedir. Bütün bu değişkenler, CTV'nin geçmişten gelen genetik seviyesinde farklılık yaratmaktadır (Harper ve ark., 2008).

Dodds ve Bar-Joseph, (1983) *Closterovirus* ile enfekte olmuş bitkilerde molekül ağırlığı saptanan ssRNA genomunun yaklaşık iki katı büyüklüğünde dsRNA parçacıkları bulmuşlar ve bunları virüsün çoğalma biçimleri ile ilişkilendirmiş, dsRNA'lar, portakal, turunç, Meksika laymı, altıntop ve *C. excelsa* konukçu bitkilerinde oldukça fazla, altıntop ve turunçta daha az miktarda dsRNA saptamışlardır.

Farklı izole edilmiş CTV genomlarının birkaç bölgesini analiz ederek yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı yerlerde bulunan CTV genomlarının, farklı patojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Rekombinasyonları muhtemelen *Tristeza*'da sık görülebileceği; büyük olasılıkla CTV'nin en az iki ya da üç farklı genotipinin gelişebileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak homolog olmayan rekombinasyonların sıkça gerçekleştiği ve bunların sgRNA'nın iki ucunu içeren dsRNA'a ürettiği ancak bu bölgelerde orta bölgenin kısımlarının bulunmadığı

gösterilmiştir (Moreno ve ark., 2008). Bugüne kadar literatüre göre analiz edilen birkaç CTV izolatının viral genom sekanslarında tanımlanan farklılıklara rağmen, sınıflandırılma çalışmalarında CTV, sadece bir tür olarak kabul edilmiştir (Manjunath ve ark., 2000).

Cambra ve ark. (1993), Broadbent ve ark., (1996) ve Albiach-Martí ve ark., (2000b), infekteli bir bitkiden, bir CTV izolatını sağlıklı bir bitkiye yaprak bitleri yoluyla taşınması ile ilk izolattan farklı olarak değişik özellikler gösteren izolatların meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Dünya turunçgil üretiminde büyük kayıplara neden olan *Turunçgil tristeza virüsü* 'nün üç ırkı vardır ve bunların semptomları genellikle turunç veya Meksika laym çeşitleri görülmektedir. İlk olarak, ağaçlarda solgunluk üreten ve turunç anaçlarına aşılana hemen hemen tüm turunçgil türlerini (limon dışında) etkileyebilen en şiddetli ırkı olan "ani ölüm" (*Quick decline*)'dür. Bu patojenden kaynaklanan ikinci sendrom, "gövde çukurlaşması" (stem pitting) olup, anaç kullanmaksızın semptom gösteren duyarlı bitkiler Meksika laymı ve portakal çeşitlerinde gözlemlenmektedir (Bar-Joseph ve ark., 1989; Roistacher, 1991; Cambra ve Moreno, 2000).

Üçüncü sendrom, turunç, limon veya altınopta görülebilen çöğür sarılığı veya "seedling yellows" ve genellikle sera koşullarında oluşmaktadır. Bu sendromların görülme sıklığı, izolatlar ve etkilenen türlere göre değişmektedir (Rocha Peña ve ark., 1995).

Göçüren hastalığı, doğal olarak Rutaceae familyasına ait cins ve türleri etkilemekte, özellikle *Citrus* ve *Fortunella* cins ve melezlerinde daha etkilidir. Bununla birlikte, *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium*, *Severinia* ve *Swinglea* gibi diğer cinslerde CTV tarafından etkilendiği rapor edilmiştir (Bar-Joseph ve Lee., 1990, Bar-Joseph ve ark., 1989, Yoshida 1996, Cambra ve Moreno, 2000 Moreno ve ark., 2008). *Passifloraceae*

familyasına ait bazı türlerde laboratuvar koşullarındaki çalışmalarda kullanılmaktadır (Müller ve ark., 1974).

CTV bir anaç hastalığı olarak kabul edilir, bu nedenle CTV ile etkilenen ülkelerin çoğunda virüse karşı dayanıklı anaç kullanılmaktadır. Tablo 1.3 'de Türkiye'de kullanılan ticari turunçgil anaçları görülmektedir.

Çizelge 1.3. Türkiye'de ticari üretim yapılan alanlarda kullanılan anaçlar (Tuzcu ve ark., 1995).

İsim	Bilimsel adı
Turunç	<i>Citrus aurantium</i> L.
Üç Yapraklı Portakal	<i>Poncirus trifoliata</i> .
Carrizo ve Troyer Sitranjları	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf
C-35 Sitranjı	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. X <i>Citrus sinensis</i> . Osb. "Ruby"
Volkameriana	<i>Citrus volkameriana</i> V. Ten. Pasq
Sitrumelo 1452	<i>Poncirus trifoliata</i> Raf. x <i>Citrus paradisi</i> Macf. var. "1452"

Yaprak bitleri tarafından taşınan CTV; afidin türlerine, konukçularına, virüsün ırklarına ve çevre koşullarına bağlı olarak şok belirtileri ve önemli enfeksiyon oranlarına ulaşarak yoğun miktarda epidemiyi yapabilir (Wallace ve ark., 1956; Bar-Joseph ve Loebenstein 1973; Raccach ve ark., 1980; Hermoso de Mendoza ve ark., 1984, 1988b; Roistacher ve Bar-Joseph 1987; Yokomi ve Garnsey, 1987; Hermoso de Mendoza ve ark., 1988a).

Toxoptera citricida, turunçgillerin önemli bir zararlısıdır ve aynı zamanda CTV'nin en etkili vektörüdür (Wallace ve ark., 1956). Bu vektör, turunçgil üretim alanlarında yaygın olarak bulunur ve bulunmadığı yerlerde hastalık; *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. crassivora*, *T. aurantii* ve *Myzus persicae* tarafından taşınmaktadır (Roistacher ve Bar-Joseph, 1987). Bu afid türleri virüsün taşınmasında daha az etkili olmasına rağmen, enfeksiyon sürecinde, bu tür

vektörlerin popülasyonunun fazla olduğu durumlarda ağır epidemilere neden olabilmektedir (Marroquín ve ark. 2004).

Bu yaprak bitleri, virüsü semi-persistent olarak taşımaktadır. Sindirim sisteminde dolaşımsız formda ve birkaç saniye ile bir saat arasında değişen böcek vücuduna geçme süresine (acquisition period) sahiptir. Virüs, böcek vücuduna geçtikten sonra 24 ila 48 saat sonra virüsün bulaşmasını sağlamaktadır (Rocha-Peña ve ark., 1995; Cambra ve ark., 2000a ve 2000b).

T. citricida, ağaçların yapraklarında popülasyonlar oluşturur ve bitkiler üzerine beslenirken, bitkinin yaprak yüzeyinde mantarların büyümesini teşvik eden şekerlerden oluşan balımsı bir madde üretir. Yaprak bitlerinin dışkısından kaynaklanan şekerli madde üzerinde üreyen mantarlar (Fumajin), fotosentez oranında azalma, ağaç hacminde küçülme ve en sonunda meyve kalitesinde düşme görülmektedir (Sagarpa, 2009). Bununla birlikte, *T. citricida* 'nın turunçgillerdeki asıl zararı *Turunçgil tristeza virüsü*'nü taşımasından dolayı oluşturduğu zarardır (Sagarpa, 2009).

CTV'yi taşıyan en etkin vektör *T. citricida* olarak bilinmesine karşın, etkili olarak taşımadığı halde, ülkemiz turunçgil bahçelerinde hastalığı taşıyabilen başka vektörler bulunmaktadır (Baloğlu, 1988, Çınar ve ark., 1993, Korkmaz, 2002). Akdeniz havzasında, CTV *Aphis gossypii* tarafından iletilir. Ancak, bu vektörün hastalığı taşıma etkinliği ve *T. citricida*'nın taşıma etkinliğinininkinden 20 kat daha azdır (Costa ve Grant, 1951; Dickson ve ark., 1951). Bazı turunçgil üreten ülkelerde, *T. aurantii* ve *Aphis gossypii* gibi vektörler hastalığın yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Timmer ve ark., 2002).

Bazı yazarlar, CTV'nin *A. gossypii* ve *T. citricida* vektörleri ile taşınmasında bölgesel koşullar ve zamana bağlı olarak farklılıklar olabileceğini bildirmektedir (Gottwald ve ark., 1998, Cambra ve ark., 2000a). Bu görüşlere göre, *A. gossypii* belirli bir bölgede mevcut olduğunda, virüs yoğunluğu sekiz ile on beş yıl arasında bir zamanda infeksiyon oranı % 5'ten % 95'e kadar çıkabilir, böylece nispeten uzak olan bahçelerde CTV, rastgele ve dağınık bir dağılım gösterebilir.

Ancak, baskın vektör *T. citricida* ise aynı artışlar, iki ila dört yıl arasında değişen daha kısa sürelerde meydana gelir ve bahçelerde hastalık dağılımı daha düzenli hale gelir ve virüs komşu bahçelere taşınabilmektedir (Gottwald ve ark., 1996b, 1998 ve 1999).

CTV 'nin tanımlanmasının birçok yolu vardır. Doğu Akdeniz Bölgesi gibi anaç olarak turuncun kullanıldığı bölgelerde görülen ilk belirtiler ağaçlarda bodurlaşma ve bu bodurlaşma gösteren ağaçlarda aşu birleşme noktasında turuncu yani anaç kısmında kabuk kaldırdığımızda odun yüzeyinde iğne ucu veya balık dişi şeklinde çıkıntılar ve kabuk dokusunda bu çıkıntılara karşı gelen girintiler bulunmaktadır. Ancak bu sadece bir ön tanı olarak kullanılır; sonrasında CTV varlığını teyit edebilmek için laboratuvar testlerinin yapılması gerekmektedir.

Geleneksel yöntemlerin içinde ilk başta gelen seralarda yapılan biyolojik indeksleme bulunmaktadır. Bu yöntem hastalığa duyarlı çeşitlerin tohumlarından üretilmiş sağlıklı indikatör bitkilerine inoküle edilmesinden oluşur. Bu bitkilere inoküle edilen dokularda hastalık bulunması durumunda, hastalığa tepki göstermekte ve birkaç ay sonra hastalığın tipik belirtileri meydana gelmektedir (Roistacher, 1991, Garnsey ve ark., 1995). Bu test, spesifik olmakla birlikte izolatların virülensliğinin belirlenmesi izin verirken, diğer yandan pahalı ve uzun süreli bir metot olduğu yoğun örnekleme gerektirdiğinden çok fazla önerilmemektedir (Bové ve ark., 1988).

Biyolojik indeksleme çalışmaları sonrası CTV'nin purifikasyonu ile birlikte serolojik yöntemler ve immünoenzimatik teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar, mono veya poliklonal antikorların kullanımından oluşmuş ve CTV'nin saptanması için en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmiştir (Bar-Joseph ve ark., 1979, Cambra ve ark., 1991, Garnsey ve ark., 1993, Gonsalves ve ark., 1978; Nikolaeva ve ark., 1998; Permar ve ark., 1990; Vela ve ark., 1986). Bu yöntemler spesifik antijen-antikor tanıma ve kombinasyonuna izin vermiş (Abbas ve ark., 1991; Matthews, 1991) ve virüsün hızlı ve ekonomik olarak tanımlanması sağlamıştır, ancak bu yöntem CTV izolatlarının, özellikle patojenik özelliklerinin,

belirlenme sürecinde spesifik olarak kısıtlamaları barındırmaktadır (Permar ve ark., 1990; Nikolaeva ve ark., 1998; Ruiz-Garcia ve ark., 2009).

Günümüzde, reverse-transcription polimerase chain reaction (RT-PCR) ve gerçek zaman (real time-PCR) gibi moleküler teknikler kullanılmaktadır; bunlar virüs genomunun kısa sekansları olarak bilinen primerler kullanılarak yapılır (Ayllón ve ark., 2001; Loeza-Kuk, 2008). Sonra hibridizasyon, retro-transkripsiyon ve amplifikasyon çalışmaları için RNA'ların spesifik tespiti yoluyla CTV izolatlarındaki farklılıkların belirlenmesini mümkün kılmaktadır (Nolasco ve ark., 1993; Olmos ve ark., 1999).

CTV, bitki bünyesine geçtikten sonra sistemik olarak taşınır, konukçu bitkisine hastalık bir kez bulaştıktan sonra bağışıklık sistemi olmadığı için bitki, hastalığı elemine edemez. Turunçgil yetiştiriciliği yapılan bölgelerde hastalığın epidemik salgınlarını önleyen koruyucu önlemleri alınmalıdır. Garnsey ve ark., (1998) 'ına göre bu önlemler, izolatin türüne ve oluşumuna ve bahçelerde bulunan turunçgil çeşitlerine bağlı olmaktadır. Bu önleyici tedbirler, beklenen infeksiyon ve patojenlerin yaygınlaşmasının engellenmesi temel alınarak yapılmaktadır.

Turunçgil tristeza virüsünün varlığı Türkiye'de birçok rapor edilmiştir. Ülkemizde ilk kez izolat olan Iğdır izolatu, biyolojik ve serolojik olarak karakterize edilmiştir (Baloğlu, 1988). Yapılan dsRNA analizleri sonucunda bölgemizde bulunan CTV izolatının bir karışım halinde bulunduğu bildirilmiştir (İnce, 1999). Ancak, Çevik ve ark., 2013 yılında yaptıkları çalışmaya kadar bilinen tüm izolatlar hafif olarak kabul edilmiştir. Bu araştırmacıların çalışmasında, Türkiye'de CTV varlığının, biyolojik aktivitenin olduğu virüsün farklı ırklarından oluşan karışık bir infeksiyonun sonucu olduğu ileri sürülmekte ve bu Türkiye izolatları diğer ülkelerden rapor edilen orta ve şiddetli ırklarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, Doğu Akdeniz bölgesindeki turunçgil alanlarında yeni CTV izolatlarının varlığını belirlenmiş, yeni izolatların moleküler karakterizasyonu ortaya konmuş ve bölgelerimizden elde edilen bu yeni izolatların özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

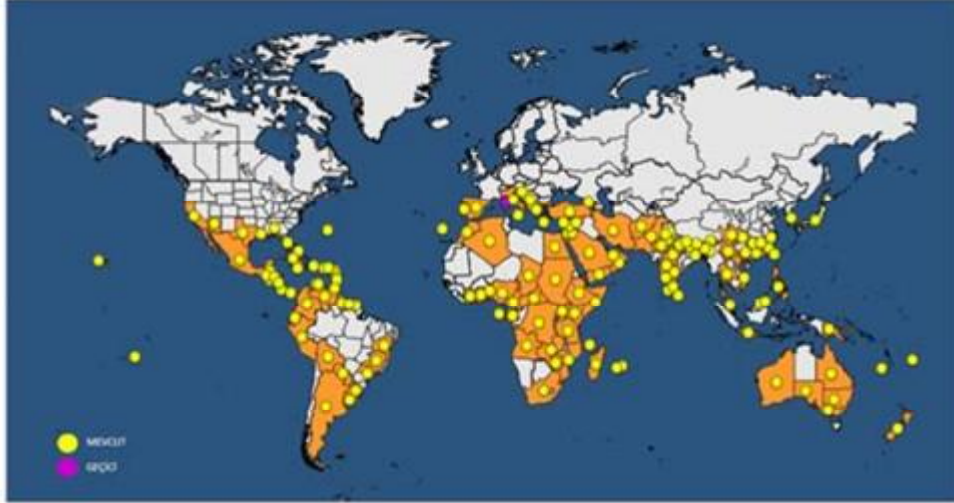
2.1. Dünyada CTV hastalığı

CTV, tüm dünyada turunçgil üretimi yapan ülkelerde görülmektedir. Doğal olarak ekvatorun 41. Derece kuzey ve güney enlemleri arasında yetiştiriciliği yapılmaktadır. *Turunçgil tristeza virüsü*'nün kökeninin turunçgillerin ana vatanı olan Asya kıtası (Malezya, Güneydoğu Asya, Çin, Malay takımadaları, Yeni Kaledonya ve Avustralya) ülkeleri olduğu tahmin edilmekte, fakat çoğu turunçgil türlerin kökeni bilinmemektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalara göre tüm turunçgil türlerinin, altıntop, etrog sitron ve mandarinden meydana gelen doğal bir melezleşme ile oluştuğu bildirilmiştir (Bar-Joseph ve ark., 1989).

Turunçgil çeşitleri, yaklaşık iki bin yıl boyunca Yakın Doğu ve Akdeniz bölgelerinde yetiştirilmiştir (Bar-Joseph ve ark., 1989). Sonra 17. yüzyılda Güney Afrika'ya, 19. yüzyılın ikinci yarısında Sidney Avustralya'ya bölgesine, ve sonunda 20. yüzyılda Amerika'ya yayılmıştır (Broadbent ve ark., 1996; Cambra ve Moreno, 2000). CTV'nin ilk yayılımı, infekteli bitki materyalinin kullanımı ve taşınması yoluyla gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Wallace ve Ark., 1956; Bar Joseph ve Ark., 1983). Hastalık ilk kez 1931'de Arjantin'de epidemi yapmış, daha sonra 1937'de Brezilya'da, 1939'da Kaliforniya'da, 1951'de Florida'da, 1956'da İspanya'da, 1960'ta İsrail'de ve son olarak 1970'te Venezuela'da hastalık ortaya çıkmıştır (Ducharme ve ark., 1951; Norman ve Grant, 1956; Bar Joseph ve ark., 1984; Rocha-Pena ve ark., 1995). Şekil 2.1'de dünyada CTV'nin dağılımı görülmektedir (EPPO 2018). *Tristeza* hastalığının dünyada oluşan ekonomik kayıpları hakkında kesin rakamlar vermek çok zordur.

Bu hastalığın oluşumunda en büyük etken *Phytophthora sp.* hastalığının portakallarda çok fazla zarara neden olmasıdır. Bu nedenle, *Phytophthora sp.* nedeniyle tohumdan üretilen portakal ağaçları (*Citrus sinensis*) kullanılamaması ve bunların yerine turunç anacı (*Citrus aurantium* L.) kullanımı artmıştır (Bar-Joseph ve ark., 1989). Ancak, bu anaç kullanımından sonra Avustralya'da 1860 yılında,

Java Adası'nda ve Güney Afrika'da 1891'de ağaçlarda ölümler görülmeye başlanmış ve bunun sebebi olarak anaç kalem uyumsuzluğu bildirilmiştir. Daha sonra, Bar-Joseph ve ark., (1989) tarafından aktarılan bazı literatürde bu hipotez reddedilmiş ve bu ağaç ölümlerinin bazı yerel hastalık etmenleri tarafından meydana geldiğini ileri sürülmüştür. CTV, 1890'dan başlayarak, dünya çapında turuncgil yetiştiriciliği yapılan alanlara yayılmış ve CTV'nin endemik olduğu bölgelerden CTV bulunmayan bölgelere taşınmıştır. Ayrıca, turuncgil üretimi yapılan bölgeler arasında çeşit değişimleri sırasında hastalık diğer bölgelere taşınmıştır. Öte yandan üç yapraklı (*Poncirus trifoliata*) ve kaba limon ağacı (*Citrus jambhiri*) gibi anaçlar üzerine aşılama ağaçlarında hastalık görülmemiş ve bu ağaçların yeterince gelişmiş olduğunu gözlenmiştir (Webber, 1925; Toxopeus, 1937).



Şekil 2.1. CTV'nin ülkeler bazında dağılımı, (EPPO, 2018).

Bir bölgeden diğerine hastalığının yayılması ve farklı çeşitlerin ve anaçların kombinasyonu sonucu; göçme, gövde çukurlaşması ve çöğür sarılığı (Sırasıyla decline, stem pitting ve seedling yellows) olarak bilinen üç ırk belirlenmiştir (Garnsey ve ark., 1987). Hastalığın en fazla görüldüğü ve zarar

verdiği Amerika kıtasına yetiştiriciliğinin yapılması amacıyla yeni turunçgil çeşitleri getirilmiş fakat hastalığın en etkin vektörü olan *Toxoptera citricida* 'nın Amerika'da bulunduğu ve hastalığı epidemiyolojisinde çok büyük bir etken olacağı ön görülmemiştir (Wallace ve ark., 1956).

Wallace (1978) ve Bar-Joseph ve ark., (1989) tarafından bildirildiğine göre ilk Amerika kıtasına hastalığın girişinin Güney Afrika'dan Arjantin'e ithal edilen 1.400 adet farklı çeşitler içeren turunçgil ağaçları (Kaba limonun anaçları üzerine aşılı Lue Gim Gong tatlı portakal çeşitleri) ile olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın büyük olasılıkla Temmuz 1930'da simptom göstermeyen (simptomsuz) ağaçlarla birlikte ülkeye giriş yaptığı varsayılmaktadır. Tüm bunlar başlangıçta Arjantin'de ve Güney Amerika'da CTV'nin ilk kayıtlı kök çürümesi (roots rot, *Phytophthora sp.*) salgınıyla aynı zamana rastlar (Bar-Joseph ve ark., 1989). *T. citricida* vektörünün bolluğundan dolayı salgının hızla yayılması, milyonlarca turunç üzerinde aşılana portakal ağaçları ve son olarak büyük bir miktarda oluşan infekteli materyalin kaynağının ortaya çıkmasını açıklamaktadır (Wallace ve ark., 1956).

CTV, 1937 yılında Kaliforniya'da çok yoğun şekilde turunçgil ağaçlarının ölümüne neden olmuş (Wallace ve ark., 1978) ve bu dönemde hastalığın meydana getirdiği geriye doğru ölüm (Moreira, 1942) ve ağır epidemiyolojik sonuçlar nedeniyle portakizce "Hüzün" anlamına gelen *Tristeza* olarak adlandırılmıştır (Roistacher, 1995).

Tristeza'nın bilinen isimlerinden bazıları: Arjantin'de kök çürüklüğü (podredumbre de racillas), Brezilya'da üzüntü, hüzün (tristeza), Amerika Birleşik Devletleri'de "quick delin" ve "budunion disease", Gana'da "dieback of limes", Güney Afrika'da "stem pitting", Avustralya'da fidanlarda sararma "seedling yellows", Japonya'da bodurluk "Hassaku dwarf" ve "Natsudaidai dwarf" dır. Bu hastalıkların hepsinin aynı patojenden kaynaklanan farklı adlandırmalar olduğu belirlenmiştir.

