

TURUNÇGİL EXOCORTIS VİROİDİNİN RT-PCR ve DOT BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİYLE TANISI

Münevver GÖÇMEN Tülay TAŞDEMİR Mukaddes KELTEN
Sema GÜNEŞ İlknur POLAT
Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya-Türkiye

Özet

Turunçgil Exocortis viroidi (CEV), düşük moleküler ağırlıklı, 371 nükleotid uzunluğunda RNA yapısında olup, dünyada turunçgil yetiştiriciliği yapılan tüm alanlarda mevcuttur. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf anacı (üç yapraklı) başta olmak üzere Carrizo citrange ve Rangpur lime üzerine aşılı portakal, mandarin, tangelo ve altıntopta ekonomik zararı fazladır. Turunçgil Exocortis hastalığının tanısında en yaygın kullanılan yöntem, biyolojik testlemedir. Ancak bu testleme yönteminde, kontrollü sera gerekliliği ve testleme süresinin uzun olması yeni modern tekniklerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Yapılan bu çalışmada, moleküler tekniklerden olan ve RNA düzeyinde tanılama yapmaya imkan sağlayan RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymeraze Chain Reaction), ve enzim (Biotin-ULS) işaretlemesiyle Dot-Blot Hibridizasyon teknikleri Türkiye Turunçgil Çeşit Geliştirme Programında (TTÇGP) CEV'in tanılmasında kullanılmıştır. Böylece, biyolojik testleme süresi uzun olan CEV'nin, kısa sürede, güvenilir ve hızlı şekilde tanılanmanın yapılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, Exocortis Viroid, RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymeraze Chain Reaction), Dot-Blot Hibridizasyon

Identification of Citrus Exocortis Viroid by RT-PCR and Dot-Blot Hybridization

Abstract

Citrus Exocortis Viroid (CEV) which has low weight and RNA structure 371 nucleotid lenght is very common in all citrus orchards. Its economic loss is much more on orange, mandarine, tangelo and grapefruit grafted especially on *Poncirus trifoliata* (L.), Carrizo citrange ve Rangpur lime rootstocks. Biological testing is the most common method for identification of CEV. This method takes long time and needs controlled greenhouse conditions, therefore the advanced molecular tests can be utilized to determine CEV. In this study, RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymeraze Chain Reaction), a molecular technique identifying at RNA level and dot-blot hybridization via enzym (Biotin-ULS) marking technique was used for identification of CEV in Citrus Variety Improvement Programme in Turkey. In this way, presence of CEV in citrus has been identified more reliable and faster than biological testing method.

Keywords: Citrus, Exocortis Viroid, RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymeraze Chain Reaction), Dot-Blotting hybridization.

1. Giriş

Turunçgil Exocortis hastalığının Türkiye de varolduğu ilk olarak Norman(1963) ve Moreira(1965). tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde yaygın olarak üretimi yapılan portakal ve mandarin başta olmak üzere tangelo ve altıntop bu hastalığa oldukça duyarlı turunçgil türleridir. Çınar ve ark. (1993), Çukurova bölgesinde yaptıkları survey çalışmasında, Navel portakal ve mandarin ağaçlarının genelde CEV'i ile bulaşık olduğunu belirtmişlerdir. Özaslan ve Çınar (1990), CEV iki boyutlu gel elektroforez tekniği ile mandarin ve mandarin hibritlerinde ülkemizde ilk kez moleküler düzeyde saptamışlardır. Bir çok

turunçgil türü ise bu hastalığa tolerant olup hiçbir simptom göstermemektedir. Hastalığın simptomları daha çok *Poncirus trifoliata* (L.)Raf anacı (üç yapraklı) üzerine aşılı turunçgil türlerinde yaprak buruşukluğu (yaprak orta damarından büzülme), bitkide bodurlaşma ve anaç kısmında kabuk pullanması şeklinde görülmektedir (Şekil 1). Hastalığın ekonomik zararı, daha çok verim azalması ve ağaç ömrünün kısılması nedeniyle olmaktadır.

Turunçgil Exocortis Viroidi (CEV), dünyada turunçgil üretimi yapılan tüm alanlara dağılmıştır (Wallace,1978). Etmenin bazı tolerant turunçgil çeşitlerinde

simptom oluşturmadan bulunması, aşığözü budama makası (mekanik) ve kök füzyonu ile bulaşması hastalığın yayılmasında etkili olmuştur (Garnsey ve Jones, 1967; Wutscher ve Shull, 1975).

