



Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu*

Ruşen KIŞLAK⁽¹⁾

Nüket ÖNELGE⁽²⁾

Özet

Çalışma domates bitkisinde *Pospiviroid* cinsi viroidlerin varlığının araştırılması için yürütülmüştür. 2014-2015 arasında, 400 adet domates tohum, fide ile yaprak örneği toplanmış ve total nükleik asit ekstraktları elde edilmiştir. Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE primerleri ile yürütülen RT-PCR çalışmalarında, 398 adet domates örneğinin bir viroidle bulaşık olmadığı görülmüştür. "Çeri" çeşidi iki domates örneğinin ise *Citrus exocortis viroid* (CEVd) etmeni ile bulaşık olduğu, CEVd-FW/RE primer çifti ile belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında bu örneklere ait 371 bp'lik DNA bantları görüntülenmiş ve CEVd ile enfekteli izolatlar moleküler açıdan da karakterize edilmiştir. Nükleotid dizilimi analizi sonuçları NCBI gen bankasına bildirilen domates, turunçgil ve diğer izolatlara %89-98 sekans benzerliği göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Viroid, domates, *Pospiviroid*, RT-PCR, mekanik inokulasyon.

Investigation and Molecular Characterization of Viroid Agents Existence at *Pospiviroid* Genus on Tomato Plant

Abstract

Study was conducted to investigate viroids' existence at *Pospiviroid* genus on tomato plant. Between 2014-2015, 400 tomato seeds, seedlings and leaves samples were collected and total nucleic acid extracts of samples were obtained. In RT-PCR studies which were carried out by Posp1-FW/RE and Vid-FW/RE primer sets, any viroid infection was detected in 398 tomato samples. Two tomato samples on "Çeri" cultivar, found infected with *Citrus exocortis viroid* (CEVd) by CEVd-FW/RE primer pair. 371 bp of DNA bands were shown belong to samples in agarose gel electrophoresis studies. CEVd infected isolates were also characterized molecularly. Nucleotid alignments analysis showed %89-98 sequence similarity to some tomato, citrus and other isolates reported to NCBI Genbank database.

Keywords: Viroid, tomato, *Pospiviroid*, RT-PCR, mechanical inoculation.

Giriş

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Solanales takımının Solanaceae familyasının *Lycopersicon* cinsine bağlı, ılıman iklimlerde tek yıllık, tropikal bölgelerde ise çok yıllık bir bitkidir (Şeniz, 1992).

Domates dünyada en fazla yetiştirilmekte olan sebze türlerinden birisidir. Dünyada toplam 4 751 530 hektar alandan, 156 477 012 ton domates üretilmektedir. Dünya domates üretimi ülkeler sıralamasına bakıldığında 50 552 200 ton üretim ile Çin birinci sırayı almaktadır. Bu sırayı 18 227 000 ton üretim ile

Hindistan, 12 574 550 ton üretim ile ABD, 11 820 000 ton üretim ile Türkiye ve 8 533 803 ton üretim ile Mısır takip etmektedir (FAO, 2013).

Domates üretimindeki mevcut rakamlarla Türkiye, dünyada 4. sıradadır (FAO, 2013).

Kültür domatesi yetiştiriciliğinde fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu bitkide hastalık oluşturan önemli bir patojen grubu da sub-viral etmenler olarak bilinen viroidlerdir.

Viroidler çok sayıda tarımsal üründe önemli düzeyde ürün kayıplarına neden

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 02.09.2016

*Yüksek Lisans Tezi

(1) T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Mersin Ziraat Karantina Müdürlüğü, Yenişehir/MERSİN

(2) Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sarıçam/ADANA

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

olabilen, dairesel, tek zincirli formda ve RNA molekülü yapısındaki etmenlerdir (Diener, 1987).

Nükleotid (baz) dizilimi benzerliklerine dayalı yapılan son taksonomik çalışmalarda, viroidler "*Pospiviroidae*" ve "*Avsunviroidae*" familyalarına ayrılmıştır (Flores ve ark., 2005).