Akdeniz ülkelerinde CTV varlığı Dickson ve Flock (1959) tarafından rapor edilmiştir ve bu virüsün muhtemelen bu bölgede 1890 yılından itibaren gözlemlendiğini düşünülmektedir, fakat hastalık Akdeniz ülkelerinde henüz yaygın olarak görülmemektedir. Bunun yanında, hastalığın önem kazanması için, altıtop ve portakal gibi çeşitlerde kaydedilen ciddi hasarların ortaya çıkması gerektiği, CTV virüsüne toleranslı anaçlara aşılandığı zaman bile yıkıcı etkisinin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Roistacher, 1988; Garnsey ve Lee, 1988; Rocha-Peña ve ark., 1995; Broadbent ve ark., 1996; Cambra ve Moreno, 2000).

CTV iki protein kapsid ve çoğunlukla filiform parçacıklar olarak adlandırılan yapılara, yaklaşık 2 000 nm uzunluğunda ve 10-12 nm çapında uzun, esnek ve lifli virionlara sahiptir (Karasev ve ark., 1995; Moreno ve ark., 2008).

Biyofiziksel olarak Closterovirus cinsi içerisinde ilk karakterizasyonu yapılan *Turunçgil tristeza virüsüdür* (Moreno ve ark., 2008). CTV yaklaşık olarak 19.3 kb genomik bir RNA (gRNA)'ya sahiptir ve nükleotid sekansının tamamı en az dokuz farklı izolat üzerinden belirlenmiştir (Karasev ve ark., 1995; Vives ve ark., 1999; Ruiz-Ruiz ve ark., 2006; Moreno ve ark., 2008).

CTV'nin genomu (gRNA) on iki Açık Okuma Çerçevesi (ORF: Open Reading Frame) sahiptir. Bunlar on yedi protein ürünü ve iki transdüksiyonsuz (Okuma) bölgesinde (5' ve 3' ucudur) 107 ve 273 nükleotid arasındaki bölgeyi kapsamaktadır (Gowda ve ark., 2003b; Satyanarayana ve ark., 2004).

CTV'nin yapısında iki protein kapsid (CP ve CPm) bulunmaktadır. CP ve CPm, sırasıyla %97 ve %3 oranında ağırlık içermektedir (Satyanarayana ve ark., 2000).

CTV'nin gRNA replikasyonunda negatif zincirlerin sentezi kalıp olarak kullanılarak yeni pozitif iplikçik üretilmektedir. Ancak pozitif iplikçikler, daha çok negatif ipleri sayesinde oluşmaktadır (Satyanarayana ve ark., 2002b). Sıklıkla, CTV ile infekteli olmuş dokular büyük miktarlarda pozitif ve negatif stranded defektif RNAlar (dRNA) biriktirmektedir. Genelde defektif RNA 'lar yaygın bir şekilde bahçe izolatlarının dsRNA'larında gözlemlenmektedir, ancak dRNAların

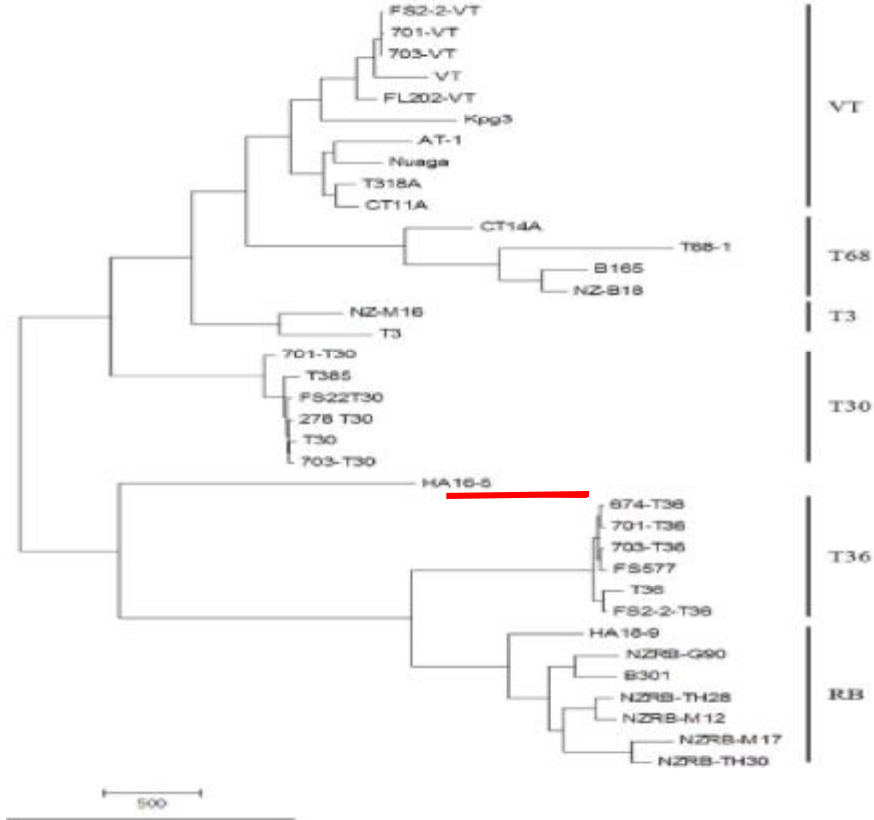
biyolojik olarak rolü hala tam olarak bilinmemektedir (Dodds ve ark., 1987; Guerri ve ark., 1991; Mawassi ve ark., 1995a, b.; Moreno ve ark., 1990).

Bazı çalışmalarda, bazı ılımlı CTV izolatların varlığı avantaj olarak görülmekte ve önerilmektedir (Pathak ve Nagy, 2009). CTV'nin konukçularının dış faktörlerle etkileşimi büyük ölçüde bilinmemektedir. CTV ve farklı turunçgil türlerinin kökeni aynı olduğu için CTV'nin izolatlarının çoğunun bitkilerde simptom göstermediği bununda turunçgillerle birlikte olan bir evrim sonucu olduğu bildirilmiştir (Yang G. ve ark., 1999).

Virüs infeksiyonları, konukçuların gen ekspresyonunda, metabolizmasında ve fizyolojisinde değişikliklere neden olmaktadır. Bazı virüslerde kloroplastların azalmasına sebep olmakta ve bundan dolayı fotosentez aktivitesini düşürmekte, nişasta üretiminde değişiklikleri neden olmaktadır (Killiny ve ark., 2017). Giriş bölümünde belirtildiği gibi, *Tristeza'nın* üç ana ırkı vardır (Şekil 2. 3.). Bu ırkların oluşturduğu simptomlar üç faktöre bağlı olarak bitkilerde hastalık görüntüsü ve şiddetine neden olur, bunlar; infekte olmuş türler veya çeşit, anaç cinsleri ve CTV'nin ırklarıdır. Ortak orijinlerine rağmen, bu ırkların üyeleri vektör taşınmasının etkinliği ve patojenisitesi açısından farklılık gösteren az sayıda fenotipik özelliği paylaşmaktadır. Günümüzde yedi tane karakterize olmuş genotipi vardır. Harper (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, "genotip" kelimesi, tek bir filogenetik soyu tanımlamak için kullanılmıştır. Bu, yüksek bir sekans kimliği ve paylaşılan bir evrimsel tarihi ifade eder. Bu çalışmada filogenetik analiz, en az altı mevcut genotip varlığını ve spekülatif/şüpheli olarak kalmasına rağmen yedinci bir potansiyel genotipi temsil eden bir rekombinant izolat olan HA16-5 (Melzer ve ark., 2010) olduğunu göstermiştir (Şekil 2.2.). Bu altı genotipin genomlarının incelenmesi, evrimsel tarihlerinin, çeşitliliklerin karmaşık bir karışımı olduğunu, genlerin içinde ve arasında ve aynı zamanda suşlar arasında ve geniş bir rekombinasyon ve sürekli değişen bir çevreye adaptasyon arasındaki seçici diferansiyel basınçlar olduğunu göstermektedir.

Göçüren hastalığı, etmeni *Citrus tristeza virus* (CTV) olan bir virüstür, ve turunç veya diğer duyarlı anaçların üzerinde farklı turunçgil çeşitlerini (portakal, mandarin, altıntop, kamkat ve laym) etkilemektedir.

CTV 'nin en ölümcül ve en şiddetli simptome içeren ırk, “quick decline”dir. Bu ırk simptom olarak, ağacın geriye doğru kuruması ve hızlı bir şekilde, haftalar içinde ağacının ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca yaprak sayısında azalma, yaprakların sararması ve dökülmesi, geriye doğru ölüm, fotosentez ve besin iletiminde azot eksikliğinden dolayı, yapraklarda küçük ve klorotik lekeler ve soluk ve deforme olmuş, ticari önemini yitirmiş meyveler oluşturmaktadır. Bu şiddetli ve ölümcül ırk aşılı birleşme çizgisinin hemen altında kabuk ve odun dokusunda simptomlar oluşturmaktadır (Schneider, 1959). Hastalık ile infekteli ağaçlarda anaç-kalem çizgisinin hemen altında odun dokusunda balık dişi gibi çıkıntılar gözlenmekte ve hastalık, iletim demetlerinde tıkanıklığa sebep olmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.2. Harper (2013) yılı çalışmasında analiz edilen CTV izolatlarının filogenisi, virüsün en önemli ırkları belirtilmiştir. Kırmızı işareti HA16-5 (Hawaii'dan) şüpheli ve gurupsuz yeni bir izolat ifade edilmektedir.

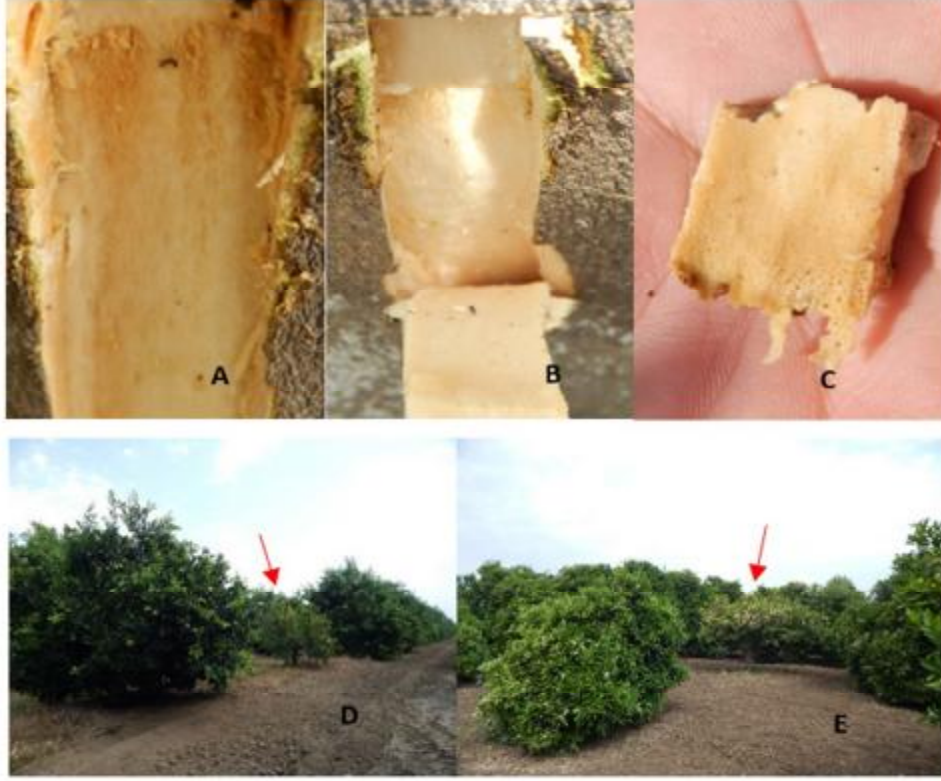
Su ve mineraller açısından yetersiz beslenmesiyle ağaçta solgunluklara sebep olmakta ve kök sisteminde hızla ilerleyen ölümler başlamakta, ardından ağaçların toprak üstünde görülebilen kısımları ölümle sonuçlanmaktadır. Bu ırk turunç ağacı üzerine aşılı çeşitlerde meydana gelmektedir ve hastalıktan korunmak için dayanıklı anaçların kullanılması önerilmektedir (Moreno ve ark., 2008).

'Stem pitting' (SP) ırkı bazı bitkilerde kambiyumun bölgelerinde değişik meristematik aktivitesinde bir kesinti veya anormal bir parankimal büyümesiyle başlamaktadır. Ardından bu bölgesel değişiklikler, odun deformasyonları ile

sonuçlanmaktadır. Genelde bu odun deformasyonları sonucu, ağacının kambiyum dokusunun etkilenir ve sonrasında ağaçta bodurluk, küçük ve kalitesiz meyvelerin oluşumu, düşük verim ve kalitesiz meyve ile meyve suyu üretimi gerçekleşir (Schneider, 1959).

Moreno ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmaya göre SP 'ye duyarlı turunçgil çeşitleri fidan veya aşılantmış aşılı kalem kombinasyonlarında da etkili olmaktadır. Fakat Garnsey ve ark 2005, laym, altıntop ve bazı portakallarda şiddetli simptomların gözlemlenmesi (damar açıklığı ve yapraklarda kaşıklaşma vb.) çevre koşullarına bağlı olarak değişebildiğini işaret etmektedirler. Mandarin çeşitleri SP izolatlarına karşı dayanıklılık göstermektedir. Stem pitting ırkı genelde ağacının ölümüne sebep olmayan, fakat aşırı doku büyümesi ve kronik olarak verim azalması ve sonunda buna bağlı olarak ekonomik kayıplar göstermektedir.

Üçüncü ırk, 'seedling yellows' (SY)'dur. Bu CTV ırkının bazı izolatları bahçelerde bulunan limon ve altıntop çeşitlerinde gözlemlenmektedir (Wallace, 1978). Fakat diğer bazı seedling yellow izolatlarının etkisinden dolayı yapraklarda yoğun sararma, kök sistemin azalması ve çekirdeklerden elde edilen altıntop, limon ve turunç bitkilerinde bodurluk meydana gelmesi ile karakterize edilmektedir (Moreno ve ark., 2008). Bazen, SY simptomsu gösteren olan turunçgil ağaçları iyi bir bakım ve besleme ile bu bitkilerin yeşil aksamalarının yeniden normal sürgün, yaprak ve renk kazanması mümkündür (Moreno ve ark., 2008). SY'nin cDNA elde edilmesinde, bu ırkın, CTV'nin genomunda spesifik patojenik belirleyicileri bölgeleri kullanılmaktadır (Satyanarayana ve ark., 1999, 2001).



Şekil 2.3. Turunçgil bahçelerinde CTV nin belirtileri: A-B (stem pitting, balık dişi gibi çıkıntılar) C (kabukta bu çıkıntılara uygun girintiler (pin holing)), D-E (ağaçların bodurluğu ve kloroz).

CTV nin tarihi boyunca bir çok izolatları, belirtileri ve oluşan zararı tarif edilmiştir, ama karmaşık bir virüs olduğu için bazı durumlarda farklı virüsler ile karıştırılmıştır (Wallace, 1978).

Sıklıkla CTV tarafından konukçularında görülen belirtiler hafif, orta veya şiddetli olarak karakterize edilir (Garnsey ve ark., 1987). CTV'nin izolatlarının tanınması için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Biyolojik indekseleme en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Roistacher, 1991). Bu metodu Garnsey ve ark., (1987) yaptıkları çalışmada göre belirtilerin görünümüne, konukçu çeşidine ve hava koşullarına bağlı olduğunu belirtmişler ve en sonunda tecrübeli

bir gözlemci tarafından hastalık belirtileri takip edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Normalde, belirtilerin şiddetinin belirlenmesi ve bunları daha önceki çalışmalarla karşılaştırılarak CTV'nin bir veya birkaç spesifik izolatlar ile inoküle edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan indikatör bitkilerde ortaya çıkan belirtilerin çalışılacak izolatların bitkilerdeki reaksiyonlarının doğrudan karşılaştırılması ve değerlendirilmesine dayanılmaktadır. Garnsey ve ark., 1987 Meksika laymı, turunç üzerine aşılı portakal, turunç fidanı, Duncan altıntop ve Madame Vinous fidanları kullanarak bir araştırma yürütmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada bu indikatör bitkilerde yapraklarda damar açıklığı, SP, floem nekrozu, bodurluk ve SY gibi belirtileri analiz etmişlerdir. Nihayet hastalık oluşumunun, konukçudan konukçuya değişebileceğini ve uygun hava koşullarında belirtilerin meydana gelebileceğini gözlemlemişlerdir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda CTV'nin tanısı için immünoenzimatik analizler ve metotları kullanılmıştır. Bunlar daha pratik, ekonomik ve hızlı bir şekilde sonuçlar vermektedir. CTV'nin pürifikasyonu yapıldıktan sonra monoklonal veya poliklonal antiserüm ve antikor-antijen spesifik kombinasyonları aracılığıyla araştırılan virüsün belirlenmesine izin vermektedir. Tüm turunçgil yetiştirilen alanlarda CTV'nin belirlenmesi ve infekteli ağaçların eradikasyon programlarında ELISA testi önemli bir araç olarak kullanılmıştır (Garnsey ve ark., 1979; Bar-Joseph ve ark., 1979; 1989; Cambra ve ark., 1979; Moreno ve ark., 2008).

CTV'nin gRNA nükleotid sekans tanımlamasını yaptıktan sonra, cDNA veya cRNA'nın moleküler hibridizasyonu denemelerini içeren farklı viral RNA'ların spesifik belirlenmesine dayanan tanı prosedürleri geliştirilmiştir (Barbarossa ve Savino, 2006; Narváez ve ark., 2000; Rosner ve Bar-Joseph, 1984). Hatta gerçek zamanlı RT-PCR (gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR) ile infekteli turunçgil dokusunda veya virüslü afitlerde hastalığın gelişmiş bir yöntemle hassas

olarak tanımlanması, sayısal olarak sonuçların alınmasını ve grafik oluşumu ile değerlendirme yapılabilmektedir (Bertollini ve ark., 2008).

İlk CTV epidemisi oluşumundan bu yana CTV'nin izolatların biyolojik özelliklerindeki değişiklikler, tür ve yoğunluğu, meydana getirdiği semptomlar ve afidler tarafından taşınabilirliği belirlenmiştir. Değişik semptomlara bağlı olarak farklı bileşenlerin (farklı virüsler) varlığını öne süren bir hipotez ortaya atılmış fakat daha sonra yapılan çalışmalarda CTV tek bir virüs olarak karakterize edilmiş ve sonra bu hipotez reddedilmiştir (Garnsey ve ark., 1977; Satyanarayana ve ark., 1999, 2001). Bir çok teknik kullanılarak CTV nin varlığı belirlenmesine rağmen, biyolojik indeksleme çalışmaları patojenik özelliklerini görmek için hala kullanılmaktadır (Ballesteros-Olmos ve ark., 1993; Garnsey ve ark., 1991).

CTV'nin pürifikasyon ve moleküler karakterizasyonu yapıldıktan sonra, CTV izolatların ırkları ve onların patojenik özellikleri araştırmak için hızlı yöntemler, moleküler markörler ile bulunmuştur. Bazı metotlarda kapsid proteinleri farklılıklarını görmek için monoklonal veya poliklonal antikorlar ya da peptid haritalar, endoproteaz (papain, trypsin, V8 protease, chymotrypsin, and thermolysin endoproteaz) kullanarak, sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile pürifikasyon yaptıktan sonra, CP belirlenmektedir (Guerra ve ark., 1990). Permar ve ark., 1990, CTV izolatlarının belirlenmesi için en yaygın monoklonal antikor MCA13 ile (korunmuş şiddetli sekans tanımaktadır) çalışmışlardır. Bu monoklonal antikor şiddetli izolatların ayırt edilmesi için büyük ölçüde kullanılmaktadır (Permar ve ark., 1990) Fakat hafif izolatlar eksik tanınan bir epitop olarak kabul edilmektedir (Pappu ve ark., 1993).

Single-strand conformation polymorphism (SSCP), CTV izolatlarının popülasyon yapısını karakterize etmek ve sekanslama için spesifik varyantlarını seçmek için kullanılmıştır. Bu yöntem izolatların içinde ve aralarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesine izin vermektedir (Ayllón ve ark., 2006; Rubio ve ark., 2001).

Rapor edilen tüm sekansların filogenetik analizi sonucu, yedi CTV izolatu dahil, üç ana gruptaki yapıyı ortaya çıkarmıştır;

Şiddetli SP izolatlarından birinci grubu, Kalifornia'dan SY568R (portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osb) ve altıntopta belirgin bir SP oluşturur), Japonya'dan NuagA (Meksika laym ve diğer konukçularda yoğun DL ve SY semptomlarına neden olur.) ve İsrail'den VT (Altıntopta DL, SY ve bazende hafif bir şekilde SP oluşturur) bulunmaktadır (Ruiz-Ruiz ve ark., 2006; Vives ve ark., 2005; Z.N. Yang ve ark., 1999; Suastika ve ark., 2001; Mawassi ve ark., 1996);

İkinci grupta Florida'dan T30 ve İspanya'dan T385 hafif izolatlar bulunmaktadır (Albiach-Martí ve ark., 2000c; Vives ve ark., 1999).

Üçüncü grupta Florida'dan T36 (DL ve SY görülür), Mısır'dan Qaha (AY340974) vardır (Karasev ve ark.,1995; Pappu ve ark., 1994). Grup içi nükleotid benzerlik oranı % 97,5'in üzerinde iken, en düşük oran % 75,6 ile VT ve Qaha arasında olmaktadır.

Farklı yerlerden ve farklı patojenik özelliklere gösterilen CTV barındıran izolatlarda genetik değişkenliğe rağmen, zaman ve yüksek bir koruma (konservasyon) derecesi vardır ve popülasyon yapısındaki sekanslarda tutarlı bir üstünlüğü olan izolatlar bulunmaktadır. Bu sekanslarda CTV, yüksek değişkenliğe ve kompleks bir yapıya sahip olmaktadır (Ayllón ve ark., 2006; Vives ve ark., 2005).

Bahçelerde CTV'nin popülasyonları şekillendiren faktörler mutasyon, rekombinasyon olayları, seleksiyon, genetik değişiklikler ve gen akışı nedeniyle bahçelerde ağaçların tekrarlanan inokülasyonları ve infekteli tomurcuklar taşınmasını CTV varyasyonlarının (Farklılıkların) oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Moreno ve ark., 2008).

