



Araştırma Makalesi

**Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması**

Gülbahar ARIKAN<sup>1</sup>, Büşra FİDANCI AVCI<sup>1</sup>, Orhan BOZAN<sup>1\*</sup>, Nüket ÖNELGE<sup>1</sup>

**ÖZ**

Dünyada süs bitkilerinde virüs ve viroid etmenlerinin neden olduğu birçok hastalık bulunmaktadır. Günümüze kadar dünyada krizantemlere spesifik önemli ekonomik kayıplara neden olan 2 adet viroid cinsi tespit edilmiştir. Bunlar *Avsunviroidae* familyasından olan *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)'i ve *Pospiviroidae* familyasından *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) dir. Bu çalışmada Akdeniz Bölgesinde Adana, Mersin ve Antalya illerinden toplanan 56 krizantem örneği RT-PCR yöntemi ile taranarak 2 farklı viroidin bulaşıklığı açısından araştırılmıştır. Çalışma sonucunda krizantem bitkilerinde CSVd varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada karantina etmeni olan CChMVd 'i toplanan hiçbir izolatta tespit edilememiştir. CSVd etmeni mekanik olarak etrog citron ve krizantem bitkilerine aktarılmış, bu bitkiler üzerinde genel bir bodurluk yaprak küçüklüğü ve beneklenmesi belirtilerini geliştirmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Krizantem, CSVd, CChMVd, Viroid

**Investigation of Viroids in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Plants in Ornamental Plant Cultivation Areas of Mediterranean Region**

**ABSTRACT**

There are many diseases caused by viruses and viroid factors in ornamental plants in the world. To date, 2 viroid species have been identified in the world that cause significant economic losses specific to chrysanthemums. These are *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) from the family *Avsunviroidae* and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from the family *Pospiviroidae*. In this study, 56 collected from Adana, Mersin and Antalya in the Mediterranean Region. The chrysanthemum sample was scanned with the RT-PCR method and investigated in terms of contamination of 2 different viroids. As a result of the study, the presence of CSVd was determined in chrysanthemum plants. In the study, CChMVd, which is the quarantine agent, could not be detected in any of the collected isolates. CSVd agent was mechanically transferred to etrog citron and chrysanthemum plants. On these plants, signs of general stunting, small leaf size and mottling have developed.

**Keywords:** *Chrysanthemum morifolium*, CSVd, CChMVd, Viroid

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-3455-8099, 0000-0003-2403-956X, 0000-0002-3274-5459, 0000-0002-5018-0850

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 02.12.2021

Kabul Tarihi: 24.12.2021

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sarıçam/Adana

\*E-posta: gborhan@gmail.com

## Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması

### Giriş

Süs bitkileri yetiştiriciliği çevre, bahçe ve şehir düzenlemeleri bakımından oldukça önemli görsellik bakımından tercih edilen bir tarım ürünüdür. Süs bitkileri kullanım amaçlarına göre; kesme çiçek, iç mekan (saksılı) süs bitkileri, dış mekan (tasarım) süs bitkileri ve çiçek soğanları olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Titiz ve ark., 2000). Dünya genelinde 2015 yılı itibari ile 1.752.081 hektar alanda süs bitkileri yetiştirilmektedir (Kazaz ve ark., 2016). 2019 yılı süs bitkisi ekim alanları verilerine göre ülkemizde 52.477.362 m<sup>2</sup>'lik alanda üretim yapılmaktadır. Bunun %23.5'i kesme çiçek için kullanılırken %3.7 si iç mekân (saksılı) süs bitkileri için kullanılmaktadır (TUİK, 2020). Anavatani Japonya olan krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) bitkileri kesme ve saksılı süs bitkileri açısından oldukça önemli bir konuma sahiptir. Bunun yanı sıra krizantem türleri peyzaj sektöründe kullanıldığı kadar endüstri sektöründe de kullanılan tarımsal bir üründür.

