



## Süs Turunçgil Bitkilerinde *Turunçgil Cüceleşme Viroidi* (CEVd)'nin Araştırılması

Nüket ÖNELGE\*<sup>1</sup>

Gülbahar ARIKAN<sup>1</sup>

Orhan BOZAN<sup>1</sup>

### Özet

Turunçgil üretimi ülkemizde en önemli tarım kollarından bir tanesidir. Yaklaşık 3.6 milyon ton olan üretimin büyük bir bölümü (%70) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde gerçekleşmektedir. Turunçgil üretimini olumsuz etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden bir tanesi viroid ve virüs hastalıklarıdır. Son yıllarda bölgemizde süs turunçgil üretimi hızla artmakta ve yeni bir pazar oluşturmaktadır. Bu çalışmada Doğu Akdeniz turunçgil üretiminde önemli bir viral etmen olan *Turunçgil cüceleşme viroidi* (CEVd)'nin süs turunçgil bitkilerindeki varlığı araştırılmıştır. Çalışma Kumquat (*Fortunella japonica*), Nippon mandarinquat (*Citrus sinensis x C. japonica*) ve Kalomandin (*Citrofortunella microcarpa*) turunçgil çeşitlerinde gerçekleştirilmiştir. Her çeşitten 3 adet bodur bitki seçilmiş ve hastalık etmeninin bu çeşitlerdeki varlığı biyolojik indeksleme ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmalarında Mor kadife çiçeği (*Gynura aurantica*) ve Etrog citron (*C. medica* L.) bitkileri indikatör bitki olarak kullanılırken moleküler çalışmalar Ters Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm turunçgil çeşitlerinin CEVd ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. İndeksleme çalışmaları sonucunda mor kadife bitkilerinde yaprak epinastisi, boğum aralarında kısılma ve bodurluk belirtileri gözlenirken Etrog citron bitkilerinde şiddetli yaprak epinastisi, boğum aralarında kısılma, bodurluk, yaprakların arka yüzeyinde nekroz gelişimi gibi semptom gelişimleri gözlenmiştir. RT-PCR çalışmaları sonucunda CEVd'nin 371 nt uzunluğundaki bantları agar jel elektroforez çalışmalarında belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CEVd, Turunçgil cüceleşme hastalığı, turunçgil süs bitkileri, turunçgil

### Investigation of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in Ornamental Citrus Plants

#### Abstract

Citrus fruit production is one of the most important agricultural branches in our country. A large portion (approximately 70%) of the 3.6 million tonnes is produced in the Eastern Mediterranean region. There are many factors that negatively effect the production of citrus fruit. One of these factors is viroid and virus diseases. In recent years, the production of ornamental citrus in our region has been rapidly increasing and creating a new market. In this study, the existence of *Citrus exocortis viroid* (CEVd), one of important viroid agent in Eastern Mediterranean citrus production, was investigated. The study was carried out in citrus varieties of Kumquat (*Fortunella japonica*), Nippon mandarinquat (*C. sinensis x C. Japonica*) and Calomandin (*Citrofortunella microcarpa*). Three of each variety were selected and the presence of disease agents in these varieties was investigated by biological indexing and molecular methods. Molecular studies were carried out using the Reverse Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method in which *Gynura aurantica* and Etrog citron (*C. medica* L.) plants were used as indicator plants in biological indexing studies. It was determined that all the ornamental citrus varieties examined were contaminated with CEVd. As a result of indexing studies, symptom developments such as severe leaf epinasty, shortening between nodes, stunting, development of necrosis on the back side of the leaves were observed in Etrog citron plants and leaf epinasty, shortening between the nodes, stunting symptoms and necrosis were observed in *Gynura aurantica*. As a result of RT-PCR studies, 371 nt long bands of CEVd were determined by agar gel electrophoresis.

**Keywords:** Citrus exocortis viroid, CEVd, RT-PCR, ornamentel citrus plants, citrus

#### Giriş

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 20.07.2017

1Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü,01330, Adana

\* Sorumu Yazar: [nuketon@cu.edu.tr](mailto:nuketon@cu.edu.tr)