Patojen, tek iplikçikli, circular veya linear formda, yaklaşık 105.000 dalton ağırlığında, RNA zincir uzunluğu 371 nükleotid olup Rutaceae, Solanaceae ve Compositaceae familyasında hastalık oluşturmaktadır (Rivera-Bustamente ve Semancik, 1986; Roistacher ve ark., 1978; Semancik ve Weathers, 1972; Semancik, 1987).

Hastalık tanısı genellikle biyolojik testleme ile yapılmaktadır. Testlemede, indikatör bitki olarak, hastalığa en duyarlı Etrog citron'un 861-S-1 klonu kullanılmaktadır. Biyolojik testleme, bu indikatör bitki üzerine bulaştırma aşısı yapılması ve bitkilerin sıcak bir ortamda bekletilmesi sonucu oluşan belirtilerin gözlemlenmesi şeklinde yapılmaktadır. Ancak bu testleme yönteminin, bazı olumsuz yanları mevcuttur. Bitkiler simptom oluşturmadığı takdirde, testleme süresi 18 aya kadar uzamakta ve CEV simptomunun gelişmesi için çevre koşullarının optimum olması (sıcaklığın en az 30°C) gerekmektedir. Bu nedenle kış aylarında yapılan testlemeler de maliyeti arttırmaktadır. Ayrıca indikatör bitki tohumlarının elde edildiği ana bitkilerin zaman içerisinde bulaşma olasılığı her zaman vardır. (Boccardo ve ark.,1984).

CEV tanısında, daha sonraları biyokimyasal yöntemlerden olan ince tabaka ve kolom kromatografisi kullanılmıştır (Fuld-Allah ve ark.,1984). Nükleik asit elektroforez tekniğindeki gelişmeler sonucu CEV, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ortamında yaklaşık 8 saat yürütülerek ayrıştırılmak suretiyle karakterize edilmiştir (Baksh ve ark.,1983; Boccardo ve ark.,1984). PAGE tekniği için RNA izolasyon ve purifikasyon zorunluluğu, ayrıca CEV-RNA konsantrasyonunun en az 1-3ng seviyede olma gerekliliği; CEV belirlenecek bitki örneğinin Etrog citron üzerine aşılanarak 32°C'de en az 3 ay bekletilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu gibi olumsuzluklar hastalık tanılamada, yeni arayışları birlikte getirmiştir.

1990'lı yıllarda PCR (Polymerase Chain Reaktion) ve RT-PCR (reverse transcription PCR) tekniğindeki gelişmeler sonucu, bitki dokusunda patojen konsantrasyonu 0,01ng seviyede olsa dahi patojene özgü iki spesifik primerin kullanılmasıyla patojen tanılması yapılabile hale gelmiştir (Robertson ve ark.,1991; Rybicki ve Hughes, 1990; Yang ve ark., 1992).

Hastalık survey çalışmalarında ve uluslararası tanı çalışmalarında en fazla kullanılan yöntemlerden biride nükleik asit hibridizasyonudur (Macquaire ve ark.,1994). CEV tanısında, bir çok araştırmacı tarafından uzun yıllar PAGE çalışmasına paralel olarak nükleik asit hibridizasyon uygulaması yapılmıştır (Flores,1988; Albanese ve ark., 1988; Semancik 1988; Gillings ve ark., 1988). Bu araştırmacılar hibridizasyon çalışmalarında probe işaretlemeye radyoaktif madde olan ³²P kullanmışlardır. Radyoaktif çalışmaların sağlık yönünden riskli olması ve özel laboratuvar ekipmanları gerektirmesi kullanımı sınırlamıştır. Bu nedenle bir çok laboratuvar da uygulanmamaktadır. Daha sonraki yıllarda enzim esaslı probe işaretleme kitlerinin devreye girmesiyle hastalık teşhisinde dot-blot hibridizasyon uygulamaları yaygın kullanılmaya başlanmıştır.

Enzim esaslı Biotin-ULS (Biotin Universal Linkage System) probe işaretleme çalışmaları 1992 yılında ilk kez tıp alanında hastalık tanılamada kullanılmaya başlanmıştır (Belkum ve ark.,1993). Sonraki yıllarda bitki hastalıklarının tanısında ve vektör taramalarında uygulanmıştır (Harper ve ark.,1993).