Günümüzde dünya çapında yapılan çeşitli çalışmalarla, bu iki familyaya dahil yaklaşık 30'un üzerinde viroid etmeni birçok kültür bitkisinde saptanmış durumdadır (Flores ve ark., 2011).

Özellikle de Solanaceae familyasında hastalıklara neden olan, *Pospiviroidae* familyası *Pospiviroid* cinsi içerisinde 10 adet viroid türü bulunmaktadır. *Pospiviroid* cinsi viroidlerin benzer semptomlar ve oluşan verim kayıplarıyla, domates bitkilerinde çeşitli enfeksiyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir (Mongera ve ark., 2010).

Pospiviroid cinsine ait türlerden *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (Leontyeva, 1980; Puchta ve ark., 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), (Walter ve ark., 1980; Walter, 1987), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), (Galindo ve ark., 1982), *Columnnea latent viroid* (CLVd), (Hammond ve ark., 1989; Singh ve ark., 1992), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), (Mishra ve ark., 1991; Fagoaga ve Duran-Vila, 1996), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), (Singh ve ark., 1999), *Mexican papita viroid* (MPVd), (Ling ve ark., 2008) ve son olarak da *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), (Reanwarakorn ve ark., 2011) etmenlerinin domates bitkilerinde çeşitli hastalıkların oluşumlarına sebebiyet verdiği bilinmektedir.

Viroid enfeksiyonları nedeni ile domates bitkilerinde değişen oranlarda meydana gelen verim kayıplarının ve bazen de bitkilerin ölümü ile sonuçlanan durumların ortaya çıkabildiği bilinmektedir.

Domates bitkisi ve Solanaceae familyası bitkilerinde hastalık oluşturan viroid etmenleri ile ilgili dünya genelinde yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Ülkemizde viroid etmenleri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcut olmakla birlikte,

özellikle domates bitkilerini kapsayan detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma domates bitkilerinde hastalık oluşturduğu bilinen *Pospiviroid* cinsi viroid etmenlerinden PSTVd, CEVd, TASVd, TCDVd etmenlerinin 2014 ile 2015 yıllarında toplanan domates tohum, fide ve yaprak örneklerindeki varlığının araştırılması amacı ile moleküler yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bitkisel Materyal

Çukurova Bölgesinde yapılan çalışmanın tüm bitkisel materyallerini; çeşitli sörvey çalışmaları, fide firmalarına yapılan ziyaretler ve tohum firmaları aracılığı ile toplamda 400 adet olmak üzere elde edilen domates bitkilerine ait yerli ve ticari çeşitleri içeren tohum, fide ve yaprak örnekleri oluşturmuştur.

Tohum örnekleri yerli ve ticari çeşit tohumlar olarak ayrılmakla birlikte, bu çalışma için toplam 150 çeşit tohum örneği toplanmıştır. Yerli domates tohumları Türkiye'de yetiştirilen farklı bölge çeşitlerini temsil edecek şekilde toplanan, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. H. Yıldız Daşgan'a ait yerli domates tohum koleksiyonundan temin edilmiştir. Ticari domates tohumları ise bölgemiz illeri ve farklı illerdeki tohum firmalarından temin edilmiştir. Domates bitkilerine ait 250 adet fide ve yaprak örneği ise Adana ile Mersin illerinde bulunan bazı üretici seralarından ve ticari üretim yapılan çeşitli seralardan temin edilmiştir.

Moleküler Çalışmalarda Materyal

Gerçekleştirilen total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmalarında hassas terazi, CTAB tamponu çözeltisi, havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, %2'lik NaClO, kurutma kağıdı, 1.5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, rak, su banyosu, derin dondurucu, karıştırıcı, santrifüj cihazı, kloroform:izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi ve saf su cihazı kullanılmıştır.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

RT-PCR çalışmalarında total nükleik asit örnekleri, primerler, dNTP, ddH₂O, 5X tamponu çözeltisi, DTT, ters transkriptaz (RT) enzimi, Taq polimeraz enzimini içeren GoTaq karışımı, pipet ve pipet uçları, PCR tüpleri, karıştırıcı, santrifüj cihazı ve thermal cycler kullanılmıştır.