Artan üretim miktarları ile birlikte hastalık etmenleri ve zararlıların neden olduğu ürün kayıpları da artmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden olan viroidler en küçük patojen olma özelliğindedir. "Viroid" terimi ilk olarak Theodor Diener tarafından patates iğ yumru hastalığına neden olan etmenin virüs olmadığı ve protein kılıfı içermediği vurgulanmak için kullanılmıştır (Diener, 1971). Günümüzde yeni gelişmiş moleküler tanılama yöntemleri ile birçok bitki türünde enfektiyöz ve latent olarak bulunan viroid türü belirlenmiştir. Bitkilerde rapor edilmiş 8 cins içinde yer alan yaklaşık 32 tür viroid etmeni vardır (ICTV, 2020). Krizantem bitkileri üzerinde doğrudan etkili olan *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ve *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)' süs bitkileri yetiştiriciliğinde bilinen en önemli etmenlerden iki tanesidir. Bu iki viroid dışında *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Hop stunt viroid* (HSVd) etmenleri de krizantem bitkilerinde karışım halinde veya tek olarak bulunmakta ve enfeksiyon oluşturabilmektedir.

Ayrıca süs bitkilerinde bazı viroid enfeksiyonlarının latent olarak kaldığı belirtilmektedir. Bununla birlikte latent enfeksiyonların dolaylı yoldan ticari bitki tür ve çeşitlerine etki edebileceği, bu çeşitlerin viroidle enfektelendiğinde ciddi ekonomik kayıplar oluşturabileceği diğer ana bitkiler için inokulum kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Verhoven ve ark., 2017).

2006 ve 2009 yılları arasında Türkiye de yapılan bir çalışmada patates, domates ve bazı süs bitkilerinde *Pospiviroid* familyasına ait viroid etmenleri tespit edilmiştir (Bostan ve ark. 2010). Çalışmada 154 krizantem bitkisinden 2'sinin CSVd ile bulaşık olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile araştırmacılar Türkiye'de CSVd'yi ilk kez rapor etmişler ancak sekans verilerini belirtmemişlerdir. Süs bitkileri yetiştiriciliği ve bunun içinde krizantem yetiştiriciliği son yıllarda gerek ülkemizde gerekse bölgemizde hızla artmaktadır. Ancak bu gruptaki bitkilerde bulunan viroid etmenleri üzerinde yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu çalışmada krizantem bitkilerinde bulunan krizantem viroidlerinin Akdeniz Bölgesi'ndeki yetiştiricilik alanlarındaki durumu belirlenmeye çalışılmış ayrıca bu bitki grubunda bulunan viroidlerin moleküler ve biyolojik açıdan tanılanmaları gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

### Materyal ve Yöntem

#### Sörvey çalışmaları

Çalışma Akdeniz Bölgesi'nin Adana, Mersin ve Antalya illerinde park ve bahçelerinde bulunan, süs bitkisi olarak üretilen ve satılan krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Krizantem bitkilerinden yapraklarda sararma, bitkilerde bodurluk, yapraklarda beneklenme, çiçek yapısında bozulma, petal yaprakta renk açılmaları, geç çiçeklenme gibi viroid kaynaklı hastalıkların karakteristik belirtilerini gösteren bitkilerden seçilmiştir. Ayrıca marketlerde satışta olan saksılı krizantem bitkileri, kesme çiçek olarak satılan bitkiler ve piyasada satışta olan ticari krizantem tohumları da materyal olarak kullanılmıştır.

## Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması

### Biyolojik indeksleme çalışmaları

CSVd etmeninin biyolojik indeksleme yöntemi ile tanısı sağlıklı doku kültüründen elde edilmiş krizantem bitkileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Steril ortamda doku kültüründe yetiştirilmiş olan krizantem fideleri viyollere 1:1:1 oranındaki toprak, torf ve ponza taşı karışımına aktararak çoğaltılmıştır. İndikatör bitkilerine mekanik olarak gövde çizme (Stem slash) yöntemi ile patojen bulaştırılması yapılmıştır. Toplanan krizantem örneklerinin yaprak, gövde ve çiçeklerinde CSVd, CCMVd etmenlerinin karakteristik olarak oluşturduğu bodurluk, yaprak küçülmesi, boğum aralarının kısalması, düzensiz çiçek gelişimi ve yapraklarda beneklenme simptomları gösteren bitkilerin TNA (Toplam nükleik asit)

ekstraksiyonları yapılmıştır. RT-PCR çalışmaları sonucunda agar jel üzerinde pozitif bant geliştiren bitkilerden 3 adet örnek çalışma sonrasında pozitif bulunan bitkiler biyolojik indeksleme çalışmasına alınmıştır.