Yapılan bu çalışmada, turunçgillerde virus ve virus benzeri hastalıklardan temiz aşığözü ve fidan üretimini sağlayan Türkiye Turunçgil Çeşit Geliştirme Programında (sürekli), CEV'nin biyolojik testleme yanında daha hızlı ve güvenilir sonuç veren moleküler tekniklerden olan RT-PCR ve enzim (Biotin-ULS) işaretlemesi ile dot-blot hibridizasyonun tekniği uygulanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Bitkisel materyal olarak TTÇGP'da virus ve virus benzeri hastalıklardan arındırmak için *in vitro* sürgün ucu aşılama geçirilmiş 9 çeşit ve nüceller çalışmadan seçilen 5 çeşit kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, bulaştırma yapılmayan Etrog citron kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, Kaliforniya'dan getirilen kuvvetli düzeyde hastalık oluşturan 805 ırkı, orta düzeyde hastalık oluşturan 811 ırkı, zayıf düzeyde hastalık oluşturan 819 ve 822 ırkı ve daha önceki indekslemelerde pozitif olarak bulunan ST-1 (Satsuma klonu) kullanılmıştır. Ayrıca otsu bitki olarak CEV'nin ST-1 ırkı ile mekanik inokulasyonla bulaştırmış olan hıyar ve domates bitkileri kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Turunçgil Exocortis Viroid Tanılanmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller.

<i>Turunçgil Çeşitleri</i>	
Hamlin-C	Satsuma I-2 (nuceller)
Yediveren Limon	Moro-2/7 (nuceller)
86-B	Hamlin I-8 (nuceller)
IE-3/A	Kontrol bitki
Honey/A	<i>Pozitif Örnekler</i>
38-B	ST-1, 805 (CEV'nin şiddetli ırkı)
Yerli Mandarin	819, 822 (CEV'nin zayıf ırkı)
Hamlin-B	811 (CEV'nin orta düzeyde semptom oluşturan ırkı)
WM-3/A	<i>Otsu Bitkiler</i>
90-C	Hıyar (<i>Cucumis sativus</i>)
Valencia XII-6 (nuceller)	Domates (<i>Lycopersicon esculantum</i>)

2.2.Yöntem

2.2.1.Biyolojik (Gösterge Bitkileri Üzerinde) Testleme

In vitro sürgün ucu aşılama yapılarak testleme büyüklüğüne gelen bitkilerden ve bahçede bulunan nüceller çeşitlerden ikişer

göz alınarak kaba limon çöğürleri üzerine doku bulaştırması yapılmıştır. Aynı kaba limon çöğürü üzerine CEV'ye duyarlı Etrog citron 861-S1'den alınan iki göz aşılama yapılmıştır. Negatif kontrolde ise kaba limon çöğürüne yalnızca Etrog citron'da iki göz aşılama yapılmıştır. Pozitif kontrol de yine kaba limon çöğürü anaç olarak kullanılmış ancak bulaştırma dokusu olarak ST-1, 805, 819, 822 ve 811 nolu bitkilerden alınan doku parçası aşılama ve yine aynı bitki üzerine Etrog citron aşılama yapılmıştır. Kaba limon üzerine aşılama Etrog citron gözü sürdükten sonra, bitkiler 8-12 hafta sıcak serada (30-32°C) inkube edilmiş ve semptomolojik gözlemler yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan hıyar ve domates bitkileri 2-3 yapraklı dönemde, yapraklarına ST-1 bitkisinin öz suyu karborandum kullanılarak inokule edilmiş ve bitkilerin sıcak serada bakım işleri yapılmıştır.

2.2.2. Doku Ekstraksiyonu

Biyolojik testleme yapılan bitkilerin taze sürgünlerinden 0.5-1gr'lık yaprak örnekleri alınmıştır. Bitki dokusu sıvı azotta ezilerek Semancik (1991) göre RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar 100-200µl TKM bufferda (Tris 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 0.1mM) çözülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3.RT-PCR Yöntemi