Rekombinasyon, çoğaltma işlemi sırasında farklı genetik varyantların nükleotid zincirleri arasında genetik bilginin bulunduğu dizilimlerde bazı dizilerin değiştiği işlemlerdir. Homolog ve homolog olmayan rekombinasyonları, CTV'nin evrimi için hızlı bir araç olabilmektedir. Homolog olmayan rekombinasyonlar,

defektif RNA'ların birikerek; büyük oranda artması olarak bildirilmiştir (Ayllón ve ark., 1999a; Guerri ve ark., 1991; Mawassi ve ark., 1995 a,b; Yang ve ark, 1997).

Rekombinasyon, bazı durumlarda ölümcül veya biyolojik olarak dezavantajlı mutasyonları onararak hızlı evrimleşme için fırsatlar sunabilmektedir. Son olarak, CTV popülasyonları da virüsün doğal ve kültürel dağılmasından etkilenmektedir.

Özet olarak, CTV'nin bazı konukçularda genetik olarak kararlı görünmesine rağmen, farklı çevresel koşullar altında farklı çeşit-anaç kombinasyonlarla, insan güdümlü etkileşimler genetik değişkenlik oluşturabilir, daha sonra rekombinasyon, seleksiyon, genetik sürüklenme veya gen akışı gibi diğer faktörler bölgeler arasında etkileşim meydana getirebilir (Moreno ve ark., 2008).

2.2. Türkiye de CTV

Türkiye'de, turunçgil ağaçlarında 30 yıldan uzun süredir virüs ve virüs benzeri hastalıkların bulunduğu bilinmektedir (FAO.org 2018). 1960 yılından bugüne dek Türkiye'de narenciye hastalıkları çalışmalarında 15'e yakın zarar veren virüs ve virüs benzeri rapor edilmiştir (TÜRKTOB 2018).

Turunçgil üretim alanlarında görülen bu virüs ve benzeri arasında, Psorosis hastalığı, Stubborn, Cachexia, Impietratura, Exocortis, Göçüren ve diğerleri hastalıklar bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Bu hastalıklar, Tristeza hariç, Akdeniz ülkelerinin çoğunda yaygındır (Bové 1966).

CTV ülkemizde değişik bölgelerde varlığı bildirilmiştir ancak zararı henüz ekonomik düzeyde değildir. Ülkemizi diğer ülkeler ile karşılaştırdığımızda, Türkiye'de *Göçüren hastalığı* nın çok yayılmamasının birkaç sebebi bulunmaktadır.

Çizelge 2.1. Türkiye’de bulunan bazı virüs ve virüs benzeri hastalıklar (Çınar ve Önelge, 2010; TÜRKTOB ve FAO on line).

Hastalık	Bilimsel adı	İlk raporlar
Göçüren hastalığı	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	Norman, 1963 Moreira, 1965
Kavlama hastalığı	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPSV)	Norman, 1963
Satsuma Cücelik hastalığı	<i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV)	Azeri, 1973 Bové, 1978
Turunçgil parçalı yaprak hastalığı	<i>Citrus tatter leaf virus</i> (CTLV)	Kameroğlu & Baloğlu, 1998.
Turunçgil sarı damar açılması hastalığı	<i>Citrus yellow vein clearing virus</i> (CYVCV)	Önelge 2003
Turunçgil taşlama hastalığı	<i>Citrus impietratura disease</i>	Chapot, 1961
Turunçgil klorotik cüceleşme hastalığı	<i>Citrus chlorotic dwarf Ass. virus</i> (CCDaV)	Çınar, 1993
Yaprak kırışıklık veya buruşukluk hastalık	<i>Citrus leaf rugose virus</i> (CLRV)	TÜRKTOB 2018
	<i>Citrus infectious variegation virus</i> (CIVV)	Azeri, 1973
	<i>Citrus crinkly leaf virus</i> (CCLV)	Martelli, 1996
	<i>Gummy bark</i> (CGB)	Moreira 1965
Turunçgil Cücelik Viroid hastalığı	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	Norman, 1963 Moreira, 1965
Turunçgil Gözenekleşme Viroid hastalığı	<i>Citrus cachexia viroid</i> (CCAVd)	Reichert 1959, Norman 1963, Moreira 1965.
Stubborn	<i>Spiroplasma citri</i>	Chapot, 1956
	<i>Concave gum, Blind pocket,</i>	Howd D., 2002

Bunlar arasında yayılmada virüsün zayıf aktivitesi ve iklim koşulları sayılabilir. Buna rağmen turunç, anaç olarak Türkiye’nin turunçgil üretimi alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, o yüzden en etkili vektörün (*T.*

citricida) bölgemize ulaşması durumunda ağır epidemiler oluşturabilecektir (Baloğlu ve ark 2009).

Muhtemelen CTV, Türkiye'nin doğusundan, Doğu Asya'dan Karadeniz Bölgesi'ne getirildiği ileri sürülmüştür; Bir başka inokulum kaynağı da, İsrail'den gelen çeşitlerle olduğu ileri sürülmüştür (Baloğlu, CIHEAM, 2009). Fakat Amerika'dan gelen bitkisel materyallerin ülkemize girişinden dolayı hastalık açısından bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Anonymus). Yapılan bazı çalışmalarda Türkiye izolatları genetik olarak T30 genotip içermiş ve Kaliforniya izolatları ile bazı Türkiye izolatlarının genetik benzerliği bildirmişlerdir (Çevik ve ark., 2013).

Türkiye'de CTV ile ilgili simptomolojik gözlemlerine dayalı ilk raporlar Doğu Akdeniz Bölgesinde (Norman, 1963) ve Moreira (1965) yapılmıştır.

Ege bölgesinde, İzmir ili turunçgil üretimi yapılan bahçelerde, Özalp ve Azeri (1967), tarafından bir sörvey çalışması yürütülmüş ve sörvey sonucu bir Satsuma (Rize) mandarin bahçesinde, bir ağacı *Tristeza* (Göçüren) hastalığı ile infekteli bulmuşlardır.

1976'da Dolar ve Cengiz tarafından yayınlanan raporda ülkemizde CTV'nin mevcut olduğunu ve Türkiye'nin tarımının geleceği için büyük bir potansiyel tehlike olduğunu bildirmişlerdir.

Dolar (1976), Adana'da CTV enfeksiyonu olduğundan şüphelendiği 215 ağaç belirlenmiş ve bunlardan 106'sını Meksika laym indikatör bitkisi üzerine aşılamaş, Adana'daki bu şüpheli ağaçlardan CTV'nin tespiti biyolojik indeksleme ile doğrulanmıştır. Toplam inokulum verilen 106 Meksika laym bitkisinden 66'sı tristeza simptomu göstermiştir.

Ayrıca Adana'da bir Yafa portakal ve Mersin'de 5 mandarin ağacında Cengiz ve ark (1976) tarafından biyolojik indekslemeler yapılarak, Doğu Akdeniz bölgesinde CTV nin varlığını bildirilmiştir. Yürütülen çalışmalarda 156 şüpheli ağaç bildirilmiş, aynı zamanda hastalığı yayılmaması için yurtdışından getirilen infekteli ağaçlar yok edilmiştir.

Ege bölgesinde (1978) yılında Azeri ve Heper, satsuma mandarinlerinde bir çalışma yapmışlar ve simptomolojik olarak ve Meksika laymda biyolojik indekseleme ile doku boyama metodu kullanarak hastalığa yakalanma oranı %16.02 belirlemişlerdir. Hafif ve çok şiddetli değişik ırkların bulunduğunu işaret etmişlerdir.

Azeri ve Karaca (1978), satsuma mandarinlerinde yaptıkları bir sörvey çalışması ile Ege'de (İzmir'de Merkez ilçede, Seferihisar, Bornova, Karşıyaka, Menemen, Urla ilçelerinde) infeksiyon oranının %15 ve %22,5 arasında olduğunu, hatta bazı bölgelerde oranın %30'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Azeri (1981), turuncu üzerinde aşılannmış satsuma mandarinleri ağaçlarında geriye doğru kuruma, yaprak dökülmesi ve ağaç ölümleri simptomlarını rapor etmiştir. Rapor sonunda araştırmacılar göre satsuma ağaç ölümlerinin Tristeza ve Xyloporosis (Cachexia) hastalıkların karışık infeksiyonu sonucu olan bir etki olduğunu belirtmişlerdir.

Yine, Azeri'nin (1984) yılında satsuma ağaçlarının CTV ile infeksiyon oranı belirleyen bir çalışmasında, biyolojik indekseleme ve ELISA testi yöntemlerini kullanarak İzmir bölgesi için elde edilen sonuçlarda , Tristeza hastalığına yakalanma oranının % 17.79 olduğunu göstermiş ve turuncun tristeza virüsüne karşı çok duyarlı bir anaç olduğunu belirtmiştir.

Türkiye'de ilk izolat CTV'nin varlığı serolojik ve biyolojik denemelerle belirlenmiştir (Baloğlu, 1988). Araştırmacı, bu çalışmada CTV'nin morfolojik özelliklerinin incelemesi, ırklarının belirlenmesi kapsamında bu testleri yapmıştır. Hatta sonuçlarda simptomlar göstermeyen ağaçlarda bile CTV hastalığı bulunmuştur.

Doğu Akdeniz Bölesinde turuncu üzerine aşıllı navel portakal ve satsuma mandarin ağaçlarında simptomolojik olarak ve indekseleme çalışmaları sonuçlarda hastalığı varlığı belirlenmiş, Hatay (Dört Yol'da) %0.06, İçel (Merkez'de) %0.08 ve Adana (Kozan'da) %2.1 oranında değişen infeksiyon bildirilmiştir (Güllü, 1989)

Yumruktepe, (1993) yılında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaprak bitleri üzerine bir araştırma gerçekleştirmiştir. Bu çalışma sonucu bölgede *Aphis citricola*, *A. gossypii*, *A. craccivora*, *Toxoptera aurantii* ve *Myzus persicae* aphid türleri tespit edilmiştir. *A. citricola* ve *A. gossypii*, CTV hastalığının taşınması için diğer türler arasında en iyi vektör türleri olarak bulunmuştur. Diğer yandan ülkemizde turunçgil bahçelerinde pamuk yaprak biti (*A. gossypii*) bolluğu görülmektedir. Portekiz ve İspanya'nın bazı bölgelerinde *T. citricidus* varlığı (Ilharco ve ark. 2006) bildirilmiştir; bundan dolayı Akdeniz havzasında turunçgil endüstrisine yönelik büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Çünkü *T. citricida* yeni Tristeza salgınları için risk olarak görülmektedir.

CTV'nin Mersin'in izolatlarını kullanarak *A. gossypii* ile yapılan taşıma çalışmalarında % 0.0 ile % 21,5 arasında değişen oranlarda vektörle taşınma gerçekleştirebilmiştir (Satar, 1997).

İnce (1999), Çukurova Bölgesi'nde bulunan bazı izolatların biyolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlenmesine yönelik bir çalışma yönetmiştir. Bu çalışmada farklı bahçelerden elde edilen farklı izolatlarda, farklı dsRNA yapıları oluşturduğunu belirtmiştir. Irkların etmenin bir karşısım halinde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca seedling yellows (SY) irkına serolojik ve biyolojik çalışmalar için uygun zamanın belirlenmesi için ELISA testi kullanarak Mayıs ve Ekim aylarının en uygun zaman olduğunu belirlemiştir.

Yılmaz (1990), Doğu Adeniz Bölgesi'nde turunçgil virüsleri izolatları ile taşınma denemeler yapmış, bu çalışmasında *A. gossypii*, *A. rubarum* ve *A. solenalle* vektörleri kullanılmış, ama sonuçta sadece *A.gossypii* vektörü CTV hastalığını Meksika laym bitkisine taşıyabilmiştir.

Sertkaya ve ark., (2001), Doğu Akdeniz Bölgesin'de gerçekleştirdikleri bir çalışmada 14 bahçede Tristeza benzeri semptom gösteren 54 adet ağaç belirlemiş bunlardan 24 ağaç için ELISA testi yapmış fakat sadece 9 ağacı CTV ile infekteli bulmuştur.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil yetiştirme alanlarında CTV yaygınlığını belirlemek için serolojik yöntemler kullanılarak (ELISA ve DTBIA yöntemleri) yeni bir sörvey çalışması gerçekleştirilmiştir. Yapılan sörveyde bu bölgede CTV yaygınlığı % 0.04 olarak bulunmuştur (Bozan 2002).

Daha sonra Önder ve Korkmaz 2005 ve 2006 arasında Edremit Körfez Bölgesi'nde satsuma owari ağaçlarında virüs ve viroid hastalıklar varlıklarının belirlenmesi amacıyla bir çalışma yürütmüşler ve Tristeza için hem DAS-ELISA hem de biyolojik indeksleme yöntemleri uygulanarak test etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda Tristeza için alınan 156 örnekten 38'si CTV ile pozitif olarak bulunmuştur (Önder ve Korkmaz, 2008).

Türkiye'de bu zamana kadar farklı izolatlarla seroloji ve biyoloji çalışmaları kullanılarak sınırlı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucu bu izolatların ılımlı izolatlar olduğu bildirilmiştir (Baloğlu, 1988; Çınar ve ark., 1993; Korkmaz, 2002).

Korkmaz ve ark., (2008) arkadaşları tarafından farklı turunçgil çeşitlerinden toplam 201 örnek toplanmıştır ve DAS-ELISA monoklonal antikor (MCA13) ve RT-PCR kullanarak satsuma ağaçlarının CTV ile infekteli olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada elde edilen pozitif sonuçlar ile 41 örneği DAS-ELISA aracılığıyla ve 13 örneği RT-PCR kullanılarak tespit edilmiştir. Bu izolatlar daha sonra MCA13 pozitif ve negatif izolatların farklılaşmasına ve karışık enfeksiyonların saptanmasına izin veren bidirectional/PCR (BD / PCR) ile doğrulanmıştır. Biyolojik indeksleme için toplamda farklı coğrafi bölgeleri ve konukçuları temsil eden 28 izolat seçilmiştir. Ama bu izolatların yapılan inokulasyon çalışmalarında hiçbiri turunç, altıntop veya portakal fidanlarında simptom göstermemiş, fakat bütün izolatlar Meksika laym bitkisinde yapraklarda damar açıklaması simptom oluşumu göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca izolatların sadece CTV'nin ılımlı ırklarının değil aynı zamanda ülkemiz için potansiyel tehlike olan orta şiddetli ve şiddetli ırklarının da bulunduğunu göstermişlerdir.

Turgut ve Baloğlu (2009) tarafından Akdeniz ve Ege bölgesindeki 23 ilçede bir çalışma yapılmıştır. Araştırmacılar, farklı şiddette simptom gösteren 276 adet ağaçtan örnekler toplamışlardır. Toplanan örnekleri tamamı DAS- ELISA testi ve bazı örneklerde de RT-PCR yöntemi kullanılmış, yapılan çalışmalar sonucunda bunlardan eski izolat 8 örnekte CTV ile bulaşık olduğu kesin bulunmuştur.

Türkiye'de serolojik ve biyolojik olarak karakterize edilmiş CTV'nin izolatları ile ilgili önceki çalışmalarda, bütün yayınlanan CTV nin izolatlarının ve bunların içinde bulunan İğdir izolatı (ilk bilinen CTV izolatı)' nda bulunan CTV ırkının, hafif CTV ırkı olarak bildirilmiştir. Ancak bu araştırmaya göre İğdir moleküler özellikleri western blot ve BD-RT-PCR denemeler kullanılarak ağırlıklı olarak şiddetli izolatlarda bulunan MCA13 epitopunun varlığını göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarında, daha önce biyolojik olarak hafif bir izolat olarak tanımlanan izolatların aslında hafif ve şiddetli ırkların bir karışımını içerdiğini açıkça gösterilmiştir (Çevik ve ark., 2013).

Göksu ve ark., 2017, turuncgil anaç ıslahı programında hibridizasyondan elde edilen farklı hibrit (melez) popülasyonlarındaki dayanıklılığının iyileşmesini için seleksiyon markörlerinin kullanılabilceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada Tristeza'ya dayanıklı Rubidoux üç yapraklısı ve Yerli üç yapraklı'nın baba olarak kullanıldığı melezleme kombinasyonlarında moleküler markörler kullanılarak melezlerin erken dönemde Tristeza'ya dayanıklılık durumlarının belirlenmesi için çalışılmıştır. Sonuçta 26 adet melez bitki dayanıklılık çalışmalarında kullanılmaya aday gösterilmiştir. Ancak, sonuçlarda tristeza virüsüne hem tolerans ve hem de duyarlı olduğu bilinen ve bu çalışmada baba olarak kullanılan Sunki mandarini, Gou tou turuncu ve Çin turuncunda OPG18, OPG09, OPK16, OPO12, OPG06 markörlerinden dayanıklılık bantları elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. Bitkisel Materyal**

CTV hastalığının ile infekteli olduğu düşünölen veya simptom gösteren ağaçlardan bitkisel materyal alınmıştır. Örnekler toplandıktan sonra plastik torbalara konulmuş ve içinde buz olan buzluklarda muhafaza altına alınmıştır. Daha sonra toplanan bu örnekler laboratuvara getirilerek ekstraksiyon yapılmaya kadar +4°C'de buzdolabına konulmuştur. Toplanan örnekler; portakal, altıntop, mandarin, kumquat çeşitlerinden alınmıştır. Bu bitkisel materyal olarak kullanılacak örnekler ekstraksiyon yapıldıktan sonra Çukurova üniversitesi, Turunçgil virüsleri laboratuvarında moleküler çalışmalar yapılmasını için -20°C derin dondurucunda bekletilmiştir.

3.1.2. Total Nökleik Asitleri (TNA) ekstraksiyonu için kullanılan Materyal

Total Nökleik Asitleri (TNA) ekstraksiyonu CTAB ekstraksiyon buffer (PVP-40, Tris HCL, EDTA, NaCl, β -Mercaptoethanol) kullanılarak yapılmıştır. Bu aşamada, gerekli kimyasallar çizelge 3.1.'de verilmiştir. Diğer malzemeler 2 ml ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri, makas, havan ve dövücüler, rak, pipet ve pipet uçları kullanılmıştır.

Bu adımda kullanılan cihazlar EPPENDORF® mikrosantrifüj, BASIC® laboratuvar analitik terazi, CENCO® , vorteks, su banyosu KOTTERMAN®, EPPENDORF® spektrofotometre ve otoklavdan yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1. TNA ekstraksiyonlarının yapılması için kullanılan CTAB protokol malzemeler

Kimyasal malzemeler	Konsantrasyonlar
CTAB buffer	%2
Izoamil alkol	24:1
hipoklorit	%2
izopropanil,	%100
Etil alkol	%70
TE buffer (pH 8)	-
Saf su	-

3.1.3. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR/RT-PCR) için kullanılan Materyaller

TT-PZR protokolde CTV-CP primerleri (Integrated DNA Technologies® firması), ddH₂O, GoTaq® green Hot start master mix (GoTaq Polymeraz, dNTPs ve MgCl₂⁺⁺) PROMEGA® ve reaksiyon bufferleri vb. biyokimyasallar (Çizelge 3.2.), pipetler, pipet uçları ve PCR eppendorf tüpleri kullanılan malzemeleri oluşturmuştur.

EPPENDORF® mikrosantrifüj, CENCO® vorteks, EPPENDORF® spektrofotometre, PZR cihazı TA-TECHNOGENE® PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. TT-PZR işlemi için kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Konsantrasyonlar
Total nükleik asit	1µg/µl
dNTP	10mM
RNase free ddH ₂ O	-
GoTaq® green Hot start mix	2x
Primers (F)	10pmol/µl
Primers (R)	10pmol µl
cDNA	-
Buffer (pH 8.5)	5x
AMV RTase	10 u/µl

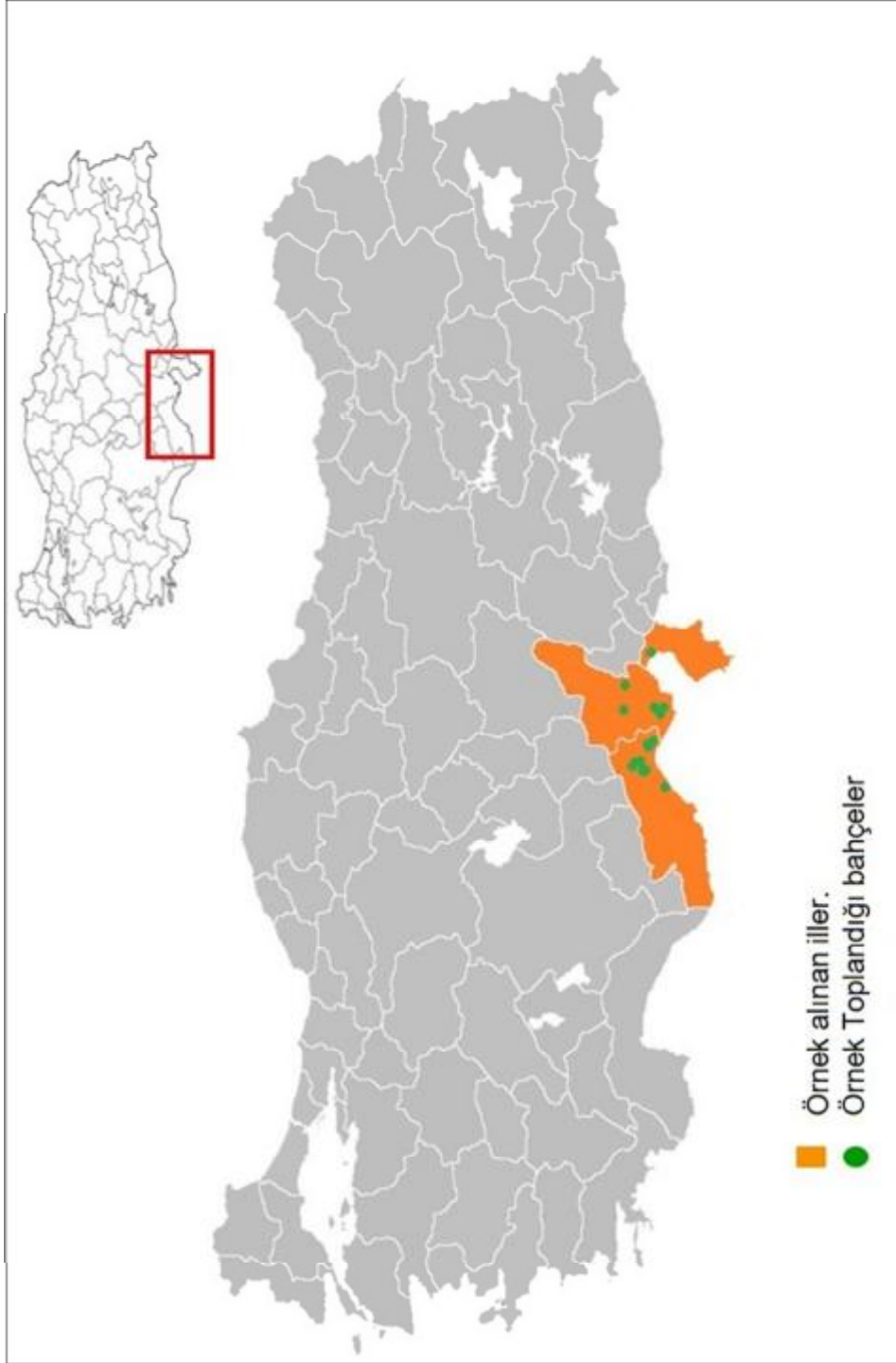
3.1.4. Elektroforez için kullanılan materyal

Elektroforez çalışmalarında kullanılan kimyasallar %1 Agaroz, Ethidium bromide, markörler, Loading dye vb. ve elektroforez tankı (BIORAD®) kullanılmıştır.