Turunçgiller (*Citrus spp.*) dünyada olduğu gibi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan en önemli meyve gruplarından. Ülkemiz yaklaşık 125 bin hektar alanda yapılan üretim ile dünya turunçgil üretiminde önemli bir yer almaktadır (FAO, 2013). Türkiye toplam turunçgil üretiminin %86'sı Mersin, Adana, Antalya ve Hatay illerinden karşılanmaktadır (TÜİK, 2015). Portakal (*C.sinensis*), mandarin (*C.reticulata*), altıntop (*C.paradisi*), limon (*C.limon*) ve laym (*C.aurantifolia*) çeşitleri en fazla yetiştirilen türlerdir. Kamkatlar (*Fortunella spp.*) da sınırlı miktarda yetiştirilmektedir (Davies ve Albrigo, 2005). Süs turunçgil çeşitleri günümüzde süs bitkisi olarak evlerde, balkonlarda, bahçelerde ve peyzaj tasarımlarında kullanılmaktadır. Turunçgil süs bitkileri çevre ve bahçe düzenlemeleri, gıda sektöründe ayrı bir öneme sahiptir. Turunçgil süs bitkilerinin nüfusa bağlı olarak gelişen gıda ihtiyacı ve gelişen şehir planlamacılığı ile üretimi hızla artmaktadır. Dünyada turunçgil üretilen alanlarda 80'e yakın virüs ve virüs benzeri hastalık olduğu bildirilmektedir. Virüs, viroid ve virüs benzeri hastalıklar, turunçgil tarımı üzerinde pek çok olumsuz etkiye sahip olup, ekonomik turunçgil üretimini sınırlayan en önemli faktörlerden birisidir. Bu virüs ve benzeri hastalıklara neden olan etmenlerden bir kısmı enfekte ettikleri turunçgil ağaçlarında fark edilmeyecek derecede zarar verirken, diğer kısmı ise üretim kaybı nedeniyle, turunçgil tarımını engelleyerek ve hatta hassas tür veya anaç kalem kombinasyonlarının ölüme kadar götürebilecek derecede zarar vermektedir (Roistacher,1995). Günümüzde viroidler ekonomik önemi olan çok sayıda hastalığa neden olmaları ve enfeksiyöz hastalık etmeni olarak en küçük patojen grubunu oluşturmaları nedenleriyle de ayrı bir ilgiye sahiptirler. Viroid etmenleri arasında *Citrus exocortis viroidi* (CEVd) ülkemizde Turunçgil cüceleşme viroid hastalığı etmeni olarak adlandırılmış olup turunçgil çeşitlerinde belirlenen ilk viroid etmenidir. CEVd duyarlı olmayan turunçgil ağaçlarında herhangi bir semptom geliştirmeksizin, genel bir bodurlaşmaya neden olabilmektedir. Çoğu ticari turunçgil tür ve çeşitleri etmeni latent olarak bulundurmasına karşın, bu çeşitler duyarlı anaçlara aşılandığında hastalığın bir göstergesi

olarak anaçta kabuk kavlamaları ve zamlak akıntıları görülmektedir (Roistacher,1995). CEVd günümüzde patojen grubu olarak viroidler içinde *Pospiviroidae* familyası, *Pospiviroid* cinsi içinde sınıflandırılmaktadır (Semancik and Duran-Vila,1991). CEVd 371-410 nt uzunluğunda olup zayıf ve şiddetli hastalık belirtileri geliştiren çok sayıda varyanta sahiptir (Semancik ve ark., 1994). Bu çalışma ülkemizde ve bölgemizde üretimi her geçen gün biraz daha artan süs turunçgil çeşitlerinde CEVd'nin varlığının araştırılması ve etmenin moleküler yöntemlerle tanınması amacı ile gerçekleştirilmiştir.

### Materyal ve Yöntem

CEVd'nin araştırıldığı bu çalışmada materyal olarak Adana ve Mersin turunçgil fidanlıklarında üretilen Kumquat (*F. japonica*), Nippon mandarinquat (*C. sinensis x C. japonica*) ve Kalomandin (*C. microcarpa*) turunçgil türlerini içeren fidanlardan alınan yaprak ve sürgün örnekleri kullanılmıştır. Her turunçgil türünden bodurluk semptomu sergileyen 3'er örnek araştırmaya alınmış olup toplam 9 örnekte etmenin varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmaları Mor kadife bitkileri (*Gynura aurantica*) ve Etrog citron indikatör bitkileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CEVd nin mekanik inokulasyonu örnek alınan bitkilerin yapraklarından elde edilen Total Nükleik Asitlerin (TNA) gövde çizme (stem slash) yöntemi ile indikatör bitkilere aktararak yapılmıştır (Roistacher,1995). Açılan yaralar parafilm ile sarılarak bitkiler sıcaklığı 30°C olan iklim odasına alınmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak TKM ortamı, pozitif kontrol olarak stok olarak bulunan CEVd ile enfekteli bitkiler kullanılmıştır. TNA ekstraksiyonu Murray ve Thompson (1980)'a göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TNA'ler RT-PCR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Tepkimesi) çalışmasında kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları Önelge (1997)'ye göre gerçekleştirilmiştir. RT-PCR amplifikasyonu ile elde edilen DNA'lar %1.5'lük agar jel elektroforezde koşturulmuş ve elde edilen cDNA bantları UV ile görüntülenmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