2.2.3.1.CEV'nin cDNA Sentezlenmesi ve Amplifikasyonu

RNA yapısında olan CEV 'den öncelikle cDNA sentezinin yapılması gerekmektedir.cDNA sentezi Yang ve ark.,(1992) göre yapılmıştır. cDNA sentezi için total nükleik asitten 1µg alınarak üzerine 1-3µg 20-mer'lık spesifik primer (5'-CCCTGAAGGACTTCTTCTCCCC-3'; central conserved bölgedeki 71-90 CEV-A nükleotidlerinin complementar) eklenmiştir. 6µl cDNA buffer (250mM Tris-HCL pH 8.3, 375 mM KCl ve MgCl₂, 50mM DDT) konularak hacim steril destile su ile 30µl 'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 100°C'de 5 dakika kaynatılarak nükleik

asitlerin denatüre olması sağlanmıştır. 2 dakika buz üzerinde ve sonra 1 saat oda sıcaklığında bırakılarak primerin annealing (primerlerin nükleik asitlere bağlanması) sağlanmıştır. 18µl reaksiyon karışımı (4µl cDNA buffer, 5µl 0.3M 2-mercaptoethanol, 2.5µl 10mM dNTP, 6.5µl steril dionize su ve 2µl Moloney murine leukemia virus reverse transkriptase) hazırlanarak 30µl'lik annealing yapılan karışıma eklenerek 42°C'de 2.5 saat bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR'da amplifikasyon işlemi için CEV'nin cDNA'dan 5µl alınmış üzerine MgCl₂ 40 mM, 2.5 µl PCR buffer, 5mM dNTP, 1.25µL 20 mer'lik CEV-A primeri (downstream) ile 2.5µL 24 mer'lik CEV-B primer (upstream); (5'ATCCCCGGGGGAAACCTGGAGGAA G-3'), 0.5µl Taq polymeraze enzimi eklenerek, hacim steril dionize su ile 25µl'ye tamamlanmıştır. RT-PCR için amplifikasyon programı 40 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Her döngü; 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 2 dakika ve 72°C'de 3 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir. Son döngüde örnekler 72 °C'de 7 dakika bekletilmiştir. RT-PCR'dan sonra örnekler 4°C'ye alınmıştır.

2.2.3.2 .RT-PCR Ürünlerinin Polyakrilamid Gel Elektroforezi

RT-PCR amplifikasyonu ile elde edilen DNA'lar %5'lik polyakrilamid dikey gel elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforez bufferı olarak TBE (Tris 225mM, Borik asit 225mM, Sodium ETDA 5mM, pH 8.3, 10x) kullanılmış ve elektroforez işlemi 100V'da 4 saat elektrik akımı verilerek yapılmıştır. Jel ethidium bromid ile 10 dakika boyanmış ve UV ışığında bant gözlemlenmesi yapılmıştır.

2.2.4.Nükleik Asit Dot-Blot Hibridizasyonu

2.2.4.1. Örneklerin Membrana Dot-Blot Yapılması

Bitki dokusundan izole edilen nükleik asitten 3µl, steril saf sudan 4µl alınarak karıştırılmış ve 5 dakika kaynatılmıştır.

Denatüre olan örnekler hemen mikropipet yardımıyla membrana damlatılarak absorbe edilmesi sağlanmıştır.

2.2.4.2. ST-1 Örneğinin Probe Olarak Biotin-ULS ile İşaretlenmesi

Biyolojik testlemelerde ve RT-PCR çalışmasında pozitif bulunan ST-1 örneği probe olarak seçilmiştir. RT-PCR yapılmış ST-1 örneğinden 10µl alınmıştır. Üzerine 2µl BIO-ULS (1 mg/ml) kitindeki işaretleme solüsyonu eklenmiş ve örnek 85°C'de 30 dakika inkube edilerek probun biotin ile işaretlenmesi sağlanmıştır. Proba bağlanmayan kimyasallar maddeleri uzaklaştırmak için karışım etanolle muamele edilerek nükleik asitler pellet halinde çöktürülmüştür. Kurutulan pellet üzerine 10µl steril H₂O eklenmiştir.

2.2.4.3. BIO-ULS ile İşaretlenen Probon Membrana Dot Blot Yapılan Örneklerle Bağlanması

Nytran membrana dot blot yapılan örneklerin absorbe olmaları için membran kurutulmuştur. Membran UV ışığında 2 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan hibridizasyon buffer (0,25M Na₂H₂PO₄ pH 7.2, SDS %7) membran üzerine dökülerek 65°C'de 4 saat membran inkube edilmiştir. Biotin- ULS ile işaretlenen probe pipet yardımıyla 65°C'deki membran üzerine eklenmiş ve dağılması sağlanmıştır. Membran 65°C'de bir gece inkube edilmiştir. Daha sonra membran önce solüsyon A (250mM Na₂H₂PO₄ pH 7 ,SDS %0.5) ile sonra solüsyon B (125mM Na₂H₂PO₄ pH 7 ,SDS %0.5)'de 65°C'de 15 dakika bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda, Bio-ULS ile işaretli probun membrandaki örneklerle hibridize olması sağlanmıştır.