Agaroz jelde oluşan bandlar görmek için BioDoc-It fluor kamera makinesi ve UPV® cihazı ve diğer malzemeler materyali oluşturmuştur.

3.1.5. Araştırma Alanı.

Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda çalışma gerçekleştirilmiştir. Adana, Mersin, Hatay illerinden örnekler toplanmıştır (Şekil 3.1.). Örnekler, tesadüfi olarak gezilen bahçeler ezilmiş ve infekteli ağaçları olduğu düşünülen 11 bahçedeki ağaçlardan toplanmıştır.



Şekil 3.1. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde gezilmiş turunçgillerin bahçelerinin haritası.

3.2. Metot

3.2.1. Arazide Belirtilerin tanınması ve bitki materyali elde edilmesi

Örneklerin toplanacağı ağaçlarda genç olmayan taze sürgünler tercih edilmiştir. Örnekler ağacın farklı yaşlarda ve değişik yönlerinden rastgele seçilerek 75 şüpheli ağaçtan örnekler alınmıştır (Çizelge 3.3.).

Ağaçlarda aranan belirtiler şunlardır:

- Ü Çok şiddetli infeksiyonlarda, aşı birleşme noktasında diz şeklinde çıkıntı oluşur
- Ü Bodurluk veya gelişme geriliği
- Ü Aşı birleşme noktasında turuncu bölümünde çıkıntılar, kabukta bu çıkıntılara uygun girinti belirtileri görülür (pin holing)
- Ü Ağaçta dal kurumaları
- Ü Ağaçta genel az yapraklılık
- Ü Küçük yaprak oluşumu
- Ü Kloroz

Çizelge 3.3. Örnek alınan bahçelerle ilgili bilgiler

Gezilen iller	Gezilen Bahçelerin Yerleri	Örnek sayısı	Çeşitler		
Mersin	Alata	3	Vaşington	Yerli portakal	
Mersin	Mersin 1	11	Vaşington		
Adana	Karataş 1	5	Vaşington		
Hatay	Dörtyol	2	Satsuma	Kamkat	
Mersin	Mersin 2	8	Vaşington		
Mersin	Iğdır	5	Valensiya	Klemantin	Turunç
Adana	Karataş 2	2	Vaşington		
Adana	Karataş 3	6	Vaşington	Altıntop	
Tarsus	Mersin 3	6	Vaşington		
Mersin	Mersin 4	4	Satsuma		
Hatay	Tigem	6	Kalamondin	Kamkat	Satsuma
Adana	Karataş 4	17	Satsuma		
Toplam		75			

3.2.2. TNA ekstraksiyonu Çalışmaları

CTV'nin RNA'sının elde edilebilmesi için, bitki materyalinden Total Nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu Murray ve Thompson (1980)'dan modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bütün CTV ile infekteli olduğundan şüphelenilen örneklerin yaprak sapsarı, ve taze dalların kabuğu alınıp sıvı azot kullanılarak ezilmiştir. Bunun için 250-300 miligram arasında bitki dokusu tartılıp moleküler çalışmalar için hazır hale getirilmiştir. Ezilen bitki dokuları 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ekstraksiyon çözeltisi (pH:8)

1ml eklenmiştir (CTAB buffer içindeki oluşturan malzemeler çizelge 3.4. göstermektedir).

Bir saat boyunca 65 °C' de su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu zaman tamamlandıktan sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek beklenmiştir. Sıvı faz alınarak (800µl) 2 ml'lik yeni santrifüj tüpüne aktarılıp, 1 ml hacimde kloroform/isoamil alkol (24:24:1,) eklenip, vortex yapılmıştır.

Ardından 15.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sıvı fazı (750µl) alınıp, yeni 1,5 ml'lik tüpe aktarılıp ve üzerine 450 µl soğuk isopropanol eklenmiştir. Hafifçe 2 veya 3 defa karıştırılmış ve sonra -20°C' de 60 dakika süresince inkübe edilmiştir.

Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek sıvı faz dikkatli bir şekilde pelet elde edilmesi için boşalmıştır. Sonra elde edilmiş pelet %70'lik etil alkol eklenip yıkanılarak, 15.000 rpm'de 5 dakika (iki kez) santrifüjlenilmiştir. Alkol boşaltıldıktan sonra 1-2 saat civarında oda koşullarında pelet kurutulmuştur.

Sonunda elde edilen pelet 100µl TE buffer içinde çözdürülmüştür. Ekstrakte edilen total nükleik asit etiketlenip -20 °C'de muhafaza edilmiştir. RT-PCR işlemleri yapmak için, alınmış bütün örneklerden çalışmalarda 5µl TNA kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. 100 ml CTAB bufferin hazırlanmasını için gerekli malzemeler.

Kimyasal	Miktar
CTAB	2,00 g
EDTA	0,58 g
NaCl	8,17 g
Tris HCL	1,57 g
PVP-40 [2%]	2,00 g
2 Mercaptoethanol [0,2%]	200 µl

3.2.3. Primerler

Primerler, GenBank'ta mevcut olan CTV'nın ırkları için seçilmiştir. Bu primerler, farklı izolatların çoklu sekansları mevcut hedef patojenin korunmuş bölgelerine bağlanmak üzere seçilmiştir. Seçilen primerler sekansları CTV-CP-U-F (5'CWTGAGCRCTGCTTTAAGGGTC-3') ve CTV-CP-U-R (5' GATGAAACTCCACCATCCCGATC-3') olmuştur (IDT Inc[®], USA firması) (Wang ve ark., 2013).

PCR çalışmaları yapılmadan önce örneklerin konsantrasyonu 1ng/µl olarak ayarlanmıştır.

3.2.4. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (TT-PZR) Testi

TT-PZR çalışmalarında (Wang ve ark., 2013) modifiye protokolü kullanılmıştır. Elde edilen nükleik asit ekstraktlarından, konvansiyonel ters transkripsiyon (TT) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Bundan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testi gerçekleştirilmiştir.

Ters transkripsiyon aşamasında ilk olarak denatürasyon yapılması için total nükleik asitleri (1µg/µl konsantrasyonu) 5µl, dNTP'ler 2µl, Reverse primer (10pmol/µl) 1µl ve ddH₂O 2µl (hep örnekte toplam10µl) kullanılarak yapılmıştır. Bu biyokimyasal sıvıların PZR tüpleri üzerine aktarılıp vorteks ve kısa spin yapılarak iyice karıştırılmıştır.

Örnekler hazırladıktan sonra 70°C'de 5 dakika PZR cihazında denatüre edilmiştir. Denatürasyondan sonra buz üzerinde 3 dakikadan fazla beklenmiştir. Daha sonra 5x buffer (AMV Rtase için) 4µl, AMV RTase (reverse transcriptase) (10 u/µl) 0.2 µl, ve ddH₂O 5.8 µl (toplam 10 µl /örnek) ile RTase karışımı hazırlanılmıştır. RNA örnekleri üzerine yukarıdaki karışımdan 10 µl eklenip vorteksle ve hızlıca santrifüjlenilmiştir. Sonunda 42°C 'de 1 saat PZR cihazında bekletilmiştir.

PZR için elde edilen cDNA kullanılmıştır. Bu aşamada takip eden biyokimyasallar kullanılarak belli miktarlarda 8,5 µl ddH₂O, GoTaq Hot Start mix

12,5 µl, primer “Forward” (10 pmol) 1 µl, primer “Reverse” (10 pmol) 1 µl sonunda cDNA 2 µl ve eklenerek toplamda 25µl PZR karışımı tamamlanarak PZR tüplerinde hazır hale getirilmiştir.

PZR yürütme aşamaları sıcaklıkları ve koşulları şunlardır (çizelge 3.5.): 94 °C’de 2 dakika (1 döngü); 94 °C’de 30 saniye, 56 °C’de 30 saniye ve 72 °C’de 1 dakika (40 döngü) ve 72 °C’de 10 dakika (1 döngü) olarak PZR cihazında gerçekleştirmiştir. PZR yürütme çalışmaları bittikten sonra amplifiye örnekleri PZR tüplerinde -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.5. PZR çalışması için aşamalar ve zamanlar.

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngüler
Ayrılma sıcaklığı	94 °C	2 dakika	1 döngü
Bağlama sıcaklığı	94 °C	30 saniye	40 döngü
	56 °C	30 saniye	
	72 °C	1 dakika	
Uzama sıcaklığı	72 °C	10 dakika	1 döngü

3.2.5. Elektroforez Çalışmaları

Elektroforez işlemlerinde DNA markörleri hazırlamak için markörlerden 0,5 µl (2-Log DNA ladder [1 µg/µl] NEB), 5 µl of ddH₂O, 1 µl of gel loading dye (NEB), kullanılmıştır.

Agar jel metodu kullandığı zaman ilk olarak 1 g’lık agaroz tozu (Agaroz [1 %]) 100 ml TAE buffer [1x] içinde mikrodalga kullanılarak çözülmüştür. Agaroz karışımı jel tepsine dökülmüş ve donması için bekletilmiştir. Jel donduktan sonra, elektroforez tankı içinde yerleşmiş ve TAE buffer uygun bir şekilde (jel kaplanana kadar) jel tankına dökülmüştür.

Bundan sonra kibar bir şekilde hazırlanmış markörden 8 µl ve RT-PCR ürünlerinden 10 µl koyup 120 volt güç ile 25-30 dakika boyunca jel yürütülmüştür.

Jel yürütüldükten sonra etidyum bromür içinde 5 dakika batırılarak bekletilmiştir. Sonra UV transilluminator cihaz kullanılarak bantlar gözlenmiştir ve fotoğraflar çekirilmiştir.

3.2.6. PZR ürünlerinin sekans analizi ve filoetik karşılaştırılma çalışmaları

PZR pozitif bulunan izolatlar sekanslamaya gönderilmiş, elde edilen sonuçlar önceki çalışmaların (Yokomi ve ark., 2018; Çevik ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013; Fisher ve ark., 2013; Harper ve ark., 2010; Cerni ve ark., 2009) ve referans CTV raporlu çalışmalar NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri bankasında çoklu sekanslar hizalamaları MEGA10 aligner (Molecular evolutionary genetics analysis) (Tamura ve ark., 2018) kullanılarak yapılmıştır (Thompson ve arkadaşları, 1997).

NCBI biyolojik veri bankasında BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) uygulaması ile infekteli olarak belirlenen izolatlar karşılaştırma yapılmıştır.

MEGA 10, Kimura 2-parametre modeline dayanan ağaç yapımı ve inter ve intra nükleotid mesafeleri için neighbor-joining (komşu-birleştirme) metod kullanılarak izolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri değerlendirmek için (dendogram yapısı) kullanılmıştır (Saitou ve Nei, 1987; Nei ve Kumar. , 2004; Tamura ve ark., 2018).

GenBank'tan 50 sekans seçilip filogenetik ilişkiler ve grupları görmek için MEGA10 kullanılmıştır (Tamura ve ark., 2018). DNA dizilimleri, Aling ClustalW metodu aracılığıyla yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örnek toplanma ve arazide simptomları gözlem çalışmaları ile ilgili bulgular

Bitkisel materyalleri seçmek, yeni izolatları belirlemek çalışmanın en önemli aşamalarından birisini oluşturmuştur. Çalışma alanı olarak Adana, Mersin ve Hatay illeri turunçgil alanları seçilmiştir. Çalışmada bahçe içerisinde bodur görünümlü, az yapraklı, çalılışma gösteren ağaçlar ve genel olarak diğer ağaçlara göre yapraklarda kloroz, küçük yaprakla gösteren ağaçlar seçilmiştir. Bu ağaçlarda bu simptomlara ek olarak ağacın aşı birleşme noktasından kabuk kaldırılmış ve anaç kısmında odun dokusunda iğne ucu şeklinde çıkıntılar ve kabukta buna uygun girinti simptomlar aranmıştır.

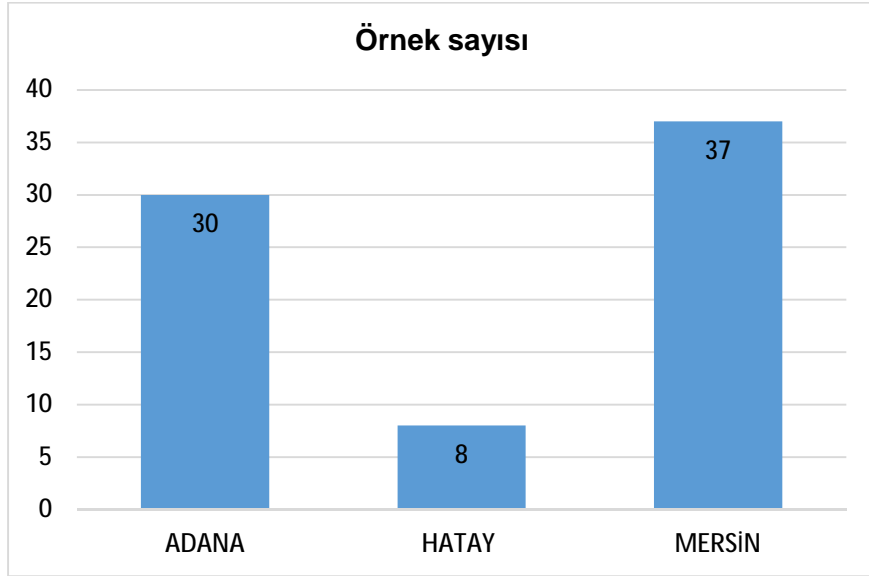
Alanda, turunç anacı üzerine yaygın olarak aşılınmış ağaçlarda belirtiler görülmüştür. Simptomların çoğu Mersin bölgesinde bulunmuştur. Genelde aşı noktasında iğne ucu, balık dişi (ping-holing) gibi simptomlar genelde Vaşinton portakallarında gözlenmiştir (Şekiller 4.2.-4.16.). Diğer yandan, ağaçlarda bodurluk şiddetli bir şekilde gözlenmiştir.

Örnekler ağaçlardan yeni sürgünler seçilerek ilkbahar ve sonbahar dönemlerindeki toplanmıştır. Cambra ve ark., (2000a; 2002) çalışmalarında ağaçların farklı vejetatif mevsimlerinde iki yıldan uzun bir süredir yaşça büyük bahçeleri gezmiş, Tristeza virüsüne açısından simptom gösteren ağaçları seçmiş ve CTV ile infekteli ağaçların örneklenmesi için en uygun mevsimin ilkbahar olduğunu belirlemiştir; çünkü bu dönemde hastalığın ağaçtaki en yüksek virüs konsantrasyonu seviyelerine ulaştığını bildirmişlerdir.

Diğer yandan, Cambra ve ark., (2000a; 2002) 'ları yaz mevsiminde virüslerin dokudaki konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Bu incelemelere dayanarak, örnekler toplanmış ve laboratuvarında analiz edilmiştir. Ayrıca İnce (1999), tarafından sunulan literatür raporlarında Türkiye'de orta dereceli sıcaklıklardaki mevsimlerde (Spesifik olarak Mayıs ve Ekim aylarında)

bitki dokularında virüsün yoğunluğunun fazla olduğunu doğrulayan raporlar bulunmaktadır.

Doğu Akdeniz bölgesi'nde Adana, Mersin ve Hatay illerinden toplanan 75 adet CTV örneklerinin (Çizelge 3.3. ve Şekil 4.1) TNA'nın ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonucunda, 5 µl örnek kullanılarak spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirilmiştir. Nükleik asitlerin konsantrasyonunu belirlemek için 260 ve 280 nm'de (DO 260/280) optik yoğunluk okuması yapılmıştır.



Şekil 4.1. Doğu Akdeniz bölgesi'nde illere göre alınan örnek sayıları



Şekil 4.2 Bodurluk veya gelişme geriliği (Sarı yapraklar)



Şekil 4.3. Bodurluk veya gelişme geriliği (Bodurluk ve az yapraklar).



Şekil 4.4. Ağaçta kloroz



Şekil 4.5. Ağaçta dal kurumaları



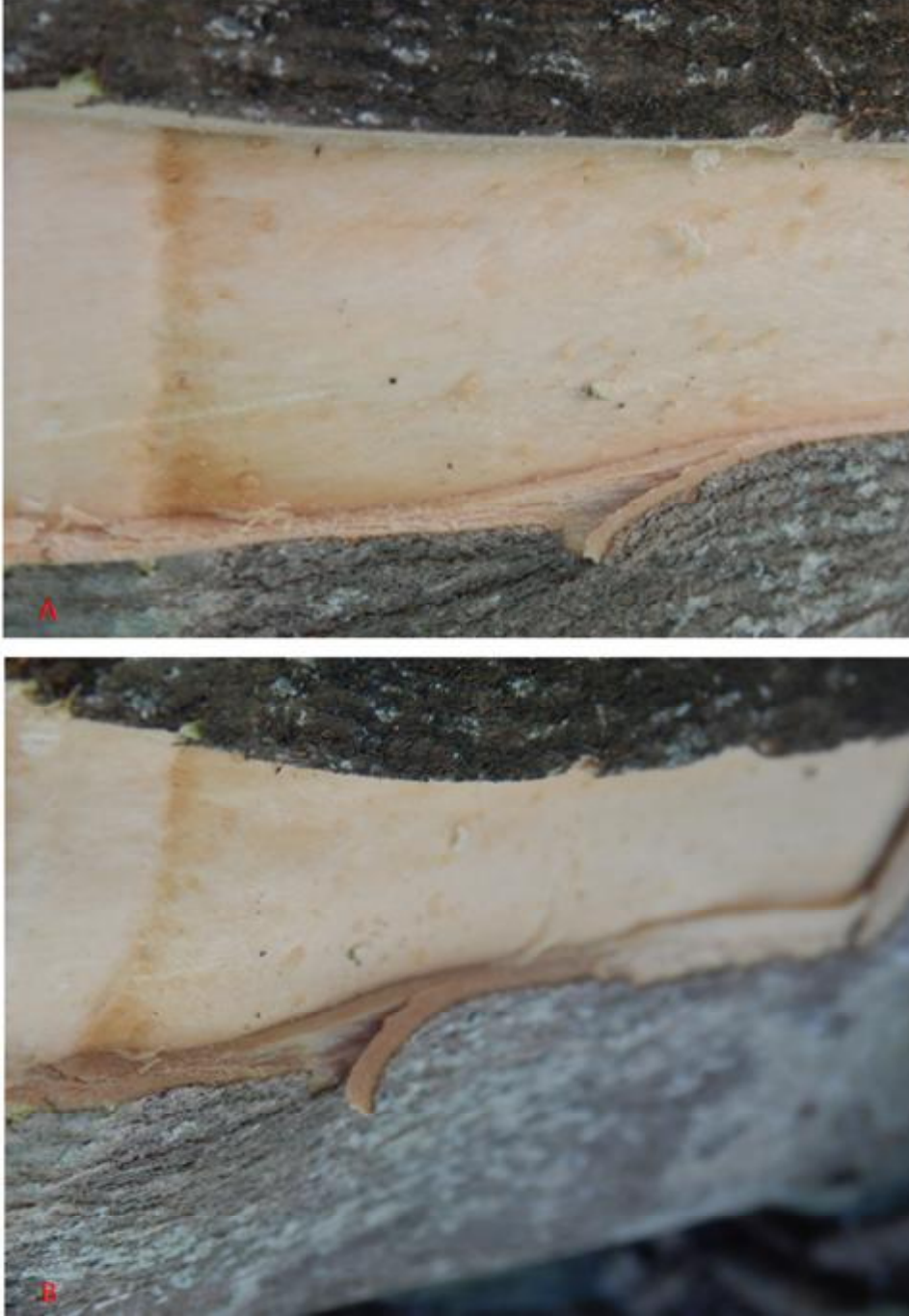
Şekil 4.6. Ağaçta genel az yapraklık, küçük yaprak oluşumu



Şekil 4.7. Ağaçta küçük yaprak oluşumu, genel olarak çalılaşma. Sağlıklı ağaç (A), ve infekte ağaç (B) görüntü nasıl olduğunu gözlenmektedir.



Şekil 4.8. Aşı birleşme noktasında kahverengileşme (uyumsuzluk ve nekroz); odun ve kabukta gözükmektedir.