Sağlıklı krizantem bitkilerine mekanik olarak taşıma çalışmaları 8 yapraklı hale gelen krizantem bitkilerinin alt kısımdaki 4 yaprak kopararak steril şırınga ucu ile gövdeye çizikler oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan bu çizikler üzerine TKM (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) çözeltisi ile ½ oranında sulandırılmış TNA çözeltisi damlatılarak yaralardan bitki dokusuna geçiş sağlanmıştır. Çizme işleminden sonra gövdenin nemini koruması için parafinle sarılmıştır.

**Çizelge 1:** RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Viroid-Primer	Sekans Dizilimi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge	
CSVd-1H5	5' TTCTTGTAAGCAGCAGGGT 3'	55.3	55-36	(Shiwaku et al., 1996)
CSVd-1R	5' AAAGAAATGAGGCGAAGAAGTC 3'	56.5	56-77	
CChMVd-2R	5' AAAGGACCGGAAGCTGGATCT 3'	57.3	217-236	(Hosokawa et al. 2005)
CChMVd-2F	5' ATCCATGACAGGATCGAAAC 3'	55.3	29-48	
CSVdF	5-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3	58	253	Hosokawa et al., 2004
CSVdR	5-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3	59		Hosokawa et al., 2004
CSVd-2F	5-CCAATCTTCTTTAGCACCGG-3	65	221	Hosokawa et al., 2004
CSVd-2R	5-AGTGGGGTCCTAAGCCCCAA-3	55		Hosokawa et al., 2004

### Moleküler çalışmalar

#### RT-PCR çalışmaları

Krizantem bitkilerinde bulunan viroidlerin tanımlanması için CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) tampon çözeltisi temelli TNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çalışmaları Murray ve Thompson (1980)'e göre modifiye edilerek uygulanmıştır. Elde edilen TNA'lardan

komplementer DNA (cDNA) sentezi ve PCR çoğaltması yapılmıştır. PCR çalışmaları farklı primer çiftleri kullanarak klasik PCR (Barthe ve ark., 1998) ve Nested-PCR (Hosokawa ve ark., 2004) olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri çizelge 1'de belirtilmektedir.

# Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması

## Elektroforez Çalışmaları

Elektroforez çalışmaları %2'lik agar jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi etidyum bromür çözeltisi ile yapılmış ve jeller üzerindeki bantlar UV transilluminatör kullanılarak görüntülenmiştir.

## Jel Üzerinden Viroid Saflaştırılması

Çoklu bant oluşturan örneklerden bir kısmı jel üzerinden kesilerek Roche Molecular Biochemicals-High Pure PCR Product Purification Kit'i kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem firmanın önerdiği basamaklara göre yapılmıştır.