2.2.4.4.Biotin Tanımlama Kiti ile Sonuçların Değerlendirilmesi

Prob ile hibridize olan örneklerin görülebilir hale getirilmesi Belkum ve ark.,(1993) göre yapılmıştır. Bu aşamada tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Membran üzerine

Streptavidin eklenmiş ve 15 dakika inkubasyon sağlanmıştır. Membran iki kez PBS, %0.5 Tween-20 içeren solüsyonu ile yıkanmıştır. Bu defa membran Alkaline fosfataze (Biotin detection system, streptavin alkaline phosphatase assay, Kreatech BV, Amsterdam, the Netherlands) ile muamele edilerek 15 dakika inkube edilmiştir. Membran iki kez tekrar yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve Sodiumazide 0.2 mg/ml ve boyama buffırı (0.1 M Tris HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) içerisinde 2 dakika bekletilmiştir. Renk gelişimi için membran %70'lik dimethylformamide ile 0.1 M Tris HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, NBT (Nitro Blue Tetrazolium) (32mg/ml) kimyasalı bulunan solüsyonda hafifçe sallanmış ve sonra 10µl BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indoly-1-Phosphate) eklenerek 30-45 dakika içerisinde membran gözlemlenmiştir. Proben hibridize olduğu örnekler mavi renkte lekeler halinde görülmüştür.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Biyolojik Testleme

CEV testi yapılan bitkiden bulaştırma için iki göz ve Etrog citron dan (duyarlı klondan) iki göz olmak üzere 4 göz kaba limon çöğürü üzerine aşılanmış ve 30-32°C'de inkube edilen bitkilerin 2-3 hafta sonra aşı bağları çözülmüştür. İnokulasyondan 6-7 hafta sonra simptomolojik gözlemler yapılmaya başlanmıştır. Etrog citronun gözlerinden gelişen ilk sürgünlerde hastalık belirtileri gözlenmiştir. Bitkinin gelişmesi için 12 hafta beklenilmiş ve belirtiler değerlendirilmiştir. Biyolojik testleme sonuçları Çizelge 2'de verilmektedir. Hastalık belirtileri, hastalığın şiddetine bağlı olarak yaprak kıvrılması, boğum aralarında kısalma şeklinde kendini göstermektedir (Şekil 1.).

Sürgün ucu aşılama sonucu elde edilen Hamlin/B bitkisi CEV ile bulaşık bulunmuştur. CEV'nin sürgün ucu aşılama ile arındırılması aşılama esnasında kesilen meristem dokusu ile ters orantılıdır. Eğer kesilen meristem büyük ise (0.16mm'den

CEV'nin arındırma oranı düşmektedir. Ayrıca CEV mekanik taşıdığından aşılama esnasında kesimde oldukça önemli olmaktadır. CEV ile bulaşık bulunan bu hat imha edilmiştir.

Çizelge 2. CEV'nin Biyolojik Testleme Sonuçları.

Testlenen Bitkiler	Testleme Sonuçları
Hamlin-C	-
Yediveren Limon	-
86-B	-
IE-3/A	-
Honey/A	-
38-B	-
Yerli Mandarin	-
Hamlin-B	+
WM-3/A	-
90-C	-
Valencia XII-6(nuc)	-
Satsuma I-2 (nuceller)	-
Moro-2/7 (nuceller)	-
Hamlin I-8 (nuceller)	-
Kontrol bitki	-
ST-1	+
805	+
819	+
822	+
811	+
Hıyar	-
Domates	+

Biyolojik testlemede pozitif kontrol olarak kullanılan ST-1 ve 805'de güçlü hastalık belirtileri oluşmakta ve bazen bitkiyi öldürmektedir. Zayıf ırk olan 819 ve 822'da yaprak belirtileri daha az gelişmiştir. 811 nolu CEV ırkı ise sürgünün ilk dönemlerinde yaprak belirtileri göstermesine rağmen bitki ölümüne neden



Şekil 1. CEV'nin (ST-1 ırkı) Biyolojik Testlemedeki Yaprak Belirtileri.

olmamaktadır. Otsu bitkilerden olan domatesde genç sürgünlerde yaprak kıvrılmaları hafif görülmüş olmasına karşı hıyar bitkilerinde hiç semptom gözlenmemiştir. Solanaceae familyasından olan domatesin CEV'nin konukçuları arasında bulunduğu Fonseca ve ark., (1993) tarafından da bildirilmiştir.