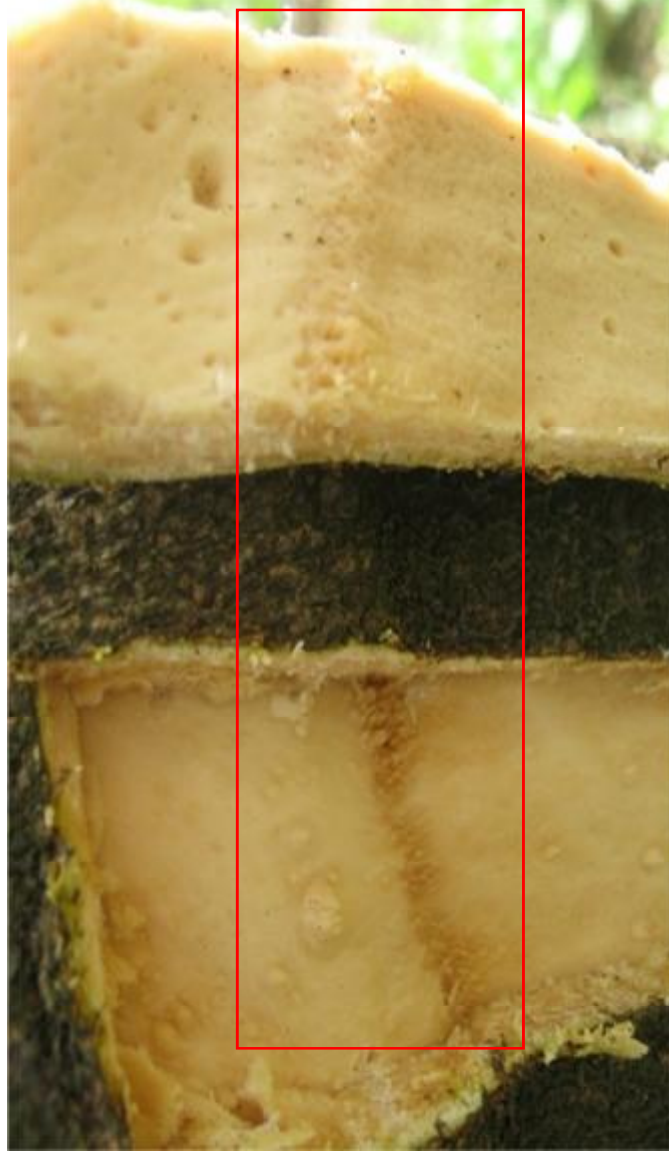
Şekil 4.9. CTV nin varlığını uyumsuzluğu birleşme noktasında deformasyon oluşturur (A,B).



Şekil 4.10. Kabukta çıkıntılara uygun girintileri (pin holing) gözükmemektedir



Şekil 4.11. Kabukta çıkıntılara uygun girintileri (pin holing) gözükmemektedir



Şekil 4.12. Tam aşı birleşme noktasında turunç bölümünde çıkıntılar, bulunmaktadır.



şekil 4.13. CTV sebebiyle Aşı birleşme noktasından aşağıya doğru turunç bۆlümünde '*balık dişi*' (parankima dokularında anormal bir bۆyümesi meydana getirir) şekilde çıkıntılar gۆrۆlmektedir.



Şekil 4.14. CTV sebebiyle Aşı birleşme noktasından aşağıya doğru turunç bölümünde '*balık dişi*' (parankima dokularında anormal bir büyümesi meydana getirir) şekilde çıkıntılar görülmektedir.



Şekil 4.15. CTV infekteli ağaçta aşı birleşme nokta farklıları görülmektedir.

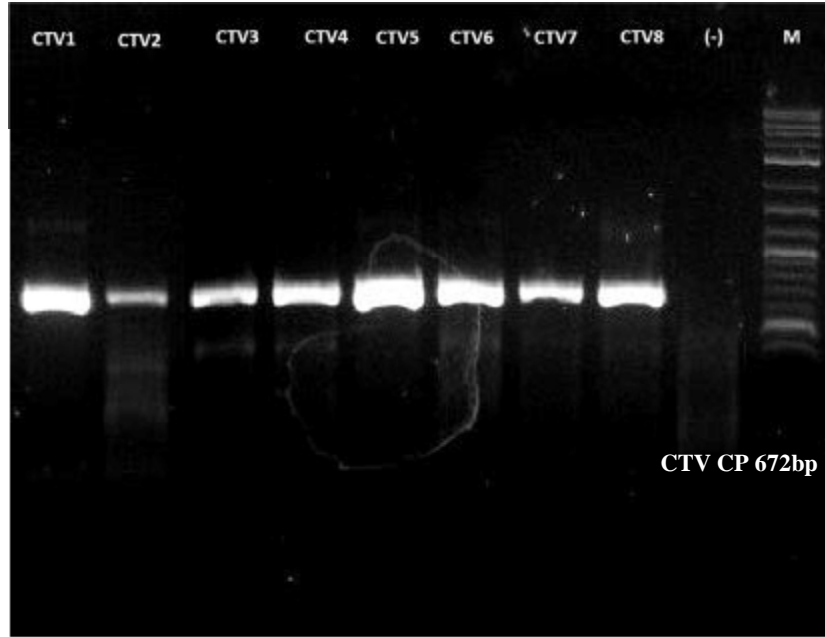


şekil 4.16. Sağlıklı bir ağağta aşı birleşme noktası

4.2. Moleküler çalışmalar ilgili bulgular

CTV'nin tanınması için TT-PZR metodu kullanılmıştır. RNA'nın konsantrasyonu 1ng/μL olacak şekilde ayarlanmıştır. İlk aşamada coat/manto protein (CP) gen spesifik primerler (CTV-CP-U) korunmuş bölgeler kullanılarak tanımlama yapılmış, ardından çoğaltmasını gerçekleştirilmiştir (Hilf ve Garnsey 2000). İlk aşamada cDNA elde etmek için ters transkripsiyon AMV Rtase kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünlerin bandlarını görmek için %1 agaroz jelde koşulup UV ile görüntülenmiştir.

TT-PZR sonuçlarında CTVCPU-F/CTVCPU-R primer çifti ile çoğaltılan örneklerde 672 bp bant seviyesinin gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Bu bant seviyesine olan sahip örnekler infekteli olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.17. CP'den TT-PZR ile amplifikasyonun analiz jel görüntüsü. Yaprak sapları ve kabuktan elde edilen cDNA, CTV-CP-U primer ve cDNA sentezi için kullanılan adaptör dizisi primerinin bir kombinasyonu kullanılarak TT-PZR için template olarak kullanılmıştır. Agaroz %1 jel elektroforezi ile elde edilen TT-PZR ürünlerinin bromid boyaması yapılmıştır.

Doğu Akdeniz Bölgesin’de TT-PZR çalışması yapmak için toplanan 75 örnekten 8 tanesinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17). Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil alanında Göçüren hastalığının etkilediğini gösteren birçok karakteristik simptomlar görülebilmektedir.

Çizelge 4.1. RT-PZR ile pozitif olduğu belirlenen örnekler, bulunduğu yerler (bahçeleri) görülmektedir.

KOD	BAHÇE YERİ
CTV 1-1	Karataş 4
CTV 1-2	Karataş 4
CTV 2-1	Karataş 3
CTV 2-2	Karataş 3
CTV 3-1	Mersin 2
CTV 3-2	Mersin 2
CTV 4-1	Mersin 3
CTV 4-2	Mersin 3

4.3. Sekansların analizi

Sekans analizi için, Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan örneklerden elde edilen 4 izolat kullanılmıştır. Ek olarak, CP amplifikasyonlarından türetilen 50 sekans seçilmiş ve MEGA 10 programında filoenetik analizler yapılmıştır (Şekil 4.18.). Bu DNA dizilimleri, Aling ClustalW metodu aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu sekanslar dendogram oluşturmak için kullanılmış, olası filogenetik karşılaştırmalar ile son yıllarda Türkiye’de ortaya çıkmış olabilecek evrimsel ilişkilerin tam ve kısmi uzunlukta olması sağlanmıştır (Şekil 4.18.).

Toplanan örneklerden elde edilen dizilerin hizalanmasından sonra, bunlar NCBI veri tabanına girilmiş ve GenBank’ta bulunan en yakın sekansları karşılaştırmak için bir BLAST gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.19.). Hizalama ve karşılaştırma için NCBI veri bankasında bulunan belirli benzerlik yüzdesine sahip

1350 veri kullanılmış ve bunlar içerisinde karşılaştırılma için daha önceki çalışmalarda belirlenen izolatlar kullanılmıştır (Şekil 4.19) (Yokomi ve ark., 2018; Çevik ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013; Fisher ve ark., 2013; Harper ve ve ark., 2010; Cerni ve ark., 2009), Tristeza virüsünün ırklarının moleküler özellikleri, önceden kurulmuş olan tarihi temellere göre farklılıkları Türkiye ve Dünya izolatlarının karşılaştırılması için kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, benzerlik yüzdeleri %100 ile % 91 arasında değişmiştir. CTV-T1 izolatı ile P09.22 ve Kaliforniya CCTEA-108 izolatları en yüksek benzerlik oranları göstermiştir. NCBI gen bankasında sunulan verilere gören % 100 benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada bulunan diğer izolatlarda, benzerlik oranları Çizelge 4.2'de görülebileceği gibi CTV-T1 izolatları için % 100 - %91 oranında gerçekleşmiştir.

CTV -T2, CTV -T3 VE CTV -T4 izole edilen örnekler NCBI veri tabanı sonuçlarına göre benzerlik yüzdeleri % 99 ve % 91 arasında değişmiştir (Çizelgeler 4.3., 4.4. ve 4.5.).

Albiach-Martí ve ark., (2000) ve Ruiz-Ruiz ve ark., (2006) 'nın yaptıkları çalışmalara göre genel olarak, farklı coğrafik orijinli CTV izolatları arasındaki dizi karşılaştırmaları ve sınırlı bir genotip farklılıklar ile zamansal ve yerel olarak ayrılan CTV genomları arasında yüksek benzerlik olduğunu göstermiştir.

Albiach-Martí ve ark., 2000 yılında B354 (Kaliforniya), B252 (Tayvan), B272 (Kolombiya) ve T30 (Florida) 'dan kullanılan değişken CTV genomlarının toplam nükleotid kimliklerinin genomik değişkenliğinin % 98.3'den % 100'e kadar değiştiğini göstermiştir. T30 ve T385 genotip dizileri arasında % 97.5 ile % 98.4 arasında bir değişkenlik bulunmuştur. Bu çalışmada, tüm izolatlar içinde yakınlık etkisinin nedeninin orijinleri aynı bölgeden (Asya) geldiği için ve üretim materyalleri ile zaman içerisinde yayıldığı ileri sürülmüştür.

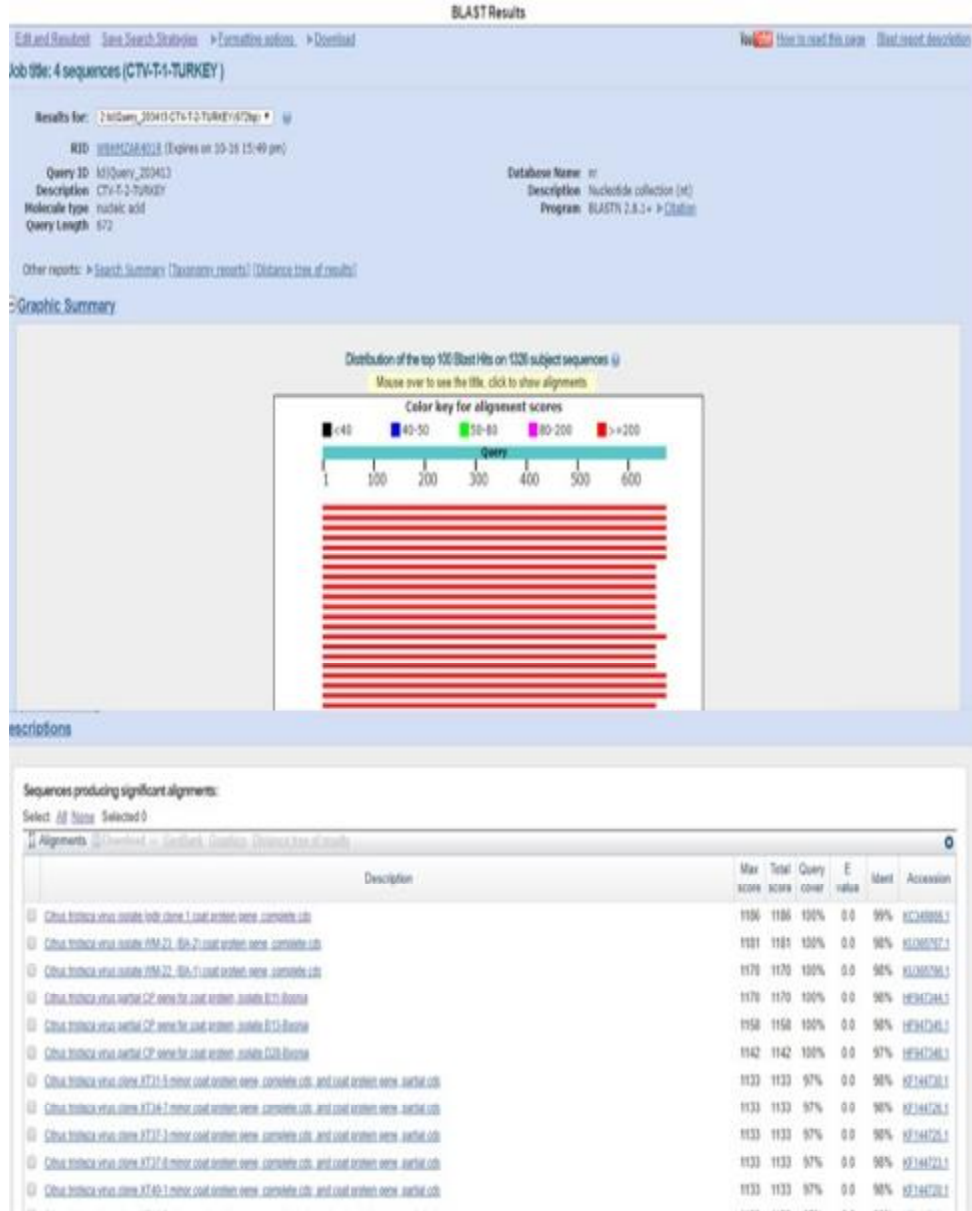
Fas'ın kuzeybatısında önemli bir CTV epidemisi tespit edilmiştir (Afechtal ve ark. 2011). Fas izolatı HF947330 aksesiyon numarası ile GenBank'ta temsil edilmektedir.

Afechtal ve ark.. (2011) nükleotid dizisinin analizini yaptığı zaman, Puerto Rico'dan (JF957196) (Roy, ve ark., 2013) *Poncirus trifoliata*'nın CTV direncini kıran (RB) B301 izolatu ile % 98.8'lik bir benzerlik yüzdesini göstermiştir.

Yeni Zelanda RB'si izolatu olan NZRB-90 izolatu ile % 97 (FJ525432) (Harper ve ark., 2010) benzerlik gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.18. MEGA10 ile analiz edilen sekansların dizileme görüntüsü



Şekil 4.19. NCBI GenBank platformunda kayıtlı bazı izolatların genom dizileri ve CTV-T2 izolatla karşılaştırılmasının görüntüsü.

RID: [WPCG099118](#) (Expires on 10-21 21:52 pm)

Query ID: IdlQuery_91218
 Description: CTV-T1-TURKEY
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 672

Database Name: nr
 Description: Nucleotide collection (nr)
 Program: BLASTN 2.8.1+ [PClick](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)
[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Send to](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Citrus tristeza virus isolate T55 coat protein (CP) gene, complete cds	1230	1230	100%	0.0	99%	KC341021.1
Citrus tristeza virus isolate CA-S14, complete genome	1219	1219	100%	0.0	99%	KJ589232.1
Citrus tristeza virus isolate CA-S14.65, complete genome	1216	1216	100%	0.0	99%	KJ589233.1
Citrus tristeza virus isolate RNY1-1 coat protein (CP) gene, partial cds	1195	1195	98%	0.0	99%	GQ121693.1
Citrus tristeza virus isolate CCTEA 108 P27 protein (P27) and P25 protein (CP) genes, partial cds	1181	1181	94%	0.0	100%	EU325936.1
Citrus tristeza virus isolate Jgdh clone 1 coat protein gene, complete cds	1175	1175	100%	0.0	98%	KC349866.1
Citrus tristeza virus isolate CA-P116 P27 protein (P27) and P25 protein (CP) genes, partial cds	1175	1175	94%	0.0	99%	EU325938.1
Citrus tristeza virus isolate CCTEA 114 P27 protein (P27) and P25 protein (CP) genes, partial cds	1175	1175	94%	0.0	99%	EU325938.1
Citrus tristeza virus isolate WM-33 (BA-7) coat protein gene, complete cds	1170	1170	100%	0.0	98%	KJ365767.1
Citrus tristeza virus isolate WM-32 (BA-7) coat protein gene, complete cds	1170	1170	100%	0.0	98%	KJ365766.1
Citrus tristeza virus partial CP gene for coat protein, isolate D28-Bosnia	1153	1153	100%	0.0	98%	HF547348.1
Citrus tristeza virus partial CP gene for coat protein, isolate B11-Bosnia	1153	1153	100%	0.0	98%	HF547349.1
Citrus tristeza virus isolate 443-2 coat protein mRNA, complete cds	1153	1153	100%	0.0	98%	KJ365768.1

[Questions/comment](#)

Şekil 4.20. NCBI GenBank CTV-T1 izolatu ile sekans karşılaştırılmada bazı yüzdeleri göstermektedir, en yakın ilişki Kaliforniya izolatları görülmektedir.

RID: WPCTG155016 (Expires on 10-21 21:52 pm)

Query ID: kclQuery_91219
 Description: CTV-T2-TURKEY
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 672

Database Name: nr
 Description: Nucleotide collection (nr)
 Program: BLASTN 2.8.1+ - [Help](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)
[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments [Download](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Citrus trichiza virus isolate Igdir clon. 1 coat protein gene, complete cds	1196	1186	100%	0.0	98%	KJ345865.1
Citrus trichiza virus isolate VM-23, IBA-2 coat protein gene, complete cds	1181	1161	100%	0.0	98%	KJ385767.1
Citrus trichiza virus isolate VM-32, IBA-1 coat protein gene, complete cds	1170	1170	100%	0.0	98%	KJ385768.1
Citrus trichiza virus partial CP gene for coat protein, isolate 211-Ecuador	1170	1170	100%	0.0	98%	HF347344.1
Citrus trichiza virus partial CP gene for coat protein, isolate 213-Bosnia	1158	1158	100%	0.0	98%	HF347345.1
Citrus trichiza virus partial CP gene for coat protein, isolate 203-Bosnia	1142	1142	100%	0.0	97%	HF347340.1
Citrus trichiza virus clone XT31-5 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144720.1
Citrus trichiza virus clone XT34-7 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144725.1
Citrus trichiza virus clone XT37-3 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144726.1
Citrus trichiza virus clone XT37-9 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144723.1
Citrus trichiza virus clone XT43-1 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144720.1
Citrus trichiza virus clone XT43-2 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144720.1
Citrus trichiza virus clone XT43-8 minor coat protein gene, complete cds, and coat protein gene, partial cds	1133	1133	97%	0.0	98%	KF144720.1

[Questions/comments](#)

Şekil 4.21. NCBI GenBank CTV-T2 sekans karşılaştırılarda bazı yüzdeleri göstermektedir. Bu sekans Iğdır izolatla ve farklı çevik tarafından rapor edilmiş Türkiye izolatları ile en yakın ilişkileri gösterilmektedir.

Query ID: [id\(Query_31220\)](#) Database Name: [nr](#)
 Description: [CTV-T3-TURKEY](#) Description: [Nucleotide collection \(nr\)](#)
 Molecule type: [nucleic acid](#) Program: [BLASTN 2.8.1+](#) [» Citation](#)
 Query Length: [672](#)

Other reports: [» Search Summary \(Taxonomy results\)](#) [\(Distance tree of results\)](#)

[Graphic Summary](#)
[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: [0](#)

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Citrus tristeza virus isolate İğdır clone 1 coat protein gene, complete cds	1192	1192	100%	0.0	99%	KJ349896.1
Citrus tristeza virus isolate VM-23 (BA-2) coat protein gene, complete cds	1186	1186	100%	0.0	99%	KJ385767.1
Citrus tristeza virus isolate VM-22 (BA-1) coat protein gene, complete cds	1175	1175	100%	0.0	99%	KJ385766.1
Citrus tristeza virus partial CP gene for coat protein, isolate B11-Bosnia	1158	1158	100%	0.0	98%	HF947344.1
Citrus tristeza virus partial CP gene for coat protein, isolate B13-Bosnia	1147	1147	100%	0.0	97%	HF947345.1
Citrus tristeza virus clone XT31-5 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144720.1
Citrus tristeza virus clone XT34-7 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144725.1
Citrus tristeza virus clone XT31-3 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144725.1
Citrus tristeza virus clone XT31-6 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144723.1
Citrus tristeza virus clone XT40-1 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144720.1
Citrus tristeza virus clone XT40-2 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144723.1
Citrus tristeza virus clone XT40-3 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1138	1138	97%	0.0	98%	KF144723.1
Citrus tristeza virus isolate CA-S1-1, complete genome	1136	1136	100%	0.0	98%	KJ349896.1

[Questions/comments](#)

Şekil 4.22. NCBI GenBank CTV-T3izolatı sekans karşılaştırmalarında bazı yüzdeler gözlemlenmektedir. Bu izolat, İğdır izolatı % 99 bir benzerlik yüzdesi bulunmuş ve Bosna izolatları en yakın ilişkileri görülmüştür.

Results for: [kciQuery_91221 CTV-T4-TURKEY\(6726\)](#)

RID: [WPC7029931.8](#) (Expires on 10-21 21:52 pm)

Query ID: kciQuery_91221
 Description: CTV-T4-TURKEY
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 672

Database Name: nr
 Description: Nucleotide collection (nr)
 Program: BLASTN 2.8.1+ [» Citation](#)

Other reports: [» Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#) [See a distance tree of these pairwise comparisons](#)

[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Circus tritaceae virus isolate Igdir clone 1 coat protein gene, complete cds	1208	1208	100%	0.0	99%	KC346826.1
Circus tritaceae virus isolate WM-33_Igdir coat protein gene, complete cds	1203	1203	100%	0.0	99%	KJ336532.1
Circus tritaceae virus isolate WM-32_Igdir coat protein gene, complete cds	1192	1192	100%	0.0	99%	KJ336536.1
Circus tritaceae virus partial CP gene for coat protein, isolate B11-Bosnia	1175	1175	100%	0.0	98%	HF947344.1
Circus tritaceae virus partial CP gene for coat protein, isolate B13-Estonia	1164	1164	100%	0.0	98%	HF947345.1
Circus tritaceae virus clone XT11-5 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144730.1
Circus tritaceae virus clone XT14-7 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144725.1
Circus tritaceae virus clone XT17-3 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144725.1
Circus tritaceae virus clone XT17-8 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144723.1
Circus tritaceae virus clone XT40-1 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144720.1
Circus tritaceae virus clone XT40-2 minor coat protein gene, complete cds and coat protein gene, partial cds	1158	1158	96%	0.0	99%	KF144719.1

[Questions/Comments](#)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?report=page&blastPGC=WPC7029931.8&query=Circus+CTV+91221&subject=Igdir+Isolat+20000](#)

Şekil 4.23. NCBI GenBank CTV-T4 izolatının sekans karşılaştırılmasındaki yüzdeler görülmektedir. İğdir izolatı % 99 bir benzerlik bulunmakta ve çevik tarafından rapor edilmiş Türkiye izolatları ile en yakın ilişkileri gösterilmektedir.