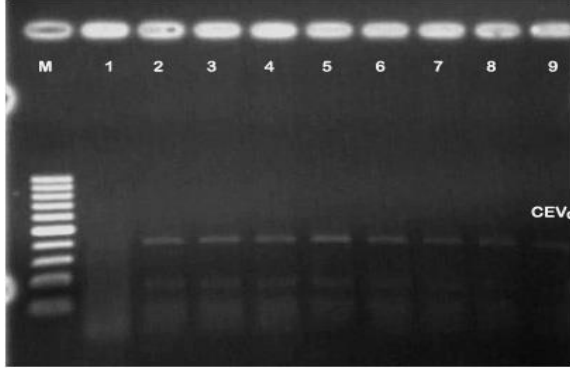
Biyolojik indeksleme çalışmalarında yürütülen mekanik inokulasyonlarda CEVd hastalığı için karakteristik olabilecek simptomlar her iki bitki grubunda da gözlenmiştir. Simptomlar inokulasyondan yaklaşık 6 hafta sonra gözlenmeye başlanmıştır. Mor kadife bitkilerinde ilk gözlenen simptomlar yaprak kıvrıcıklığı ve epinasti simptomları olmuştur (Şekil 1). Daha sonraki haftalarda bu simptomların şiddeti artarak yaprak kıvrılmaları daha belirgin bir hal almıştır. Genel olarak bulaşık bitkilerde şiddetli bir bodurluk gözlenmiştir. Bodurluk, bitkilerin boğum aralarındaki kısalmalar nedeniyle CEVd'nin karakteristik belirtisi olarak gelişmiştir. Bu hastalık belirtileri Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerinde ortak simptomlar olarak gelişmiştir. Ayrıca citron bitkilerinde yaprakların arka yüzeyinde damarlarda nekroz oluşumları gözlenmiştir. Gelişen bu simptomlar pozitif kontrol bitkilerinde de gözlenirken negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerden elde edilen TNA'ler ile inokule edilen bitkilerde herhangi bir simptom gelişimi gözlenmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da araştırmacılar CEVd ile enfekteli bitkilerin Etrog citron ve Mor kadife çiçeği bitkilerinde epinasti, bodurluk ve boğum arası kısalığı geliştirdiğini belirtmişlerdir (Semancik ve ark., 1993; Roistacher,1995; Önelge, 1997). Çalışmada Etrog citron bitkilerinde yaprak nekrozlarının yanı sıra sürgünlerde de nekrozların geliştiği gözlenmiştir.



**Şekil 1.** *Gynura aurantica* (a) ve Etrog citron (b) bitkilerinde gelişen epinasti ve bodurlaşma belirtileri

Süs turunçgil çeşitlerinde CEVd'nin varlığını moleküler olarak araştırmak amacıyla yürütülen RT-PCR çalışmasında çalışmaya alınan tüm örneklerin pozitif kontrol da dahil