## Sekans analizi ve verilerin karşılaştırılması

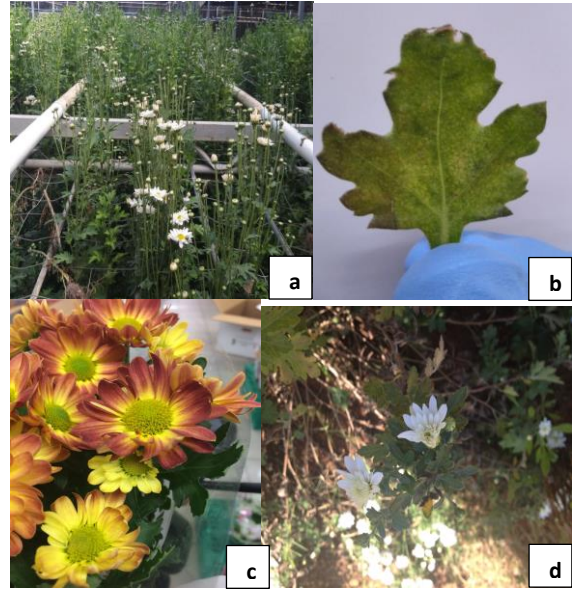
Jel görüntülemesi sonucunda viroid etmeninin varlığının saptandığı PCR ürünleri aynı koşullarda PCR uygulanarak 200µl hacminde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örneklerin saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Adana ilinde bulunan MOLGENTEK firmasına gönderilmiştir. Sekanslama işlemi tamamlanan tüm örneklerin baz dizilimleri "Finch TV" programı kullanılarak görüntülenip, mevcut baz dizilimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında "BLAST" yöntemiyle kayıtlı ilgili organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz çalışmalarında da DNA dizileri "MEGA X VERSION 10.0.2" (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak "Neighbour Joining" metodu ile sınıflandırılmıştır (Kumar ve ark., 2018).

## Bulgular ve Tartışma

### Krizantem bitkilerinde viroid belirtilerine ilişkin sera ve satış yeri gözlemleri

Toplanan örneklerde, bitkilerinde bodurluk (Şekil 1a), yapraklarında sararma ve beneklenme (Şekil 1b), geç çiçeklenme (Şekil 1c), çiçek yapısında bozulma (Şekil 1d) ve petal yaprakta renk açılması gibi viroid ve virüsler için karakteristik olabilecek belirtiler gözlemlenmiştir. Belirlenen bu belirtiler viroid ve virüslerin oluşturabileceği genel belirtiler olup CSVd için özellikle bodurluk belirtileri ve yaprak belirtileri baz alınarak örnekler toplanmış ve çalışma izolatları oluşturulmuştur. Arazi çalışmalarında krizantem

bitkilerinde gözlenen belirtiler literatürde hastalıkla ilgili belirtilen belirtilere benzerdir (Mehle ve ark., 2010, Chung ve ark., 2005). Krizantemlerde en fazla gözlenen belirtiler bodurluk belirtisi olmuştur. Bu belirtiler bölgedeki her üç ilde gözlenmiştir. İkinci en yaygın belirtiler ise yapraklarda kloroz (sararma) ve geç çiçek açımı belirtileridir. Petal yapraklarda renk açılması, yapraklarda beneklenme ve çiçek yapısındaki bozulmalar Adana ve Antalya illerinde daha yaygın gözlenen belirtiler olmuştur.



**Şekil 1.** a- Kesme krizantem yetiştiriciliği yapılan bir serada çiçeklerde geç açılma ve bitki lerde bodurluk görüntüsü (Tarsus) b- krizantem yapraklarında meydana gelen klorotik beneklenme belirtileri (Adana) c- saksılarda yetiştirilen krizantemlerdeki çiçek yapısındaki renk kırılmaları ve geç çiçeklenme (Adana) d- petal yaprak gelişimini tam tamamlamamış çiçeklerin belirtisi (Adana)

### Krizantem bitkilerinde tespit edilen viroidlerin biyolojik indeksleme çalışmalarına ait bulgular

Doku kültüründen elde edilmiş krizantem bitkilerinin indikatör bitki olarak kullanıldığı bu çalışmada belirtiler inokulasyon işlemlerinden yaklaşık 6 hafta sonra gözlenmeye başlamıştır. Sağlıklı krizantem bitkilerinde ilk belirtiler, bodurlaşma, boğum aralarında kısılma ve yaprak boyutlarında küçülmeler hafif

## Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması

klorozlar olarak gözlemlenmiştir (Çizelge 2). İlerleyen dönem içinde çiçek yapısında da farklılaşmalar gözlenmiş olup çiçeklerin küçük kaldığı ve tam açılma göstermediği belirlenmiştir.