CTV'nin bölgemiz izolatlarının moleküler özelliklerinin belirlenmesi için hem Türkiye hem de dünya izolatlarının raporlarının NCBI verileri kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

Sadece bu çalışmada bulunan Türkiye izolatları % 96 - % 99 arasında bir benzerlik oranı görülmüştür.

Ancak doğal olarak elde edilen diğer ülke sonuçlarına göre, benzerlik yüzdesine göre ilk 50 izolatın sekanslardan benzerlik yüzdeleri %100 ile %91 arasında değişmektedir (Çizelgeler 4.2.; 4.3.; 4.4. ve 4.5.). Türkiye izolatları dışında, Kaliforniya'dan CA-S1-L ve T525 izolatları, Bosna'dan B11, Karadağ'dan T3, Hırvatistan'dan 16J, Fas'tan L-Clem3-Mor ve Yeni Zeland'dan NZRB-1 izolatları, NCBI elde edilen sonuçlara göre akrabalık yüzdelerine bakılarak bu çalışmada elde edilen CTV izolatlarına en yakın izolatlar olarak görülüp ve kabul edilmiştir.

Yokomi ve ark. (2018)'nin çalışmasına göre, GenBank veri tabanlarında özel bir analiz gerçekleştirerek elde ettiği dizilerle karşılaştırılırken, S1 izolasyonlarının nükleotidlerin farklı olması nedeniyle S1 gurubu olarak adlandırılan farklı bir gurup olduğu ortaya çıktığını, ve bu S1 gurubunun Çin, Güney Kore, Türkiye, Bosna ve Hırvatistan gibi ülkelerde de görülebileceğini öne sürmüşlerdir.

Çizelge 4.2. CTV -T1 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.

İzolatlar (%) Benzerlik	Orijin	CTV-T1
P09.22	Kaliforniya	100
CCTEA-108	Kaliforniya	100
CA-S1-L	Kaliforniya	99
T525	Kaliforniya	99
CA-P116	Kaliforniya	99
IGDIR	Türkiye	98
WM-23-BA-2	Türkiye	98
B11	Bosna	98
D28	Bosna	98
EG-11_(EK-2)	Türkiye	97
EBS-38_(DK-4)	Türkiye	97
L-Clem3-Mor	Fas	97
CY95-14-46	Kıbrıs	97
16J	Hırvatistan	97
T3	Karadağ	97
NZRB-1	Yeni Zelanda	97
Nzrb-th30	Yeni Zelanda	97
Khanpur85	Pakistan	97
Kpg2	Hindistan	97
Ctv-South-Korea	Güney Kore	97
Y8	Çin	97
XT34-7	Çin	97
15.14	São Tomé ve Príncipe	97
6.5	São Tomé ve Príncipe	97

Çizelge 4.2. Devamı

Arscott38	Jamaika	97
CampbellsCastle13	Jamaika	97
TAM11	Meksika	97
EM-7-DA-3	Türkiye	96
42J	Hırvatistan	96
MAIB_Q109	Sırbistan	96
S12	Çin	96
SNH-9-sA-Tp3	Uruguay	96
T36	Florida	95
FS701-T30	USA	95
SY576	Kaliforniya	94
Qaha	Mısır	94
A18	Tayland	94
VT	İsrail	93
SY568	Kaliforniya	93
176	İspanya	92
CTV-0032-italy	İtalya	92
IT08-4-ITALY	İtalya	92
T30	Florida	92
FS674-T36	USA	92
HA16-5	USA	92
B26	İsrail	91

Çizelge 4.3. CTV- T2 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.

İzolatlar (%) Benzerlik	Orijin	CTV-T2
IGDIR	Türkiye	99
WM-23-BA-2	Türkiye	98
B11	Bosna	98
XT34-7	Çin	98
P09.22	Kaliforniya	97
CA-S1-L	Kaliforniya	97
CCTEA-108	Kaliforniya	97
T525	Kaliforniya	97
CA-P116	Kaliforniya	97
D28	Bosna	97
EG-11_(EK-2)	Türkiye	97
16J	Hırvatistan	97
Khanpur85	Pakistan	97
Ctv-South-Korea	Güney Kore	97
EBS-38_(DK-4)	Türkiye	96
L-Clem3-Mor	Fas	96
CY95-14-46	Kıbrıs	96
T3	Karadağ	96
NZRB-1	Yeni Zelanda	96
NZRB-TH30	Yeni Zelanda	96
Kpg2	Hindistan	96
Y8	Çin	96
15.14	São Tomé ve Príncipe	96
6.5	São Tomé ve Príncipe	96

Çizelge 4.3. Devamı

Arscott38	Jamaika	96
CampbellsCastle13	Jamaika	96
TAM11	Meksika	96
EM-7-DA-3	Türkiye	96
42J	Hırvatistan	96
MAIB_Q109	Sırbistan	96
S12	Çin	96
SNH-9-sA-Tp3	Uruguay	96
T36	Florida	94
FS701-T30	USA	94
Qaha	Mısır	94
SY576	Kaliforniya	93
A18	Tayland	93
VT	İsrail	93
SY568	Kaliforniya	92
CTV-0032-italy	İtalya	92
IT08-4-ITALY	İtalya	92
T30	Florida	92
FS674-T36	USA	92
176	İspanya	91
HA16-5	USA	91
B26	İsrail	91

Çizelge 4.4. CTV- T3 ile NCBI'de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.

İzolatlar (%) Benzerlik	Orijin	CTV-T3
IGDIR	Türkiye	99
WM-23-BA-2	Türkiye	99
B11	Bosna	98
XT34-7	Çin	98
P09.22	Kaliforniya	97
CA-S1-L	Kaliforniya	97
CCTEA-108	Kaliforniya	97
T525	Kaliforniya	97
CA-P116	Kaliforniya	97
D28	Bosna	97
EG-11_(EK-2)	Türkiye	97
16J	Hırvatistan	97
Ctv-South-Korea	Güney Kore	97
Y8	Çin	97
EBS-38_(DK-4)	Türkiye	96
L-Clem3-Mor	Fas	96
CY95-14-46	Kıbrıs	96
T3	Karadağ	96
NZRB-1	Yeni Zelanda	96
Nzrb-th30	Yeni Zelanda	96
Khanpur85	Pakistan	96
Kpg2	Hindistan	96
15.14	São Tomé ve Príncipe	96
6.5	São Tomé ve Príncipe	96

Çizelge 4.4. Devamı

Arscott38	Jamaika	96
CampbellsCastle13	Jamaika	96
TAM11	Meksika	96
EM-7-DA-3	Türkiye	96
42J	Hırvatistan	96
S12	Çin	96
SNH-9-sA-Tp3	Uruguay	96
T36	Florida	94
FS701-T30	USA	94
Qaha	Mısır	94
SY576	Kaliforniya	93
A18	Tayland	93
VT	İsrail	93
SY568	Kaliforniya	92
176	İspanya	92
CTV-0032-italy	İtalya	92
IT08-4-ITALY	İtalya	92
T30	Florida	92
FS674-T36	USA	92
HA16-5	USA	91
B26	İsrail	91

Çizelge 4.5. CTV- T4 ile NCBI’de kayıtlı izolatlardan elde edilen karşılaştırma ve benzerlik oranları görülmektedir.

İzolatlar (%) Benzerlik	Orijin	CTV-T4
IGDIR	Türkiye	99
WM-23-BA-2	Türkiye	99
XT34-7	Çin	99
B11	Bosna	98
D28	Bosna	98
CA-S1-L	Kaliforniya	98
P09.22	Kaliforniya	97
CCTEA-108	Kaliforniya	97
T525	Kaliforniya	97
CA-P116	Kaliforniya	97
EG-11_(EK-2)	Türkiye	97
EBS-38_(DK-4)	Türkiye	97
L-Clem3-Mor	Fas	97
16J	Hırvatistan	97
NZRB-1	Yeni Zelanda	97
Khanpur85	Pakistan	97
Ctv-South-Korea	Güney Kore	97
Y8	Çin	97
6.5	São Tomé ve Príncipe	97
CY95-14-46	Kıbrıs	96
T3	Karadağ	96
Nzrb-th30	Yeni Zelanda	96
Kpg2	Hindistan	96
15.14	São Tomé ve Príncipe	96
Arscott38	Jamaika	96

Çizelge 4.5. Devamı

CampbellsCastle13	Jamaika	96
TAM11	Meksika	96
EM-7-DA-3	Türkiye	96
42J	Hırvatistan	96
S12	Çin	96
SNH-9-sA-Tp3	Uruguay	96
T36	Florida	95
FS701-T30	USA	95
SY576	Kaliforniya	94
Qaha	Mısır	94
A18	Tayland	94
VT	İsrail	93
SY568	Kaliforniya	93
176	İspanya	92
CTV-0032-italy	İtalya	92
IT08-4-ITALY	İtalya	92
T30	Florida	92
FS674-T36	USA	92
HA16-5	USA	92
B26	İsrail	91

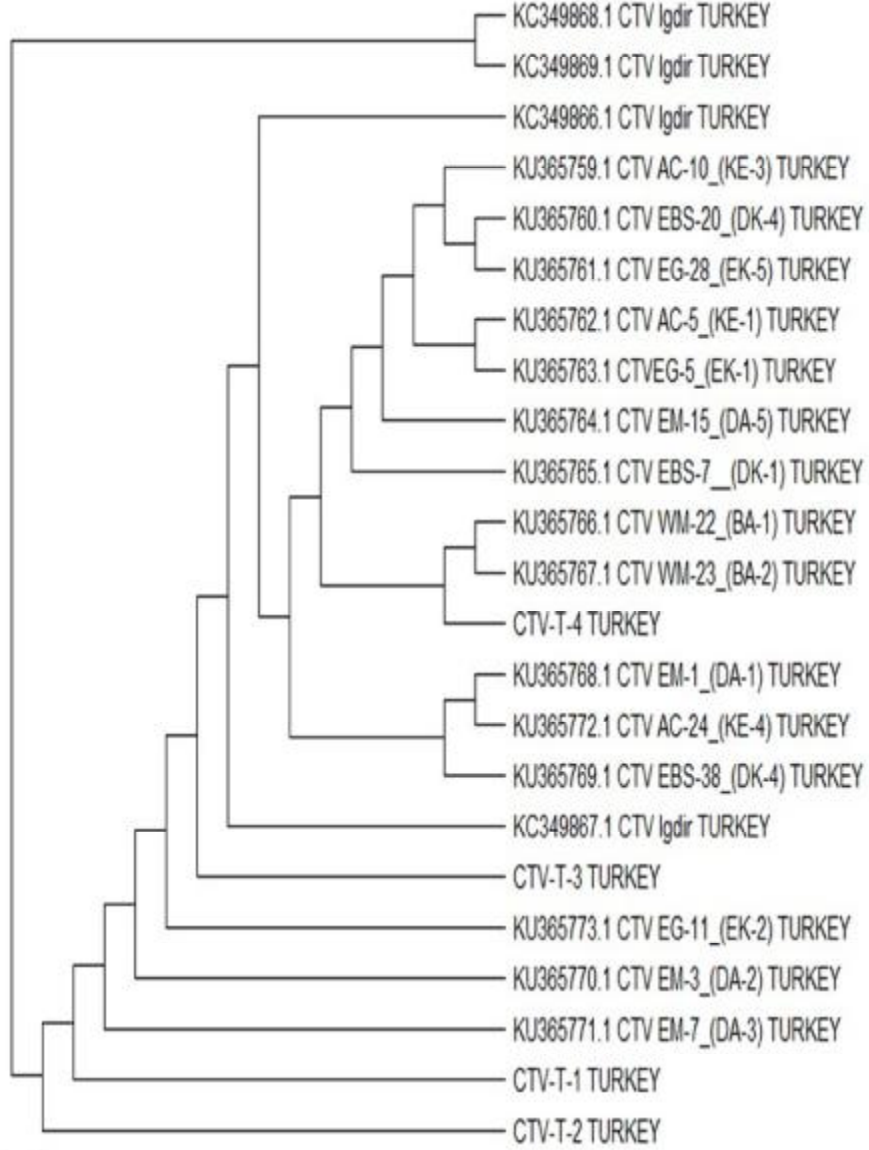
4.4. Dendogram oluşturmasının ve analizleri

Bu çalışmada elde edilen izolatlar, CTV-T1 ve CTV-T2 izolatları arasında %99,9 oranında ve CTV-T3 ve CTV-T4 izolatları arasında %99,00 oranında benzerlik yüzdesi göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar ile Türkiye'de önceden yapılmış olan izolatları ile ilgili çalışmalar karşılaştırırken, filogenetik olarak aynı genotip grubuna ait olduklarını belirlenmiştir (Şekil 4.24).

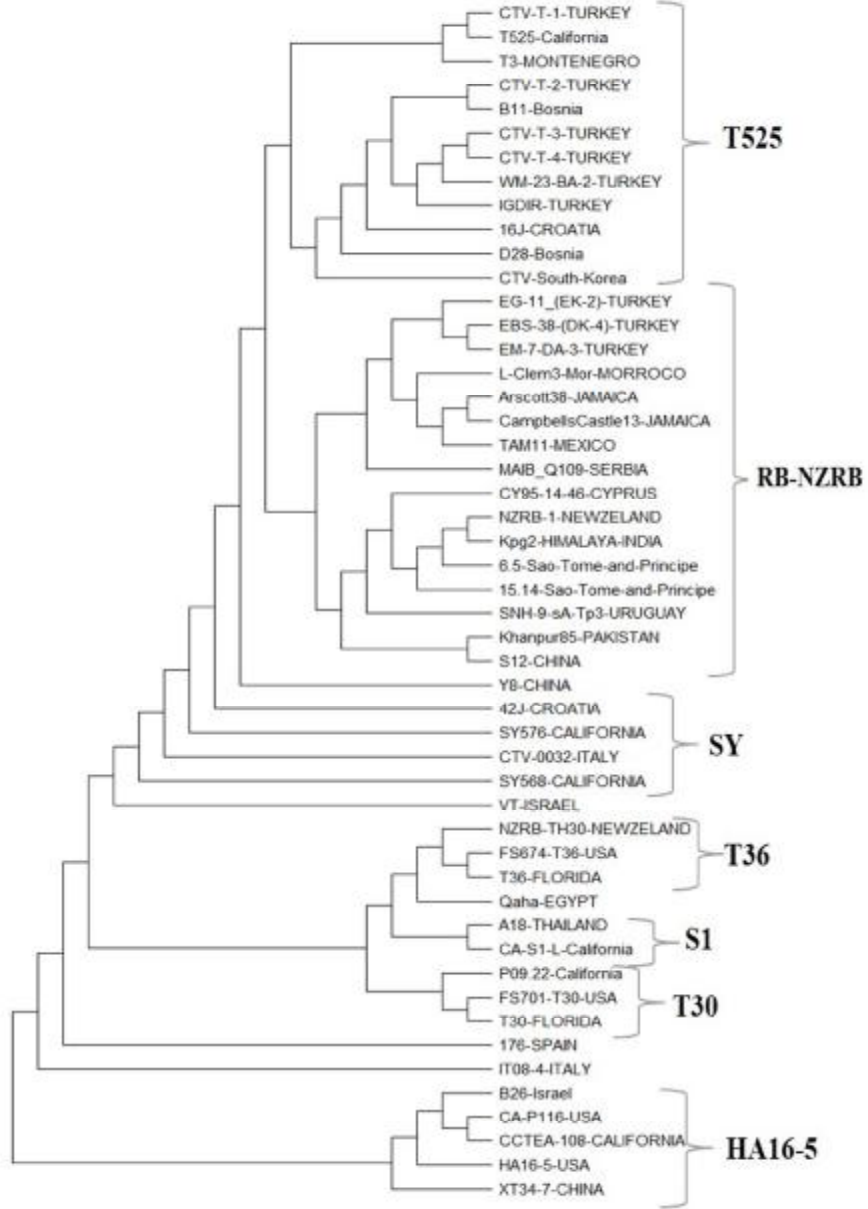
Genel filogenetik ilişkiler ağacı yapmak için 50 tane sekans kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre soy ağacı 7 tane büyük grup gözlemlenmiştir (Şekil 4.25). *Turunçgil tristeza virüsü* kuvvetli ırkına karşılık gelen SY grubu (AF001623) ait üyeleri ile minimum %92, maksimum % 96 benzerlik yüzdesi bulunmuştur.

CTV-T1 izolat grubunun T525 genotipi ile dikkate değer sekans benzerliği göstermiştir (şekil 4.25). Ancak Türkiye izolatları ile Kaliforniya izolatları arasındaki benzerlik ve filogenetik ilişkilerin yüzdesindeki bu yakınlığı anlamak için, kıtalararası üretim materyallerinin kolay bir şekilde transfer edilmesi ve ülkemize değişik yollarla çok fazla miktarda Kaliforniya'dan turunçgil üretim materyalleri getirilmesi örnek verilebilir.

İsrail'den şiddetli VT (U56902) izolatın grubu içinde başka mevcut izolatı bulunmamıştır. Ülkemizde örneklenen bölgeler T36 (AY170468) grubu içinde sonuçlar benzerlik yüzdelerinin sekanslarında %97 ile %92 arasında benzerlik değişen geniş bir yelpazede yayılmış olarak görülmüştür. Kaliforniya, yeni bir orta şiddetli izolatlarla karşılık S1 grubu (KU589213) bulunmaktadır, bu araştırmanın CTV-T'ler izolatlarına göre benzerlik yüzdeleri % 99 ile % 93 arasında göstermiştir.



Şekil 4.24. Evrimsel olarak Türkiye’de bu çalışmadaki izolatlar ile eski Türkiye izolatları arasındaki genetik ilişkiler gösterilmektedir.



Şekil 4.25. Benzerlik gösteren ilk 50 sekanstan dendrogram filogenetik ilişkileri gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre 7 tane büyük grup gözlemlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar (CTV-T1, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4) T525 Kaliforniya izolatları ile aynı grubunda yer almıştır.

Ruiz-Ruiz ve ark., (2006) dokuz CTV izolatı için rapor edilen tüm sekansların filogenetik analizini yaparken, İspanya'dan şiddetli SP izolatları T318A'yı içeren üç ana grup ortaya çıkarmışlardır.

Aynı zamanda, Moreno (2008), izolatlar arasındaki bir popülasyon yapısının değişebildiğini, bazıları baskın bir dizi ve yakın ilişkili bazı varyantlardan oluştuğunu ve diğerlerinin çok farklı sekans varyantlarına sahip karmaşık bir yapıya sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, bu alandaki CTV popülasyonlarını şekillendiren izolatların farklılığını yaratabilecek birçok faktör olduğunu açıklamışlardır.

Filogenetik ağaçlarda, bu çalışmada elde edilen tüm izolatların Adriyatik bölgesinden izolatlarla benzerlik bulunmuştur.

Bu izolatlar, RB izolatları ile benzerlik göstermekte ve bu izolatlara üç yapraklı anaçları duyarlılık görülmektedir (Harper ve ark., 2010; Cerni ve ark., 2009). Bu bölgelerde üçyapraklı anacı yoğun kullanımından dolayı, *P. trifoliata*'nın CTV'ye duyarlılık geliştirmesi önemlidir. Çeşitli CTV genotiplerinin bir rezervuar bölgesini oluşturan Doğu Adriyatik bölgesi'nden infekteli materyal sürekli olarak yayıldığı belirtilmiştir (Cerni ve ark., 2009).

Doğu Adriyatik bölgesinde etkin bir vektörün ve CTV yayılım hızı bildirilmediği düşünüldüğünde, bu bölgedeki bu yüksek dizilim değişkenliğinin tek uygun açıklaması, başlangıçta farklı CTV ile infekteli turuncuğil materyallerinin geçtiğimiz yüzyılda, özellikle Japonya, ve Türkiye gibi ülkelerden elde edilmesi sebebiyle olduğu düşünülmektedir (Gatin 1992, Stamo ve ark., 2000).

Bu çalışma ile elde edilen Türkiye izolatlarının T525 Kaliforniya izolatına genetik olarak benzemesi, Blast analizi ve filogenetik ağaçlanmalarda eski Türkiye izolatları ile % 96 ile % 99 arasında yakın olarak eşleşmesi ile CTV ile ilgili ülkemizde moleküler olarak yapılan son çalışmalar olan Korkmaz ve ark., (2008) ve Çevik ve ark., (2013)'nin yaptıkları çalışmalarla aynı doğrultuda sonuçlar çıkmıştır. Sonuçlar ile daha önce yapılan bu çalışmalar birbirini doğrular niteliktedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğu Akdeniz bölgesinde bu çalışmada Adana, Mersin ve Hatay'dan infekteli olduğu düşünülen 11 bahçede 75 örnek üzerinde araştırmalar yapılmış ve Adana'da 2 farklı bahçede ve Mersin'de 2 farklı bahçede 8 örnekte, *Turunçgil tristeza virüsü* (CTV) pozitif olduğu TT-PZR testi kullanılarak tespit edilmiştir.

Bu örneklerden 4 tanesine sekans analizi yapılmış ve sekans sonucu daha önce ülkemizde yapılan çalışmalarda elde edilen Türkiye izolatları ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir;

CTV-T1 izolatu bazı Kalifornia izolatları ile %100 benzerlik gösterirken, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4 izolatları diğer eski Türkiye izolatları ile %96-%99 arasında benzerlik göstermektedir.

CTV-T4 izolatının, CTV Iğdır izolatu ile yüksek derecede benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Ek olarak, aralarında Iğdır, Deniz kuyusu, Dört Yol ve farklı Mersin izolatlarında bulunduğu eski izolatlardan faydalanılmak istenmiş ama bu izolatların eradike edildiği gözlenmiş, bu eski izolatların bulunduğu bahçelerde yakın bölgeler örneklenmiş, ancak bu bahçelerden toplanan örneklere TT-PZR uygulandığında CTV ile bulaşık olan bir örneğe rastlanmamıştır.