3.2.RT-PCR

Bu çalışmada, Turunçgil *Exocortis* viroidinin tanısı için moleküler tekniklerden olan RT-PCR kullanılmıştır. Spesifik primer olarak Yang ve ark.(1992), tarafından kullanılan CEV'nin central conserved bölgesindeki (nükleotid dizilimleri 71-90) ve onun yan kısmındaki 91-114 aralığındaki nükleotid diziliminin complementary kullanılarak CEV'ye özgü spesifik primerler (CEV-A ve CEV-B) sentezletilmiş ve RT-PCR 'da kullanılmıştır. Bu primer dizilimleri şerbetciotu bodur viroidinin primerleri ile oldukça benzerlik göstermekte olduğu Hadidi ve Yang (1990) tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmada tüm bitkisel örneklerden RNA izole edilerek RT-PCR yapılmıştır. RNA izolasyonu total nükleik asit izolasyonuna göre daha dikkatli çalışmayı gerektirmektedir. Yang ve ark.(1992), RT-PCR uygulamasını total nükleik asit kullanarak yapmışlardır. Total nükleik asit içerisinde çok az miktarda (0.01-0.001 ng) CEV olsa dahi tanılama işleminin yapılabileceği bildirilmiştir.

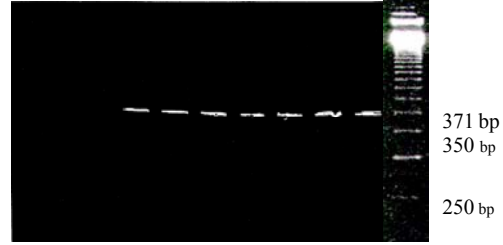
Çalışma, RT-PCR Yang ve ark.(1992)'ye göre yapılmıştır. PCR koşullarında optimizasyon yapma gerekliliği oluşmamıştır.

RT-PCR ürünleri dikey %6'lık poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülmüştür. Biyolojik testlemede pozitif reaksiyon veren CEV ırkları (ST-1, 805, 811, 819, 822) ile sürgün ucu aşılama geçmiş Hamlin/B ve domates bitkisi RT-PCR sonucu 371bp büyüklüğünde tek bant oluşturmuştur. Negatif bitkide ve diğer turunçgil örnekleri ile hıyarda bant oluşmamıştır (Şekil 2.).

Hastalık oluşturma virulensliği farklı olan CEV ırklarında bant uzunluğu bakımından farklılık oluşmamıştır. Önelge

(1997), RT-PCR'da CEV'nin Etrog citronda ve *Gynura aurantiaca* D.C.'da hastalık oluşturan CEV ırkının 371 bp bant oluşturduğunu ancak yapılan sequence analiz karşılaştırmasında nükleotid farklılığının bulunduğunu ve bu farklılığında patojenite durumunu etkileyebileceğini belirtmiştir.

RT-PCR'da oluşan bant uzunluğunun (371 bp) CEV'nin tüm nükleotid uzunluğuna eşit olduğu Yang ve ark. (1992) tarafından belirlendiği gibi bu çalışmada da görülmüştür. Bu çalışmada, patojenin CEV olduğunu ve aynı nükleotid uzunluğunda olduğunu göstermiştir.



Şekil 2. RT-PCR ürünlerinin %6'lık Poliakrilamid Jel Elektroforezde Ayrıştırılması Sonucu Oluşan cDNA Bantı (Ethidium Bromid ile boyanarak).

3.3.Dot-Blot Hibridizasyon

Dot -blot hibridizasyon birçok virus hastalığının tanımlanmasında, virus-vektör ilişkisine yönelik çalışmalarda ve hastalık epidemiyoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Harper ve Creamer, 1995; Flores, 1988)

Nükleik asit hibridizasyonunda probe işaretlemeye radioaktif bir madde olan ³²P uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak daha sonraları sağlığa zararsız ve daha az laboratuvar alt yapısı gerektiren Biotin tanı kitleri geliştirilmiş ve reaksiyon renk değişimine göre takip edilmiştir (Eweida ve ark. 1989).