olmak üzere CEVd etmeni ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Turunçgil örneklerinin CEVd'ne ait 371 nt'lik DNA bantları %1.5'lik agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir (Şekil 2). Çalışmada CEVd etmeni ile bulaşık olan örneklerin oluşturduğu bant uzunluklarının, pozitif kontrol örneği ile aynı seviyelerde olduğu görüntülenmiştir. Yapılan çalışmalarda CEVd'nin turunçgil bitkilerinde 371 nt içerdiği farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Semancik,1986; Duran-Vila ve ark.;1986; Önelge 1997). CEVd sadece turunçgillerde bulunmayıp pek çok bitki türünde bulunmaktadır (Duran-Vila and Semancik, 2003). Ancak diğer bitki türlerinde etmen latent olarak bulunmakta herhangi bir belirti geliştirmemektedir. Turunçgillerde ise etmen anaç olarak kullanılan üçyapraklı ve hibridlerinde hastalık oluşturmakta ve bu bitkilerde kabuk kavlamaları geliştirmektedir. Turunç anacına aşılı turunçgil tür ve çeşitlerinde CEVd latent olarak bulunmakta bodurluk dışında herhangi bir simptom geliştirmemektedir (Semancik and Duran-Vila, 1999). CEVd bazı ülkelerde bodur turunçgil yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. Ülkemizde CEVd'nin varlığı ve ticari olarak yetiştirilen turunçgil çeşitlerinde yoğun olarak bulunduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. CEVd'nin turunçgil bitkilerinde bu denli yoğun bulunmasının bir nedeni etmenin mekanik olarak budama aletleri aşı makas ve bıçaklarıyla kolayca taşınıyor olabilmesidir (Önelge, 1997). Fidan üreticilerinin bilinçlendirilmesi ve mekanik taşınmanın sodyum hipoklorit kullanımı ile önlenmesi hastalık etmenin yayılımını önlemede etkilidir. Etmen yaygınlığının diğer ve en önemli nedeni ise ülkemizde turunçgil yetiştiriciliğinde sertifikasyon programlarının uygulanmamasıdır. Sertifikalı ve hastalık etmenlerine karşı testlenmiş temiz ana kaynakların aşı gözü kaynağı olarak kullanılması etmenin yaygınlığını önlemede etkili olacaktır. Süs turunçgil fidan yetiştiriciliğinin hızla arttığı ve yeni turunçgil türlerinin süs bitkisi kapsamında satışı yapıldığı ülkemizde özellikle üçyapraklı ve hibritlerinin anaç olarak kullanıldığı durumlarda CEVd'nin hastalık belirtilerini daha kolay görebilmektedir.



**Şekil 2.** Süs turunçgil çeşitlerinden yapılan RT-PCR sonucunda %1.5'lük agar jel üzerinde belirlenen 371 nt uzunluğundaki CEVd bantları. M; Markör;1, negatif kontrol; 2,3,4,Kumquat; 5,6,Kalomandin; 7,8,Nippon mandarinquat; 9, Pozitif kontrol

Bu nedenle süs turunçgil üretiminde bu etmene karşı testlenmiş, sağlıklı fidan yetiştirilmesi ve kullanımı oldukça önemlidir.

### Sonuçlar

*Turunçgil exocortis viroid*'inin süs turunçgil çeşitlerinde varlığının belirlenmeye çalışıldığı bu araştırmada Kumquat, Kalomandin ve Nippon mandarin çeşitlerinde CEVd varlığı ilk kez ortaya konmuştur. CEVd turunçgil cüceleşme hastalığının etmenidir ve bu çalışmada etmen mekanik olarak çizme yöntemi ile Mor kadife bitkilerine ve Etrog citron bitkilerine taşınmıştır. Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda her iki bitki grubunda boğum aralarında kısılma, bodurluk, epinasti ve yapraklarda nekroz oluşumu belirtileri gelişmiştir. RT-PCR yöntemi ile hastalık etmeninin moleküler olarak tanılanması gerçekleştirilmiş her üç bitki grubunda etmenin 371 nt uzunluğundaki bant oluşumu %1.5'lük agar jel üzerinde görüntülenmiştir.

### KAYNAKLAR

Davies, F.S., Albrigo, L.G. 2005. Turunçgiller (Çeviri: Dalkılıç Z), Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları No:22, Aydın, 272s.

Duran-Vila, N., Flores, G. and Semancik, J. S. (1986). Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology* 150, 75-84.

Duran-Vila N., Semancik, J.S., 2003. Citrus viroids. In: Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. (eds). *Viroids*, pp. 178-194. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

FAO, 2013. Agricultural Statistics. <http://faostat.fao.org/> (10 Ağustos 2017)

Murray, M.G. and Thompson W.F., (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980 Oct 10; 8 (19) 4321-4325.

Önelge, N., (1997). Direct nucleotide sequencing of citrus exocortis viroid (CEV). *Turk. J. Agric. For.* , 21: 419-422

Roistacher C.N., 1995. A historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. *FAO Rome (Eds.)* 89 p.

Semancik, J. S. (1986). Separation of viroid RNAs by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virology* 155, 39-45.

Semancik, J. S. and Duran-Vila, N. (1991). The grouping of citrus viroids : additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 11, 178-188.

Semancik, J. S. ve Duran-Vila, N., (1999). Viroids in plants: shadows and footprints of a primitive RNA. In *Origin and Evolution of Viruses*, pp. 37-64. Edited by E. Domingo, R. Webster & J. Holland. San Diego: Academic Press.

Semancik, J.S., Szychowski, J. A., Rakowski, A.G. and Svmons, R. H., (1993). Isolates of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *Journal of General Virology* 74, 2427-2436.

TÜİK, 2015. <https://biruni.tuik.gov.tr/bolgeselistatistik/> (10 Ağustos 2017)