**Çizelge 2:** İndikatör bitkilerde gözlemlenen belirtiler (B: Bodurlaşma, BAK: Boğum arası kısalma, KY: Küçülmüş yaprak, YHK: Yapraklarda hafif kloroz, KÇ: Küçük çiçek yapısı, YK: Yapraklarda kıvrıkcıklaşma)

İzolatlar	İndikatör bitki	Gözlemlenen belirtiler				
		KY	B\BAK	YHK	KÇ	YK
KriAd-27	Krizantem	+	+	+		-
KriTa-4	Krizantem		+			-
KriAd-38	Krizantem	+	+	+	-	-
Kontrol -	Krizantem	-	-	-	-	-
KriTa-4	Etrog citron	-	-	-	-	+
KriAd-27	Etrog citron	-	-	-	-	+
KriAd-38	Etrog citron	-	-	-	-	+
Kontrol +	Etrog citron	-	-	-	-	+
Kontrol -	Etrog citron	-	-	-	-	-

Niblett ve ark, (1980) yürütmüş oldukları çalışmada CSVd etmeninin inokulasyonunun gerçekleştirildiği bitkilerde bodurluk, yapraklarda klorotik lekeler oluştuğunu bildirmişlerdir. CEVd etmeninin inokulasyonunun yapılmış olduğu bitkilerde ise bodurluk, yapraklarda bükülme gibi belirtileri gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Biyolojik indeksleme çalışmasında elde edilen bulgular bu çalışmayla uyumludur ve sağlıklı krizantem bitkilerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca Duran-Vila ve ark. (1988) yapmış oldukları çalışmada etrog bitkilerinin bu iki etmene karşı hassasiyet gösterdiklerini ve krizantem bitkilerinde de CEVd'in bodurluk belirtisi geliştirdiğini, HSVd'nin ise çok hafif belirtiler oluşturduğunu bildirmişlerdir.

### Moleküler çalışmalar ile ilgili bulgular ve tartışma

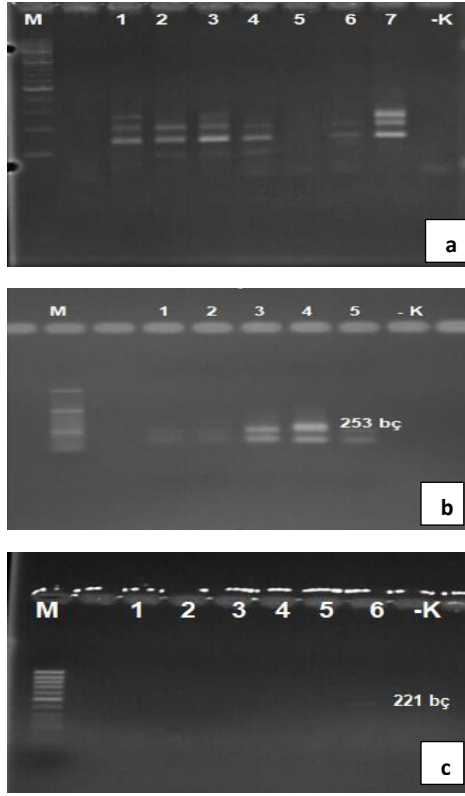
#### RT-PCR çalışmaları ile ilgili bulgular

Çalışmanın konusunu oluşturan CSVd'nin bölgemizdeki krizantem bitkilerinde varlığını ve yoğunluğunu araştırmak amacıyla yürütülen bu çalışmada toplam 56 adet izolat RT-PCR ile incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında CSVd-

IH5 ve CSVd-1R primer çifti kullanılmıştır. Yapılan analiz sonucunda jel üzerinde örneklerde 2'li ve 3'lü bantlar elde edilmiştir. İncelenen 56 adet örneğin 15 tanesinde çoklu bant elde edilmiştir. RT-PCR çalışmasında 9 adet örneğin tamamı 3'lü bant, 6 örnek ise 2'li bant oluşturmuştur (Şekil 2). Daha sonra Pospil1R ve Pospil2F evrensel primerleri kullanılmış ancak bu iki primer çifti kullanıldığında herhangi bir bant oluşumuna rastlanılmamıştır.