Bu çalışmada, Biotin-ULS kiti probe işaretlemesinde kullanılmıştır. Nytran membran üzerine her örnekten 25µl damlatılmıştır. ST-1 örneğinden ise 25, 15 ve 10µl olacak şekilde 3 damlatma yapılmıştır.

Probe olarak, ST-1 örneğinin

cDNA'sı kullanılmıştır. Probe işaretlemeye inkubasyon 85°C'de 30 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Probe işaretleme sıcaklığının ve süresinin optimizasyonu Belkum ve ark. (1992) tarafından bildirildiği gibi yapılmıştır.

Dot-blot çalışmasında, Hamlin/B, 811, 819, 822, 805, ST-1 (üç farklı miktarda) de mavi renkli reaksiyonlar oluşmuştur. Negatif örnekte ve diğer örneklerde renk değişimi oluşmamıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Biotin-ULS ile Probe İşaretlemesi Yapılan CEV Dot-Blot Hibridizasyon Sonucu.

Domates örneğinde ise probe bağlanması gerçekleşmemiştir. Domates örneğindeki doku farklılığından gelen bir takım maddelerin probe bağlanmasında engelleyici rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Belkum ve ark. (1992) farklı insan dokularında yaptıkları Biotin-ULS dot blot çalışmasında doku farklılığından kaynaklanan probe-örnek hibridizasyonunda sorunların olabileceğini bildirmişlerdir.

ST-1 örneğinin 25µl'si diğer iki miktara göre daha net mavilik oluşturmuştur. Renk tonları arasındaki farklılık probe ile hibridize olan CEV miktarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar biyolojik testleme ve RT-PCR ile (domates örneği dışında) uyumlu olmasına karşılık CEV'ye özel problemlerin oluşturulması CEV'ye özelleşmeyi arttıracığından geniş alanlarda survey çalışmalarında kolaylık ve güvenilirlik sağlayacaktır.

4.Sonuç

Mekanik ve aşı gözü ile taşınabilen turunçgil exocortis viroidi, turunçgillerde ağaç ömrünü kısaltmakta, verim kaybına ve meyve kalitesine olumsuz etkide bulunmaktadır. Hastalığın, hızlı ve güvenilir olarak kısa sürede tanılanması hastalık kontrolünde, bölgedeki durumunun takibinde oldukça önemlidir.

Hastalığın biyolojik testlemesi Türkiye Turunçgil Çeşit Geliştirme Programında yürütülmektedir. Ancak bu çalışma ile RT-PCR ve Biotin-ULS dot-blot hibridizasyonu ile da yapılabileceği ortaya konulmuştur. Hibridizasyon çalışmalarında eğer spesifik problemler oluşturulursa hastalık survey çalışmalarında güvenilir ve kısa sürede sonuç alınabileceği için RT-PCR tekniğine göre daha yaygın kullanılabilir. RT-PCR çalışmalarının ilk alt yapı oluşturulması pahalı olmakla birlikte, erken tanı zaman kazandıracığı ve alan konusunda avantaj sağlayacağı için ekonomik olabileceği göz önünde bulundurulabilir. Ayrıca çalışma kitlerinde örnek sayısının fazla olması rutin uygulamalarda daha fazla avantaj sağlayacaktır.

Turunçgil exocortis viroidinde kullanılan RT-PCR ve Biotin-ULS dot blot hibridizasyonunun diğer turunçgil viroidlerinde de kullanılabilmesi Turunçgillerde virus ve virus benzeri hastalıklardan temiz aşı gözü üretim amaçlı Çeşit geliştirme programlarının başarısını daha da arttıracaktır.

Kaynaklar

- Albanese, G., Rosa, R., Davino, M., Hammond, W.R., Smith, D.R., Diener, T.O., 1988. A Viroid Different From Citrus Exocortis Viroid Found in Commercial Citrus in Sicily. 10th Conf. IOCV. Riverside, 165-172.
- Baksh, N., Lee, R.F. ve Garnsey, S.M., 1982. Detection of citrus exocortis viroid from citron by polyacrylamide gel electrophoresis. *Phytopathology* 72 : 354. (Abstr.).
- Belkum, A., Linkels, E., Jelsma, T., Houthoff, H.J., Berg, F. and Quint, W., 1993. Application of a new, universal DNA labeling system in the PCR mediated diagnoses of *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus type 16 infection in cervical smears. *Journal of*