Bulunan izolatların Adriyatik bölgesi izolatlarına genetik benzerliği, Türkiye'den bu bölgeye bitki materyalinin taşınması olarak düşünülmektedir. Bitkisel malzemenin Doğu Adriyatik bölgesine taşınması, Bosna, Hırvatistan, Karadağ ve Sırbistan'dan izolatları ile Türkiye'nin CTV-T1, CTV-T2, CTV-T3 ve CTV-T4 arasındaki benzerliğin olası sebeplerinden biri olabilir.

Evrimsel mesafelerin karşılaştırılması sırasında, VT ve SY gibi şiddetli izolatlarla yeterli bir benzerlik görülmemiştir.

Dayanık kırılması "RECISTANCE BREAKING" RB'yi gösteren çeşitli dizilimlerle benzerliklerin bilinmesi, bir sonraki CTV salgınına önlemek için yapılacak çalışmaların başarılması için büyük önem taşıyabilmektedir. *Poncirus'a*

aşıl原因an ağaçlardan elde edilen Fas, Yeni Zelanda ve Jamaika gibi ülkelerin izolatları, şu anda Türkiye'de bulunan izolatlarla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen yeni CTV izolatları daha önceki yapılan çalışmalarda elde edilen izolatlarla yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik içinde daha önceki yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarda eski CTV izolatlarının ılımlı ırklar yanında diğer orta ve şiddetli ırkların bir karışımı olarak bulunduğu, cross-protection sayesinde şiddetli ırkların ön plana çıkamadığı bildirilmiştir. Yeni belirlenen CTV izolatlarının bu CTV ırklarının karışımı olarak bulunması muhtemeldir. Yapılacak diğer çalışmalarda bu karışımın belirlenmesi için ek çalışmalar yapılmalıdır. Bu yapılacak çalışmalar CTV evrimi, spesifik ırkların tespiti ve çapraz koruma için önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abbas M., Khan M. M., Fatima B., Iftikhar Y., Mughal S. M., Jaskan, M. J., Khan I. A. ve Abbas, H. 2008. Elimination of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) and production of certified citrus plants through shoot-tip micrografting. *Pakistan Journal of Botany* 40 (3): 1301-1312.
- Afechtal M., Djelouah K. ve D'Onghia A.M., 2011. Detection of an outbreak of *Citrus tristeza virus* in Morocco. *Integr Control Citrus Fruit Crops IOBC/wprs Bull* 62:12
- Afechtal M., D'onghia Ana M., Cocuzza E. ve Djelouah K. 2018. First Report Of The *Citrus Tristeza Virus* Resistance-Breaking Strain in Morocco. *Journal Of Plant Pathology Società Italiana Di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.)* 2018
- Albiach-Marti, M. R., Guerri, J., Cambra, M., Garnsey, S. M. and Moreno, P. 2000a. Differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates by serological analysis of the p25 coat protein peptide maps. *J. Virol. Methods.* 88: 25-34.
- Albiach-Marti, M. R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J. F. ve Moreno, P. 2000b. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology.* 90: 134-138.
- Ayllón M.A., López C., Navas-Castillo J., Mawassi M. ve Dawson W.O., 1999a. New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation. *J Gen Virol* 80: 871-821.
- Ayllón M.A., Rubio L., Moya A., Guerri J.V. ve Moreno P., 1999b. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology* 255: 32-39.

- Albiach-Marti M. R., Mawassi M., Gowda S., Satyanayanana T., Hilf M. E., Shanker S., Almira E. C., Vives M. C., Lopez C., Guerri J., Flores R., Moreno, P., Garnsey S. M. ve Dawson W. O. 2000c. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. J. Virol. 74: 6856-6865.
- Ayllón M. A., López C., Navas-Castillo J., Garnsey S., M. Guerri J., Flores R. ve Moreno P., 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CVT) RNA: Incidence of three sequences types in isolates of different origin and pathogenicity. Arch. Virology. 146: 27-40.
- Allyón M.A., Rubio L., Sentandreu V., Moya A., Guerri J. ve Moreno P, 2006. Variations in Two Gene Sequences Of *Citrus Tristeza Virus* After Host Passage. Virus Genes 32, 119–28.
- Azeri T., 1973. First report of Satsuma dwarf virus disease on Satsuma mandarins in Turkey. Plant Dis. Report. 57: 149-152.
- Azeri T., Heper E., 1978. Ege Bolgesinde Satsuma Mandarinlerinde Gorulen Virus Hastaliklarinin Tanimi, Yayilisi, Ekonomik Onemi Uzerinde Arastirmelar. Tubitak, TOAG, Yayin No,389, Seri No, 79, Ankara: 58 p.
- Azeri T. Ve Karaca Y., 1978. Investigation on the Tristeza (quick decline) virus diseases in Satsuma mandarins: its definition crop losses and and determination of the strains in Izmir provinces. J. Turkish Phytopath. Vol. 7 (2) 51-68.
- Azeri T., 1981. Decline Of Satsuma Mandarin Orange In Turkey. J. Turkish Phytopath. Vol. 10, Num. 1, 37-44, 1987.
- Azeri T., 1984. Izmir Ilindeki Satsuma Mandarinlerinde Gocuren (Tristeza=Quic Decline) Hastaliginin Zarar Derecesi, Tanimi, Dagilisi ve Farkli Irklarinin saptanmasi Uzerindeki Arastirmalar. Tarim Orma Bakanligi. Zirai Mucadele Zirai Karantina Arastirma Eserleri serisi, No, 45. Anakara: 99 p.

- Barbarossa L. ve Savino V., 2006. Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dot-blot hybridization. *JPhytopathology* 154: 329-335.
- Ballester-Olmos J. F., Pina J. A., Carbonell E. A., Moreno P., Hemoso De Mendoza A., Cambra M., 1993. Biological Diversity Of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) Isolates in Spain. *Plant Pathol.* 42, 219–229.
- Baloğlu S., 1988. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerde Zararlı Ve Serolojik: Yöntemlerle (ELISA Ve Sds- Immunodiffusion Testleri) Saptaması Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 188 S.
- Baloglu S., Birisik N. 2009. Historical Review Of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) And its Vectors in Turkey. *Ciheam, Options Méditerranéennes : Série B. Etudes Et Recherches*; N. 65., 2009, Pages 85-88.
- Bar-Joseph M. ve Loebenstein G., 1973. Effects of strain, source plant, and temperature on transmissibility of *Citrus tristeza virus* by melon aphid. *Phytopathology* 63: 716-720.
- Bar-Joseph, M., S.M. Garnsey ve D. Gonsalves. 1979. The Closteroviruses: A Distinct Group Of Elongated Plant Viruses. *Advances In Virus Research.* 25: 93-168.
- Bar-Joseph, M., Marcus R. ve Lee R.F., 1989. The Continuous Challenge Of *Citrus Tristeza Virus* Control. *Annu. Rev. Phytopath.* 27: 291-316.
- Bar-Joseph M. ve R.F. Lee. 1990. *Citrus Tristeza Virus*. Description Of Plant Viruses. No. 353. Common Wealth Mycological Institute/Association Of Applied Biologists. Kew, Surrey, Uk.
- Benatena H.N. ve Portillo M.M., 1984. Natural Spread Of Psorosis In Sweet Orange Seedlings. Proceedings Of The 9th Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists. Riverside, Ca, Usa: Iocv, 159–64.

- Bertollini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, De Luis A, Vidal E, Perez-Panades J, ve Cambra M., 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. Eur J Plant Pathol 120:177-188.
- BLAST, 2018. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Erişim tarihi 08-10-2018.
- Bové J.M. 1966. Citrus virus diseases in the Méditerranéan area. Proceedings of the meeting on phytiatric and phytopharmacy. Marseille 1965 (France)
- Bové, J.M. ve Vogel, R., 1980. Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of colour slides. eds. Paris, I.R.F.A. SETCO-FRUITS.
- Bové C, Vogel R, Albertini D. ve Bove J. M. 1988. Discovery of a strain of Tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. Proc. Int. Organ. Citrus Virol. 10:14–16.
- Bové J.M. 1995. Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region. FAO Rome eds: 518 pp.
- Bozan, O., 2002. Aşağı Seyhan Ovasında *Trunçgil Tristeza Virus (Ctv)* Hastalığının Sörveyi Ve Tanısı Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 88 P.
- Broadbent P, Brlansky R.H. ve Indsto J., 1996. Biological characterization of Australian isolates of *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. Plant Dis. 80: 329-333.
- Cambra, M., Moreno p. ve Navarro L. 1979. Detecion rapida del *virus de la Tristeza de los citricos* CTV mediante la tecnica inmuno enzimatica ELISA sandwich. ANN. Ser. Prot. Veg. 12pp115-125.
- Cambra, M., E. Camarasa, M.T. Gorris, S.M. Garnsey ve E. Corbenell,1991. Comparison of different immunosorbent assays for *Citrus tristeza virus* (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. In Proc. 11th Int. Organ. Citrus Virol. (Eds. R.H.Brlansky, R.I. Lee and L.W. Timmer). IOCV, Riverside, CA, p. 38-45.

- Cambra, M., Camarasa, E., Gorrís, M.T., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. ve Tsai, M.C., 1993. Epitope diversity of isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV) in Spain. In: Moreno, P., da Graça, J., Timmer, L.W. (Eds.), Proceedings of the 12th International Conference Organ Citrus Virology, IOCV. Riverside, pp. 33–38.
- Cambra M., ve P. Moreno. 2000. Tristeza. In: P Moreno, N. Durán-Vila (eds.). Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 213 pp.
- Cambra, M., Gorrís M. T., Marroquín C., Román M., P. Olmos, A. Martínez ve M. C., 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71, 85–95.
- Cambra M., Gorrís M. T., Román M. P., Terrada E., Garnsey S. M. Ve Camarasa E., 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting–ELISA method using specific monoclonal and recombinant anti-bodies. In J. V. da Graça, R. F. Lee, & R. K. Yokomi (Eds), Proceedings of 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV (pp. 34–41). Riverside.
- Cambra M., Olmos A., Gorrís M. T., Marroquín C., Esteban O. ve Garnsey S. M., 2000c. Detection of *Citrus tristeza virus* by print-capture and squash capture-PCR in plant tissues and single aphids. In J. V. da Graça, R. F. Lee, & R. K. Yokomi (Eds), Proceedings of 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV (pp. 42–49). Riverside.
- Cambra, M., Gorrís, M. T., Olmos, A., Martínez, M. C., Román, M. P., Bertolini, E. 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. In N. Duran-Vila, R. G. Milne, & J. V. da Graça (Eds), Proceedings of 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV (pp. 69–77), Riverside.

- Chapot, H. 1961. Impietratura in Mediterranean countries. In Proc. 2nd Conf IOCV, p. 177-181. Gainesville, Univ. Fla. Press.
- Cerni S., Skoric D., Ruscic J., Krajacic M., Papic T., Djelouah K., Ve Nolasco G., 2009. East Adriatic A Reservoir Region Of Severe *Citrus Tristeza Virus* Strains. Eur J Plant Pathol. 2009.
- Cengiz A., Tekinel N., Dolar M.S. ve Nas Y.Z., 1976. Akdeniz Bolgesinde *Turuncgil Virüs hastalıkları* üzerine araştırmalar. Bitki Koruma Bulteni, 16. (2): 63-79.
- Çevik Bayram, Nejla Yard ve Savaş Korkmaz, 2013. The First Identified *Citrus Tristeza Virus* Isolate Of Turkey Contains A Mixture Of Mild And Severe Strains Plant Pathol. J. 29(1) : 31-41 (2013).
- Citrus Tristeza Virus* And Its Vectors In Florida. Available From: https://www.researchgate.net/publication/266276014_Citrus_Tristeza_Virus_And_Its_Vectors_In_Florida. Erişim tarihi 20-09- 2018.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S., ve Sas, G., 1993. Citrus Virus And Virus Like Diseases İn The Eastern Mediterranean Region Of Turkey. In: P. Moreno, J.V. Da Graça And L.W. Timmer, (Eds.), Proc.12 Conf. Iocv, Riverside, Ca, Usa, Pp. 397-400.
- Costa A. S. Ve Grant T. J., (1951). A mild strain of the *Tristeza virus* of citrus. *Phytopathology* 41 114–122.
- Consejería De Agricultura, Pesca Y Desarrollo Rural Dirección General De La Producción Agrícola y Ganadera Servicio De Sanidad Vegetal. 2009. Bulletin *Toxoptera Citricida*, Vector Del *Virus De La Tristeza* (CTV) 2009.
- Da Graça J.V., Marais L.J. Ve Von Broembsen L.A., 1984. Severe tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. En: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-65.

- Derrick K.S., Brlansky R.H., Da Graça J.V., Lee R.F., Timmer L.W. ve Nguyen T.K., 1988. Partial Characterization Of A Virus Associated With Citrus Ringspot. *Phytopathology* 78, 1298–301.
- Dickson R.C., Flock R.A. ve M.Mcd. Johnson. 1951. Insect transmission of Citrus quick decline. *Journal of Economic Entomology* 44: 172-176.
- Dickson R.C., Johnson M.M., Flock R.A. ve Laird Jr. E.F. 1956. Flying aphids populations in southern California citrus groves and their relation to the transmission of the tristeza virus. *Phytopathology* 46: 204-10.
- Dickson R., C. Flock R, 1959. Insect Vector of Tristeza Virus in "Citrus Virus Disease". Proc. 1st .Conf. IOCV.J.M Wallace eds: 97-100.
- Dodds ve Bar-Joseph. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. ,*Phytopathology*. 73, 419-423.
- Dodds, J.A., Tamaki, S.J. ve Roistacher, C.N.1983. Indexing of *Citrus tristeza virus* double stranded RNA in field trees. In Proc. 9th Conf. IOCV, p. 327329. Riverside, IOCV.
- Dodds, J.A., 1987. Effect of strain, host, time of harvest and virus concentration on doublestranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathol.*, 77(3): 442-447.
- Dolar S.M., 1976. Adana, Antalya, Hatay ve İçel İleri Turuncgil Alanlarında *Turuncgil Gocuren Hastalığı* (Tristeza) ‘nın Konukcuları,Yayılısı, Simptomlari, Zarar Derecesi, Geciş Yolları ve Koruma Careleri Uzerine Arasirmalar. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Arastırma Eserleri Serisi No:40, Kemal Matbaası, Adana, 43 p.
- Ducharme, E. P., L. C. Knorr ve H. A. Speroni. 1951. Observations on the spread of tristeza in Argentina. *Florida Citrus Magazine* 13 (9): 10-14.
- Eppo/Cabi, 1996a. *Toxoptera Citricidus*. In: Quarantine Pests For Europe. 2nd Edition (Ed. By Smith, I.M.; Mcnamara, D.G.; Scott, P.R.; Holderness, M.). Cab International, Wallingford, Uk.

- Eppo/Cabi, 1996b. *Spiroplasma Citri*. In: Quarantine Pests For Europe. 2nd Edition (Ed. By Smith, I.M.; Mcnamara, D.G.; Scott, P.R.; Holderness, M.). Cab International, Wallingford, Uk.
- Fao, 2013. [Http://Faostat.Fao.Org/Site/567/Desktopdefault.Asp?Pageid=567#Ancor](http://Faostat.Fao.Org/Site/567/Desktopdefault.Asp?Pageid=567#Ancor). Erişim tarihi 06-05-2018.
- Fao, Stat., 2017. [Http://www.Fao.Org/3/A-İ8092e.Pdf](http://www.Fao.Org/3/A-İ8092e.Pdf). Erişim tarihi 06-21-2018.
- Fao, 2018.w[Http://www.Fao.Org/Docrep/U5000e/U5000e0q.Htm](http://www.Fao.Org/Docrep/U5000e/U5000e0q.Htm). Erişim tarihi 06-05-2018.
- Fawcett H.S. ve Klotz L.J., 1938. Types And Symptoms Of Psorosis And Psorosis-Like Diseases Of Citrus. *Phytopathology* 28, 670.
- Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R. ve Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.
- Febres, V.J., Niblett, C.L., Lee, R.F. ve Moore, G.A. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with *Citrus tristeza closterovirus* genes. *Plant Cell Reports* 21:421-428.
- Fisher L., P. Tennant ve W.A. McLaughlin. 2013. Diversity Of *Citrus Tristeza Virus* In Jamaica. *Journal of Plant Pathology* (2013), 95 (1), 201-206
- Garnsey S.M., D. Gonsalves ve D.E. Purcifull., 1977. Mechanical Transmition Of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* 67:959 968.
- Garnsey S.M., D. Gonsalves ve D.E. Purcifull., 1979. Rapid Diagnosis Of *Citrus Tristeza Virus* İnfections By Sodium Dodecyl Sulphateimmunodiffusion Procedures. *Phytopathology* 69:88-95.
- Garnse, S.M., R.G. Christie, K.S. Derrick ve M. Bar-Joseph., 1980. Detection Of *Citrus Tristeza Virus*. I. Light And Electron Microscopy Of İnclusion And Viral Particles. In: Proc. 8th Conf. Iocv. Riverside, Ca. P.9-16.
- Garnsey S.M., M. Bar-Joseph, ve R.F. Lee., 1981. Applications Of Serological İndexing To Develop Control Strategies For *Citrus Tristeza Virus*. Proc. Int. Soc. Citriculture 1. P. 448-452.

- Garnsey S.M., 1987. Towards a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*,19: 151 - 157.
- Garnsey S.M. ve Lee R.F., 1988. Tristeza. 48-50. In: Compendium Of Citrus Diseases. J.O. Whiteside, S.M. Garnsey, L.W. Timmer (Eds). Aps Press. 80 Pp.
- Garnsey S.M., T. Kano, T.A. Permar, M. Cambra, M. Koizumi, And C. Vela. 1989. Epitope Diversity Among *Citrus Tristeza Virus* Isolates. *Phytopathology* 79: 1174 (Abst.).
- Garnsey S.M. ve M. Cambra., 1991. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For Citrus Pathogens, P.193-216. In: C.N. Roistacher (Ed). Graft Transmissible Diseases Of Citrus - Handbook For Detection And Diagnosis. Fao, Rome. 286 Pp.
- Garnsey, S.M., E.L. Civerolo, D.J. Gumpf, R.K. Yokomi ve R.F. Lee., 1991. Development A Worldwide Collection Of *Citrus Tristeza Virus* isolates. In: Proc. 11th Conf. Iocv. Riverside, Ca. P.113-120.
- Garnsey S.M., Permar T.A., Cambra M. ve Henderson C.T., 1993. Direct Tissue Blot Immunoassay (Dtbia) For Detection Of *Citrus Tristeza Virus* (Ctv). Th Proceedings Of The 12 Conf. Of Iocv (India 1998): 39-50.
- Garnsey S. M., Hilf M. E., Karasev A. V., Pappu H. R., Gumpf D. J. ve Niblett, C. L., 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208, 576-582.
- Garnsey S. M., Gottwald T. R. ve Yokomi R. K. 1998. Control strategies for *Citrus tristeza virus*. In: Plants virus disease Control (Hadidi, A., Khetrapal, R. and Koganezawa, K., eds.). APS Press, St. Paul, USA. pp: 639-658.
- Garnsey S. M., Civerolo, E. L., Gumpf, D. J., Paul, C., Lee, R. F., ve Brlansky, R. H., 2005. Biological Characterization Of An International Collection Of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) Isolates. *Int. Organ. Citrus Virol.* 16, 75–93.
- Gonsalves D., Purcifull D. E. ve Garnsey, S. M. 1978. Purification and serology of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 68: 553-559.

- Gottwald T. R., Cambra M., Moreno P., Camarasa, E. ve Piquer, J. 1996a. Spatial and temporal analyses of *Citrus tristeza virus* in Eastern Spain. *Phytopathology* 86: 45-55.
- Gottwald T. R., Garnsey S. M., Cambra M., Moreno P., Irey, M. ve Borbón J. 1996b. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of Citrus tristeza. In: Proc. Of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (da Graça, J.V., Moreno, P. and Yokomi, R.K., eds), IOCV, Riverside, CA. pp: 120-129.
- Gottwald T. R., Garnsey S. M., ve Borbón, J., 1998. Increase And Patterns Of Spread Of *Citrus Tristeza Virus* Infections In Costa Rica And The Dominican Republic In The Presence Of The Brown Citrus Aphid, *Toxoptera Citricida*. *Phytopathology* 88:621-636.
- Gowda S., Ayllon M. A., Satyanayanana T., Bar-Joseph M. ve Dawson W. O. 2003. Transcription strategy in a *Closterovirus*: a novel 5'-proximal controler element of *Citrus tristeza virus* produces 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3'open reading frame controler elements. *J. Virol.* 77:340-352.
- Göksu B., Kamberoğlu M. A., Yeşiloğlu T. ve Y. Aka Kaçar. 2017. Bazı Turunçgil Melezlerinde *Turuçgil Tristeza Virüsü (Citrus Tristeza Virus, CTV)*'ne Dayanıklılığın RAPD Markörleri ile Belirlenmesi. *Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Dergisi* 1308-6561, 1 (1): 32-37, 2017.
- Guerra J., P. Moreno ve R.F. Lee. 1990. Identification of *Citrus tristeza virus* strains by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology* 80(8), 692–698.
- Guerra J, Moreno P, Muñoz N, Martinez M.E. 1991. Variability among spanish *Citrus tristeza virus* isolates revealed by double-stranded-RNA análisis. *Plant Pathol* 40:38-44.

- Güllü M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakalı ve satsuma mandarin ağaçlarında Yaygın virüs ve virüs benzeri hatalıklar survey ve indekselemesi üzerinde çalışmalar. Doktora tezi 70. Araştırma yayınları serisi, Ankara.
- Harper S. J. , T. E. Dawson ve P. A. Mooney. 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Australasian Plant Pathology, 2008, Volume 37, Number 4, Page 379
- Harper S. J., Dawson T.E. ve Pearson M.N., 2010, Isolates Of *Citrus Tristeza Virus* That Overcome *Poncirus Trifoliata* Resistance Comprise A Novel Strain. Arch Virol 155:471–480.
- Harper S.J., 2013. *Citrus Tristeza Virus*: Evolution Of Complex And Varied Genotypic Groups. Frontiers in Microbiology; 23.04.2013 Pub.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F. ve Pina J.A.,1984. Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, *Aphididae*) in Spain. En: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 23-27.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F. ve Pina J.A.,1988a. Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus isolate* and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. En: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 68-70.

- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F., Pina J.A., Serra J.A. ve Fuertes C., 1988b. Difference in transmission efficiency of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin or lemon trees as donor or receptor host plant. En: Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 62-64.
- Hilf M.E ve Garnsey S. M., 2000. Characterization And Classification Of *Citrus Tristeza Virus* Isolates By Amplification Of Multiple Molecular Markers. In: Da Graça J. V., Lee R. F., Yokomi R. (Ed.). Proceedings Of The 14th Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists, Brazil, 1998, Pp 18–27.
- Hughes, G., ve Gottwald, T. R., 1998. Survey strategies for *Citrus tristeza virus* disease assessment. *Phytopathology* 88:715-723.
- Ilharco F.A., Sousa-Silva C.R. ve Alvarez-Alvarez A., 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agron Lusit* 51: 121.
- İnce E., 1999. Detection of CTV with dsRNA analysis in the east Mediterranean region; Studies on detection of Strains, effect of different hosts on dsRNA pattern and detection of appropriate time in natural Condition, University of Cukurova, PhD Thesis, Adana. Turkey.
- Kamberoğlu, A.M. ve Baloğlu S. 1998. *Citrus Tatter Leaf Virus* (CTLV) of Meyer lemon in E Eastern Meditarrean Region. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi* 1998:12.(2):1-6
- Kamberoğlu, A.M., 2000. *Turunçgil Tristeza Virüs* (CTV) Irklarına Spesifik Monoklonal Antibodylerin Üretilmesi Ve Ctv Irklarının Tanılanmasında Kullanılması. Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 93 S.

- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowsky, D.J. ve Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of Closterovirus. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.
- Killiny N. Ve Valim M.F., 2017. Occurrence of free fatty acids in the phloem sap of different Citrus varieties. *Plant Signal Behav.* Jun 3;12(6):e1327497.
- Klotz L.J. ve Fawcett H.S., 1941. *Color Handbook Of Citrus Diseases*. Berkeley, Ca, Usa: University Of California Press.
- Korkmaz, S., 2002. *Turunçgil Tristeza virüsünün* dört farklı ırkının biyolojik özelliklerinin ve dsRNA yapılarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. IX. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Tekirdağ, s. 135-144
- Korkmaz Savaş, Bayram Cevik, Serkan Onder ve N. Kemal, 2008. Biological, Serological, And Molecular Characterization Of *Citrus Tristeza Virus* Isolates From Different Citrus Cultivation Regions Of Turkey, *Turk J Agric For* 32 (2008) 369-379.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., ve Tamura K. 2018. MEGA10: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lee, R.F. ve M. Bar-Joseph, 2000. *Tristeza*. Pp 61-63. En: *Compendium Of Citrus Diseases*. 2nd Edition. Timmer, L.W., S.M. Garnsey, And J.H. Graham (Editors). St Paul (Mn): American Phytopathological Association.
- Lee, R.F., M. G. H. Dekkers ve M. Bar-Joseph, 2005. Development Of Stable, Uniform Antigen Controls For Use in ELISA Assays For *Citrus Tristeza Virus*. Pp 127-136 En: *Proc. 16th Conf. Iocv*. Iocv, Riverside.
- Loebenstein G. ve B. Raccah 1980. Control of non-persistently transmitted aphid-borne viruses *Phytoparasitica* 8(3): 221-235.

- Loeza Kuk. E.; Palacios, T. E. C.; Ochoa, M. D. L.; Mora, A. G.; Gutierrez, E. M. A.; Febres, V. J.; Moore, G. A. ve Alvarez, R. R. 2008. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. In: Hilf, M. E.; Duran, A. N. and Rocha, P. M. (eds). Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. California, USA. 407-411p.
- López, C., Ayllón, M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., Flores, R. 1998. Molecular variability of the 5'- and 3'-terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology* 88: 685-691.
- Marroquín C., Olmos A., Teresa Gorrís M., Bertolini E., Carmen Martínez M., Carbonell E.A., Hermoso de Mendoza A. ve Cambra M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Res.* 2004 Mar;100(1):101-8.
- Martelli G.P, Yılmaz M.A, Savino V., Baloglou S., Grieco F., Güldür M.A, Boscia, D., Greco N. Ve Laforzezza R., 1996. Properties of a citrus isolate of olive latent virus a seemingly new necrovirus. *Eur J Plant Pathol* 102:527-536.
- Martelli G.P, Agranovsky A.A, Bar-Joseph M., Boscia D, Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V, Duffus J.E, Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Murrant A., Namba S., Niblett C.L., Vetter H.J ve Yoshikawa N., 2000. Family *Closteroviridae*. En: *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Eds). San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 943-952.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*, 3th Edn.. Academic Press, New York, 835 pp.
- Mawassi M., Gafny R., Gagliardi D. Ve Bar-Joseph M., 1995a. Populations of *Citrus tristeza virus* contain smaller-than-full-length particles which encapsidate subgenomic RNA molecules. *J Gen Virol* 76: 651-659.

- Mawassi M., Karasev A.V., Mietkiewska E., Gafny R, Lee RF, Dawson W.O. ve Bar- Joseph M., 1995b. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology* 208: 383-387.
- Mawassi M., Mietkiewska E., Gofman R., Yang G., Bar-Joseph M. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.* 77 2359–2364.
- Manjunath K. L., Niblett C.L., Genc H., Cevik B., Halbert S., Brown L., Nolasco G., Bonacalz B., Febres V. J., Pappu H. R. Ve R. F. Lee., 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of Citrus Tristeza Disease. *Virus Research*. Volume 71, Issues 1–2, 2000, Pages 97-106.
- Manjunath L., Roy A., K., Brlansky R. H., 2005. Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of *Citrus tristeza virus* from India. *Virus Res.* 113 132–14.
- Melzer M. J., W. B. Borth, Sether D. M., Ferreira S., Gonsalves D. ve J. S. Hu. 2010. Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes*, 40 (2010), pp. 111-118.
- Moreira S., 1942. Observações sobre a “tristeza” dos citrus, ou “Podridão das radículas.” *Biologico* 8: 269-272.
- Moreira S., 1965. *Virüs diseases of citrus* (Report to the Government of Turkey). Report of F.A.O., Rome.
- Moreno P, Guerri J, Muñoz N., 1990. Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology* 80: 477-482.
- Moreno P.S., Ambros, M.R. Albiach-Martí, J. Guerri And L. Pena, 2008. *Citrus Tristeza Virus: A Pathogen That Changed The Course Of The Citrus Industry*. *Molecular Plant Pathology* 9: 251-268.

- Moreno P.S And S.M. Garnsey, 2010. Citrus Tristeza Disease -A Worldwide Perspective. Pp.27-49 En: Karasev, A.V. Y Hilf, M.E. (Eds.). *Citrus Tristeza Virus Complex And Tristeza Diseases*. American Phytopathological Society Press.
- Müller G. W. , A. S. Costa, E. W. Kitajima, and I. J. B. Camargo.1947. Additional Evidence that Tristeza Virus Multiplies in Passiflora spp. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings(1957-2010), 6(6).
- Murray, M.G. And W.F. Thompson, 1980. Rapid Isolation Of High Molecular Weight Plant Dna. *Nucleic Acids Res.* 8(19), 4321-4326.
- Narváez, G., Ben Slimane, S., Ayllón, M.A, Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza isolates by hybridization with digoxigenin-labeled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.
- NCBI, 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>. Erişim tarihi 11-10-2018
- Nikolaeva O.V., A.V. Karasev, S.M. Garnsey And R.F. Lee, 1998. Serological Differentiation Of The *Citrus Tristeza Virus* Isolates Causing Stem Pitting In Sweet Orange. *Plant Dis.* 82:1276-1280.
- Nolasco, G., de Blas, C., Torres, V. ve Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *J.Virol. Methods.* 45: 201218.
- Norman, P.A., Grant, T.J. 1953. Preliminary studies of aphid transmission of tristeza virus by aphids in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 66: 89-92.
- Norman, P.A., Grant, T.J. 1956. Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids in Florida. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 69: 38-42.
- Norman, P.A., 1963. Report To The Government Of Turkey On *Citrus Virus* Diseases. *Fao Report No: 1641.* 16pp.

- Olmos A., Bertolini, E. and Cambra, M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods.* 106: 51-59.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T. ve Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Res.* 27: 1564-1565.
- Önder S. ve S. Korkmaz. 2008. Edremit Körfez Bölgesi'ndeki Satsuma Owari Mandarinlerinde Yaygın Olan Virüs ve Viroid Hastalıklarının Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi.* 2008:5(2)pp205-214.
- Önelge, N. 2003. First report of Yellow vein clearing of lemons in Turkey. *J. Turk. Phytopathol.* 32: 53-55.
- Özalp Ve O., Azeri, 1967. Ege Bölgesinde *Turunçgil Virüs Hastalıkları* Surveyi, *Bitki Koruma Bülteni*, 7(4) 167-187.
- Pappu, H.R., Pappu, S.S., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3641-3644.
- Pappu H. R., Karasev A. V., Anderson E. J., Pappu S. S., Hilf M. E. ve Febres V. J., 1994. Nucleotide sequence and organization of eight open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199 35-46.
- Pathak K.B. ve Nagy P.D., 2009. Defective Interfering RNAs: Foes of Viruses and Friends of Virologists. *Viruses.* 2009 1(3):895-919.
- Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J. and Lee, R. F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 80:224-228.
- Permar, T. A., ve S. M. Garnsey 1991. Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of *Citrus tristeza virus*. p. 56-59. In: Proc. 11th Conf. IOCV. IOCV, Riverside.

- Raccah, B., Loebenstein, G., Bar-Joseph, M. 1976. Transmission of *Citrus tristeza virus* by the melon aphid. *Phytopathology* 66: 1102-1104.
- 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.
- Rocha-Peña, M.A., 1995. Citrus Tristeza Virus And Its Aphid Vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79:437-445. Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible Diseases Of Citrus: Handbook For Detection And Diagnosis. Rome: Food And Agricultural Organization Of The United Nations.
- Rocha-Pena, M. A., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa-Corona, F. M., Garnsey, S. M. and Yokomi, R. K. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* 79: 437-445.
- Roistacher, C. N. and M. Bar-Joseph. 1987. Aphid transmission of *Citrus tristeza virus*: A review. *Phytophylactica* 19: 163-167
- Roistacher C. N., 1991. Graft-Transmissible Diseases Of Citrus. In: Handbook For Detection And Diagnosis. Fao, Rome.
- 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., 1995. A Historical Review of the Major Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Cairo: Regional Office for the Near East.

- Roistacher, C. N., Dodds, J. A., ve Bash, J. A. 1988. "Cross protection against citrus tristeza seedling yellows and stem pitting viruses by protective isolates developed in greenhouse plants," in Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, eds L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro (Riverside, CA: IOCV), 91–100.
- Rosner A. ve Bar-Joseph M. 1984. Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* 139: 189-193.
- Rosner, A., Lee, R.F. ve Bar-Joseph, M., 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathol.*, 76(8): 820-824.
- Roy, A., Choudhary, N., Hartung, J. S., And Brlansky, R. H. 2013. The Prevalence Of The Citrus Tristeza Virus Trifoliolate Resistance Breaking Genotype Among Puerto Rican Isolates. *Plant Dis.* 97:1227-1234.
- Rubio, L., M.A. Ayllón, J. Guerri, H. Pappu, C.L. Niblett And P. Moreno, 1996. Differentiation Of *Citrus Tristeza Closterovirus* (Ctv) Isolates By Single-Strand Pd 01 *Virus Tristeza De Los Cítricos* (*Citrus Tristeza Virus* - CTV) 21 Conformation Polymorphism Analysis Of The Coat Protein Gene. *Ann. Appl. Biol.* 129: 479- 489.
- Rubio L., Guerri J. ve Moreno P., 2000. Characterization Of *Citrus Tristeza Virus* Isolates By Single Strand Conformation Polymorphism Analysis Of DNA Complementary To Their RNA Population. In: Da Grac, A Jv, Lee Rf, Yokomi Rk, Eds. Proceedings Of The 14th Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists. Riverside, Ca, Usa: Iocv, 12–7.

- Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., Falk, B.W. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology* 75: 8054-8062.
- Ruiz-Ruiz S. Moreno P, Guerri J. Ve Ambrós S., 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Arch Virol* 151: 387-398.
- Ruiz Garcia. N.; Mora, A. G.; Rivas, V. P.; Góngora, C. C.; Loeza, K. E.; Ochoa, M. D.; Ramírez, V. G.; Gutiérrez, E. A. y Álvarez, R. R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico del Virus tristeza de cítricos en Tamaulipas, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 15(1):41-47.
- Ruiz-Ruiz, S., P. Moreno, J. Guerri ve Y. S. Ambrós, 2009. Discrimination Between Mild And Severe *Citrus Tristeza Virus* Isolates With A Rapid And Highly Specific Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method Using Taqman LNA Probes. *Phytopathology* 99:307-315.
- Saitou N. ve Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sagarpa. 2009 Ficha Técnica No. 37 Pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria LANREF – CP.
- Saponari M., Manjunath K., ve Yokomi R.K., 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan (R)). *J Virol Methods* 147: 43-53.

- Satar S., 1997. Transmission of different citrus tristeza virus isolates by *Aphis gossypii* in laboratory conditions. M.Sc. Thesis, University of Cukurova. Adana, Turkey.
- Satyanarayana T., S. Gowda, V.P. Boyko, M.R. Albiach-Marti, M. Mawassi, J. Navas-Castillo, A.V. Karasev, V. Dolja, M.E. Hilf, D.J. Lewandowski, P. Moreno, M. Bar-Joseph, S.M. Garnsey ve W.O. Dawson. 1999. An engineered *closterovirus* RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 (1999), pp. 7433-7438.
- Satyanarayana T., Gowda S., Mawassi M., Albiach-Marti M. R., Ayllon M. A., Robertson C. J., 2000. *Closterovirus* encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 1278 253–265.
- Satyanarayana T., Bar-Joseph M., Mawassi M., Albiach-Marti M.R, Ayllón M.A, Gowda S., Hilf M.E, Moreno P., Garnsey S.M. ve Dawson W.O., 2001. Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* 280: 87-96.
- Satyanarayana T., Gowda S, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Dawson W.O., 2002a. Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 300: 140-152.
- Satyanarayana T., Gowda S, Ayllón MA, Albiach-Martí MR, Rabindram R, Dawson W.O., 2002b. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol* 76: 473-483.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O. 2004. *Closterovirus* bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A. 101: 799-804.

- Satyanarayana, T., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. 2005. Generation of a genetically engineered MCA13 non reactive variante of the T36 decline isolate of *Citrus tristeza virus*. In: M.E. Hilf, N. Duran-Vila, M.A. Rocha-Peña (eds.) Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 34-43.
- Sertkaya G. 2001. Doğu akdeniz Bölgesinde Turuncgil Tristeza (Göçüren) Closterovirus (CTV) hastalığının durumu. Türkiye IX Fitoğatoloji Kongresi Trakya Üniversitesi Yayınlar N: 545 Tekirdağ 525-535.
- Schneider H. 1954. Anatomy of bark of bud union, trunk and roots of quick decline affected sweet orange trees on sour orange rootstocks. *Hilgardia* 22: 567-581.
- Schneider H., 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), Berkeley, CA: University of California, Division of Agriculture Sciences. pp: 73-84.
- Suastika G., Natsuaki T, Terui H., Kano T., Ieki H., Okuda S. 2001. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. *J Gen Plant Pathol* 67: 73- 77.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Timmer L.W., And Garnsey S.M., 1980. Natural Spread Of *Citrus Ringspot Virus* In Texas And Its Association With Psorosis-Like Diseases In Florida And Texas. In: Calavan Ec, Garnsey Sm, Timmer Lw, Eds. *Proceedings Of The 8th Conference Of The International Organization Of Citrus Virologists*. Riverside, Ca, Usa: Iocv, 167–93.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M. And Graham, J.H., 2002. *Compendium Of Citrus Diseases*, Second Edition. American Phytopathological Society.
- Tooley, P.W., Hewings, A.D., And Falkenstein, K.F., 1989. Detection Of Double-Stranded Rna In *Phytophthora Infestans*. *Phytopathology*, 79:470-474.

- Turgut O. ve Baloğlu S. 2009. Türkiye’de *Turunđgil Tristeza Virus* Hastalığının Mevcut Durumunun Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yıl:2009 Cilt:22-228.
- Turunđgil tanıtım gurubu, 2016. [Http://www.Freshplaza.Com/Article/166838/Turkish-Citrus-Fruit-To-Expand-Sales-In-Uae](http://www.Freshplaza.Com/Article/166838/Turkish-Citrus-Fruit-To-Expand-Sales-In-Uae). Erişim tarihi 13-08-2016.
- Tuzcu Ö, Kaplankıran M., Seker M., 1998. Bazı Turunđgil Anaçlarının Çukurova Kosullarında Önemli Portakal, Altıntop, Limon ve Mandarin Çesitlerinde Meyve Verimi Üzerine Etkileri/ Turkish. J. of Agriculture and Forestry. 23: 213-222.
- Türktob, 2017. [Https://Www.Turktob.Org.Tr/Dergi/Makaleler/Dergi22/6-11.Pdf](https://Www.Turktob.Org.Tr/Dergi/Makaleler/Dergi22/6-11.Pdf). Erişim tarihi 05-12-2017
- Tük Stat, 2017. [Http://Www.Tuik.Gov.Tr/Pretablo.Do?Alt İd=1001](http://Www.Tuik.Gov.Tr/Pretablo.Do?Alt İd=1001). Erişim tarihi 05-09-2017.
- Usda–Fas, 2017. [Https://Www.Fas.Usda.Gov/Data/Turkey-Citrus-Annual-2](https://Www.Fas.Usda.Gov/Data/Turkey-Citrus-Annual-2). Erişim tarihi 02-11- 2017.
- Usda–Fas, 2017. Turkey Citrus Annual Report: [Https://Gain.Fas.Usda.Gov/Recent%20gan%20publications/Citrus%20annual Ankara Turkey 12-15-2017.Pdf](https://Gain.Fas.Usda.Gov/Recent%20gan%20publications/Citrus%20annual%20Ankara%20Turkey%2012-15-2017.Pdf). Erişim tarihi 20-09- 2017.
- Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, J.G., Perez de San Roman, C. and Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use in diagnosis. J. Gen.Virol. 67: 91-96.
- Vives, M.C., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R, Dawson, W.O., Guerni, J., Flores, R., Moreno, P. 1999. The complete genome of the major component of mild *Citrus tristeza virus* isolate. Journal of General Virology 80: 811-816.

- Vives M.C., Rubio L., Sambade A., Mirkov TE., Moreno P. ve Guerri J., 2005. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* 331: 232-237.
- Wallace, J.M. ve Drake, R.J. 1951. Newly discovered symptoms of quick decline and related diseases. *Citrus leaves* 31: 8-9, 30.
- Wallace, J.M., Oberholzer, P.C.J. ve Hofmeyer, J.D.J. 1956. Distribution of viruses of tristeza and other diseases of citrus in propagative material. *Plant Disease Reporter* 40: 3-9.
- Wallace, J.M., 1978. Virus and virus-like diseases. In *The citrus industry*, Vol.4, p.167- 184. Univ. Calif. Div. Agric. Sciences.
- Wang J. Bozan O., Kwon S., Dang T., Rucker T., R. Yokomi, R. Lee, S. Y. Folimonova, Krueger R., J. Bash, Greer G., James Diaz J., Serna R. And Vidalakis G. 2013. Past And Future Of A Century Old *Citrus Tristeza Virus* Collection: A California Citrus Germplasm Tale. Krueger Robert, Bash John, Greer Greg, Vidalakis Georgio. *Frontiers In Microbiology*; Vol4:2013:Pg;366 .
- Yang Z.N, Mathews D.M., Dodds J.A., Mirkov T.E., 1991. Molecular Characterization Of An İsolate Of *Citrus Tristeza Virus* That Causes Severe Symptoms İn Sweet Orange. *Virus Genes*. 1999;19(2):131-42.
- Yang G., Mawassi M., Gofman R., Gafny R. Ve Bar-Joseph M, 1997. Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *Citrus tristeza virus* molecules. *J Virol* 71: 9800-9802.
- Yang, G., Che, X., Gofman, R., Ben Shalom, Y., Piestun, D., Gafny, R., Mawassi, M. and Bar-Joseph, M. 1999. D-RNA molecules associated with subisolates of the VT strain of Citrus tristeza virus which induce different seedling yellows reactions. *Virus Genes* 19: 5-13.
- Yılmaz, M.A., Baloğlu, S., Uygun, N., Ve Çınar, A., 1990. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgillerde Zararlı *Tristeza Virus Hastalığının* Yaprak Bitleri İle Taşınması. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi*, 5(3); 81-94.

- Yokomi, I.T. K. And S. M. Garnsey, 1987. Transmission Of *Citrus Tristeza Virus* By *Aphis Gossypii* And *Aphis Citricola* In Florida. *Phytophylactica* 19:169-172.
- Yokomi R., Vijayanandraj S., Maheshwari Y., M. Chiumenti, M. Saponari Giampetruzzi A., Z. Weng, Z. Xiong, S. Hajeri, 2018. Molecular And Biological Characterization Of A Novel Mild Strain Of *Citrus Tristeza Virus* In California *Archives Of Virology* (2018) 163:1795–1804.
- Yoshida, T. 1996. Graft compatibility of Citrus with plants in the Aurantoidea and their susceptibility to Citrus tristeza virus. *Plant Dis.* 80: 414-417.
- Yumruktepe R., 1993. Doğu Akdeniz Bölgesi Turunçgil Bahçelerinde Zararlı Yaprak Biti (Hom., Aphididae) Türleri, Tanınmaları, Yayılışları, Doğal Düşmanları, Populasyon Dalgalanmaları Ve Kimyasal Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, (Doktora Tezi) Adana.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Kolombiyanın Kuzeyinde Fonseca' şehrinde doğdum. İlk, ortaokul ve liseyi Fonseca'da tamamladıktan sonra 2009 yılında Palmira şehrinde National University of Colombia ziraat fakültesinde lisans eğitim başladım. Sonra 2013 yılında The International Center for Tropical Agriculture (CIAT) Cassava için biyoteknoloji bölümünde bir yıl boyunca çalıştım. 2014 yılında ziraatçı olarak mezun oldum ve aynı yıl sonunda Çukurova Üniversitesinde Bitki koruma bölümünde turunçgil virüsleri ile ilgili yüksek lisans programında başladım ve devam etmekteyim.