Bu aşamada Roche Moleculer Biochemicals-High Pure PCR Product Purification Kit'i kullanılarak çoklu bantlardan 2 tanesi (KriTa-4, KriAd-27) çoğaltılarak jel üzerinden kesim işlemi gerçekleştirilmiş ve bantlar birbirinden ayrılarak saflaştırılmıştır. CSVd'ni belirlemek için primer çiftleri CSVd1R-CSVd1F ve CSVd2R-CSVd2F kullanılarak nested-PCR çalışmasına gidilmiştir. Yapılan ilk aşama RT-PCR ürünlerinin jel üzerinde 253 bp seviyesinde CSVd'ye ait bantlar elde edilmiştir (Şekil 2b).

## Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması



**Şekil 2.** a-CSVd-1H5-1R primerlerinin kullanıldığı çoklu viroid bantlarının jel görüntüsü b- Nested-PCR çalışmalarının ilk aşamasında CSVd1F/CSVd1R primerlerinden alınan jel görüntüsü. c- Nested-PCR çalışmalarının ikinci aşamasında CSVd2F/CSVd2R primerleri kullanılarak pozitif olarak belirlenen KriAd-27 izolatının agar jelde 221 bç'i görüntüsü.

Nested-PCR'in 2. PCR aşamasında ise sadece bir örnekte 221 bç uzunluğundaki bant görülmüştür (Şekil 2c). Diğer örneklerde herhangi bir bant gözlemlenmemiştir. CSVd için toplam 2 adet izolattan pozitif sonuç alınmıştır. Bu sayı etmen açısından oldukça düşük bir rakam olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada incelenen krizantem bitkilerinin CSVd açısından oldukça düşük bir bulaşıklılık oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu ürün sekans çalışmasına gönderilmek amacıyla aynı koşullarda tekrar çoğaltılmıştır.

Dünya'da CSVd'nin yaygınlık durumuna baktığımızda etmen ilk kez virüs olarak ABD'de 1945 yılında bildirilmiştir (Dimock, 1947). Daha sonra Kanada 'da 1950 yılında bildirilerek buradan dünyanın her tarafına dağıldığı

belirtilmiştir (Lawson, 1987). Etmen tüm Avrupa ülkelerinde karantina etmeni olması nedeniyle bu ülkelerde yaygınlığı konusunda fazla bilgi olmamakla birlikte etmenin İtalya'da simptom göstermeyen krizantem bitkilerinde bulunduğu buna ek olarak *Argyranthemum frutescens* bitkilerinde de simptom oluşturduğu bildirilmiştir (Torchetti ve ark., 2012).

Etmen Hindistan'da %28.3 (Adkar-Prushhothama ve ark., 2017) ve Brezilya'da %58 (Gobatto ve ark., 2014) oranlarında oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Çinli araştırmacıların yapmış olduğu çalışmada ise etmenin yine Avrupa ülkelerinde olduğu gibi çok yaygın bulunmadığı CSVd'nin %2.9 oranında bulunduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2015).

Ülkemizde krizantem bitkilerinde CSVd etmenini ilk kez Bostan ve ark. (2004) bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada *Pospiviroidae* familyası üyelerinin korunmuş bölgelerinin tanımlanmasında kullanılan primer çifti kullanılmış ve 154 krizantem bitkisinin 2'sinde CSVd etmeninin agar jel üzerindeki 199 baz uzunluğundaki bant görüntüsünü tespit etmişlerdir (Bostan ve ark., 2010). Bu çalışmada da benzer şekilde CSVd'nin bulunma oranını oldukça düşük oranda bulunmuştur. Etmen ülkemizde yaygın olarak bulunmadığı bu çalışma ile de ortaya konmuştur. Ticari olarak satılan krizantem tohumlarının CSVd etmenini açısından testlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılan bu çalışmada 10 farklı markaya ait olan krizantem tohum örneklerinin TNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra random primer ile cDNA sentezleri yapılmıştır. RT-PCR çalışmalarında CSVd etmenini tanıyabilen CSVd-2H1 ve CSVd-1R primer çifti kullanılmıştır.