- Virological Methods. 45 : 189-200.
- Boccardo, G., Rosa, R., and Catara, A. 1984. Detection of citrus exocortis viroid by polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acid extracts from glasshouse citrus. 9th Conf. IOCV. Riverside, 357-361.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S. ve Sas, G., 1993. Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean Region of Türkiye. Proceeding 12th IOCV conference, Riverside 1993, USA, 397-400.
- Eweida, M., Sit, T.L., Sira, S. and Abou Haidar, M.G., 1989. Highly sensitive and specific non-radioactive biotinylated probes for dot-blot, Southern and colony hybridizations. Journal of Virological Methods, 26 : 35-44.
- Flores, R. 1988. Detection of citrus exocortis viroid in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. Tenth IOCV Conference. 192-196.
- Fonseca, M.E.N., 1993. French marigold (*Tagetes patula*) : A new experimental host of citrus exocortis viroid. Brazil. Plant Dis. 77 : 953.
- Fudl-Allah, A.E., Sims, J.J. and Calavan, E.C., 1974. Indexing of exocortis virus-infected citron by using thin-layer chromatography. Plant Dis. Rep. 58 : 82-85.
- Garnsey, S. M. and Jones, J. W., 1967. Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. Plant Dis. Rep. 51: 410-413.
- Gillings, M.R., Broadbent, P. and Gollnow, B.I., 1988. Biochemical Indexing for Citrus Exocortis Viroid. 10th Conf. IOCV. Riverside, 178-186.
- Hadidi, A. and Yang, X., 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. J. Virol. Meth. 30:261-270.
- Harper, K. and Creamer, R., 1995. Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. The American Phytopathological Society. 563-567.
- Macquaire, G. Candresse, T. and Dunez, J., 1994. Detection of plant viruses and viroids by molecular hybridization. Handbook for detection and Diagnosis. FAO, Rome, 217-231.
- Moreira, S. 1965. Report to government of Turkey on virus diseases of citrus. FAO Report No: 1982, 19 pp Rome.
- Norman, P. A., 1963. Report to government of Turkey on virus diseases of citrus. FAO Report No: 1641, 16 pp, Rome.
- Önelge, N., 1997. Direct nucleotide sequencing of citrus exocortis viroid (CEV). Turk. J. Agric. For., 21: 419-422.
- Özaslan M. and Çınar., A., 1990. The Detection Of Citrus Exocortis Viroid By Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J.Türk. Phytopath. Vol.19. No. 2, 41-52
- Rivera-Bustamente, R., Gın, R. and Semancık, J.S., 1986. Enchanged resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by elektrophoresis in a discontinuous pH system. Anal. Bioch. 156, 91-95.
- Robertson, N.L., French, R., and Gray, S.M. 1991. Use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. J. Gen. Virol. 72: 1473-1477.
- Roistacher, C.N., Navarro, L. and Murashige, T., 1978. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid and *Sitroplasma citri* by shoot-tip grafting in vitro Conf. 7th. Int. Org. Citrus Virol. 186-189.
- Rybicki, E., and Hughes, F.L., 1990. Detection and typing of maize streak vitur and other distantly related geminiviruses of grasses by polymerase chain reaction amplification of a conserved viral sequence. J. Gen. Virol. 71:2519-2526
- Semancık, J.S. and Weathers L.G., 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants. Nature New biology 237 : 242-244.
- Semancık, J.S., 1987. Citrus exocortis viroid. Nature and Structure. A Seminer Hold in I.C.A. M.A.S. BARI / ITALY seminer notes photocopied in BARI from J.S. Semancık, pp. 25.
- Semancık, J.S., C.N.Roistacher, N.Duran-Villa. 1988. A New Viroid is The Causal Agent of Citrus Cachexia Disease. In Proc. 10th Conf. IOCV. Riverside, 125-136.
- Semancık, J.S., 1991. Viroid Purification and Characterization. In Roistacher, C.N., ed. Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for detection and Diagnosis. FAO. Rome, 233-349.
- Wallace, J. M., 1978. Virus and viruslike diseases, p. 67-184. In W. Reuther et al. (eds.) the Citrus Industry, Vol.IV, Univ. Calif., Div. Agric. Sci., Berkeley.
- Wutscher, H. K. and Shull, A. V., 1975. Machine-hedging of citrus trees and transmission of exocortis and xyloporosis viruses. Plant Dis. Rep. 59 : 368-369.
- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S.M., 1992. Enzymatic cDNA Amplification of Citrus Exocortis ve Cachexia Viroids From Infected Citrus Hosts. Phytopathology 82: 279-285.