Ancak agar jelde yapılan yürütme sonucunda CSVd'ye ait herhangi bir bant oluşunu gözlenmemiştir. Bu nedenle tüm tohum örneklerinin bu etmen açısından negatif olduğu ve tohumların temiz olduğu düşünülmektedir.

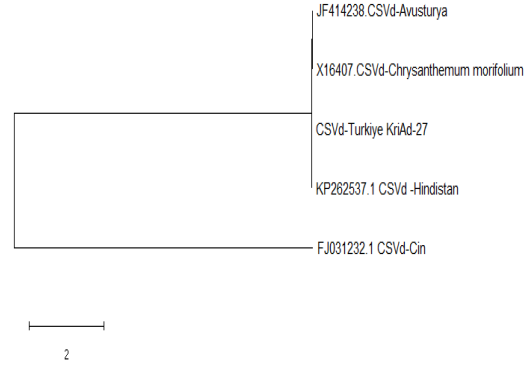
Krizantem bitkilerinde bulunan ve ülkemizde karantina etmeni olarak EPPO'nun A2 listesinde yer alan CChMVd etmenini araştırdığımız çalışmada CChMVd-2R ve CChMVd-2F

## Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması

primerleri kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarının sonucunda incelenen tüm izolatlarda agar jelde herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Çalışmada moleküler bazda herhangi bir bulguya rastlanılmaması bu etmenin toplanan örneklerde var olmadığını ortaya koymaktadır. Ancak simptomolojik açıdan benzer simptomların besin elementi noksanlığından veya krizantemde bulunabilecek diğer viral hastalıkların neden olabileceği düşünülmektedir. Nitekim krizantemde bulunan *Tomato spotted wild virus* etmeninin yapraklarda klorotik beneklenmelere neden olabilecek ortak simptomlar olduğu belirtilmektedir (Matteoni ve Allen, 1989).

Elde edilen baz dizimleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı kullanılarak bu bankada kayıtlı organizmalar ile karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz çalışmasında ise DNA dizileri Mega X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve "Neighbour Joining" metodu ile sınıflandırılmıştır. Genom dizileri belirlenen KriAd-27 izolatının nt uzunluğu 244 nt olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatın BLAST analizi sonucunda CSVd'i NCBI gen bankasında kayıtlı olan viroidlerle %96-%98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3).

NCBI gen bankası kayıtlarında yer alan Hindistan izolatı Adana ilinden toplanan krizantem izolatı ile %99.4 benzerlik gösterirken Avusturya izolatı ile %98, Çin izolatı ile ise %98 oranında benzerlik göstermiştir. Mega X programı kullanılarak Şekil 3'de oluşturulan filogenetik ağaçta bu çalışmada elde ettiğimiz Adana izolatının KriAd-27 Hindistan (KP262537) ve Avusturya (JF414238) izolatlarıyla benzer olduğunu Çin izolatının (FJ031232) ise bunlara yakın alt bir kümede yer aldığını ortaya konmuştur. (Şekil 3).



Şekil 3: Adana ilinden elde edilen KriAd-27 izolatının soy ağacı.

### Kaynaklar

- Adkar-Purushothama, C.R., Chennappa, G., Poornachandra Rao, K., Sreenivasa, M.Y., Maheshwar, P.K., Nagendra Prasad, M.N., Sano, T. 2017. Molecular diversity among viroids infecting chrysanthemum in India. *Virus Genes*, 53, 636–642.
- Barthe G.A., Ceccardi T.L., Manjunath K.L., Derrick K.S., 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *Journal of General Virology*, 79 (Pt 6), 1531–1537.
- Bostan, H.; Nie, X.; Singh, R.P., 2004. An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *J. Virol. Methods*, 116, 189–193.
- Bostan, H., Gazel, M., Elibüyük, I.O., Çağlayan, K., 2010. Occurrence of pospiviroid in potato, tomato and ornamental plants in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9: 2613-2617.
- Chung, B. N., Lim, J. H., Choi, S. Y., Kim, J. S., Lee, E. J., 2005. Occurrence of Chrysanthemum stunt viroid in Chrysanthemum in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 21(4), 377-382.

**Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması**

- Diener, T., 1971. Potato spindle tuber "virus" IV. A replicating low-molecular weight RNA, *Virology* 45, 411.
- Dimock, A.W., 1947. *Chrysanthemum* stunt. NY State Flower Growers Bull., 26, 2. NEW YORK STATE FLOWER GROWERS INCORPORATED, BULLETIN # 26.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballesta, J.F., Juarez, J., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamanta, R. And Semancik, J.S., 1988. The citrus exocortis disease: A complex of viroid-RNAs page 152-165 in: Proc. 10 th Intern. Org. Citrus Virologist (IOCV) Conf., Riverside-California, U.S.A.
- Gobatto, D., Chaves, A.L.R., Harakava, R., Marque, J.M., Daròs, J.A., Eiras, M., 2014. *Chrysanthemum* stunt viroid in Brazil: Survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. *J. Plant Pathol.*, 96, 111–119.
- Hosokawa, M., Ueda, E., Ohishi, K., 2004. *Chrysanthemum* stunt viroid disturbs the photoperiodic response for flowering of *chrysanthemum* plants. *Planta* 220, 64–70.
- Hosokawa, M., Y. Matsushita, K. Ohishi and S. Yazawa. 2005. Detection of *Chrysanthemum* chlorotic mottle viroid-like RNA in Japanese *chrysanthemum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74: 386–391.
- ICTV, 2020. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- Kazaz, S., 2016. Dünya Süs Bitkileri Sektöründe Ürün Deseni, Sosyo Ekonomik ve Teknoloji Alanında Yaşanan Gelişmeler ile Türkiye'nin Gelecek Vizyonu. 6. Süs Bitkileri Kongresi bildiriler kitabı. Syf:3-13
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6):1547–1549.
- Lawson, R.H., 1987. *Chrysanthemum* stunt. Pages 247-259 in: *The viroids*. T.O. Diener, ed. Plenum Press: New York and London.
- Matteoni J.A., Allen W.R., 1989. Symptomatology of tomato spotted wilt virus infection in florist's *chrysanthemum*. *Canadian Journal of plant pathology.*, 11:373-380
- Murray M.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* Oct 10; 8 (19) 4321-4325.
- Mehle, N., Seljak, G., Verhoeven, J.Th.L., Jansen C.C.C., Prezelj, N., Ravnikar, M., 2010. *Chrysanthemum* stunt viroid newly reported in Slovenia. *Plant Pathol.*, 59, 1159–1159.
- Niblett, C.L., Dickson, E., Horst, K.K., Romaine, C.P., 1980. Additional hosts and an efficient purification procedure for four viroids. *Phytopathology* 70, 610-615.
- Shiwak K., Iwai, T., Yamamoto, Y., 1996. Cloning and nucleotide sequence of *Chrysanthemum* stunt viroid. *Hyogo Pre Agric Inst (Agriculture)* 44:1-4.
- Titiz, S., Çakıroğlu, N., Birişçi Yıldırım, T., Çakmak, S., 2000. Süs bitkileri üretim ve ticaretindeki gelişmeler. V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, (17-21 Ocak 2000), Cilt II, 709-740, Ankara.
- Torchetti, E.M., Navarro, B., Trisciuzzi, V.N., Nuccitelli, L., Silletti, M.R., Di Serio, F., 2012. First report of *Chrysanthemum* stunt viroid in *Argyranthemum frutescens* in Italy. *J.Plant Pathol.* 94, 451-454.
- TÜİK, 2020. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (Erişim tarihi: 13.09.2021)
- Verhoeven, J.T.J.; Hammond, R.W.; Stancanelli, G., 2017. Economic significance of viroids in ornamental crops. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, 27–38, ISBN 9780128014981.



**Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması**

Zhao, X., Liu, X., Ge, B., 2015. A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum. Arch. Virol. 160, 1145–1152.

**Akdeniz Bölgesi Süs Bitkisi Yetiştiricilik Alanlarında Krizantem (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Bitkilerinde Bulunan Viroidlerin Araştırılması**