Elektroforez çalışmalarında 1X TAE tamponu çözeltisi, agaroz, elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 100 bp'lik DNA markör kullanılmıştır.

Örneklerin görüntülenmesi aşamasında ise UV transillüminatör cihazı ve saf suyla seyreltilmiş etidyum bromür kullanılmıştır.

Yöntem

Domates Bitkisine Ait Örneklerin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan 50 domates çeşidine ait tüm yerli tohumlar, 1:1 oranındaki perlit ve torf karışımı hazırlandıktan sonra 9x5'lik plastik vıyollere ekilmiştir. Bitkiler tohum ekiminden 20-21 gün sonra 8-10 cm uzunluğa ulaştıncaya, her bitkiden 2-3 gram yaprak örneği alınıp buz kutuları içindeki plastik torbalarda Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarına getirilmiştir. Tohumların ekim aşamaları ve çeşitli diğer tüm bakım işlemleri çalışma tamamlanıncaya kadar Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait plastik seralarda yürütülmüştür.

Adana, Mersin ve Antalya ile diğer bazı illerdeki tohum firmaları aracılığıyla ve doğrudan satın alım yapılarak temin edilen 100 çeşit ticari domates tohum örneği, kurutma kağıtları ve cam petri kapları gibi materyaller kullanılarak çimlendirme kabinlerinde çimlendirilmiş ve bu bitkiler 9-10 gün sonra 5-6 cm uzunluğa ulaştıncaya 1:1 oranında hazırlanmış perlit:torf karışımı içeren vıyollere şaşırtılmıştır.

Şaşırtma işleminden sonra 12-14 cm uzunluğa ulaşan bitkilerin farklı kısımlarından birer gram örnek alınarak ekstraksiyon aşamalarında kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılmak üzere toplanılan domates bitkisine ait fide ve yaprak örnekleri, Adana ve Mersin illerindeki ticari üretim yapan fide üretim tesisleri ile üretici seralarından toplam 250 adet örnek içerecek şekilde elde edilmiştir.

Fide örnekleri, araştırılan viroidlerin karakteristik bazı hastalık belirtilerini sergileme durumlarına göre güdümlü örnekleme yöntemi ile toplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmaları

CTAB temelli total nükleik asit ekstraksiyonu için, Murray ve Thompson'un (1980) tanımladığı yöntem kullanılmıştır. Domates bitkisine ait örneklerin kullanıldığı total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarında yürütülmüştür.

RT-PCR ve Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR çalışmaları Önelge (1997)'e göre iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada viroid RNA'sı tamamlayıcı DNA'ya çevrilmiş daha sonra PCR çalışmasına alınmıştır.

Gerçekleştirilen tüm PCR çalışmalarında pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarında kullanılan etmenlere özgü primerler Çizelge 1'de verilmiştir.

Elektroforez çalışmalarında cDNA'ların (viroid bandları) görüntülenmesi %2'lik agaroz jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin çeşitli bazı aşamaları ise Önelge (1997)'e göre modifiye edilmiştir.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 1. Araştırılan viroid etmenlerini belirlemede kullanılan çeşitli primer çiftleri (Önelge, 1997; Verhoeven ve ark., 2004).

Primer Çiftleri	Sekans Dizilimi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge (bp)
Pospil-FW	GGGATCCCCGGGAAAC	59-62 °C	86-102 bp
Pospil-RE	AGCTTCAGTTGT(T/A)TCCACCGGT	59-62 °C	261-283 bp
Vid-FW	TTCTCGGAATAAACTCGTG	58-60 °C	16-355 bp
Vid-RE	CCAACTGCGGTTCCAAGGG	58-60 °C	336-354 bp
CEVd-FW	GTGCTCACCTGACCCTGCAGG	58 °C	371 bp
CEVd-RE	ACCACAGGAACCTCAAGAAAG	58 °C	371 bp

Sekans Analizleri ve Verilerin Karşılaştırılması

RT-PCR ve agaroz jel elektroforezi sonucunda bulaşık bulunan örnekler, saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacı ile Adana ilindeki "Molgentek" firmasına gönderilmiştir.

Sekanslama işlemleri tamamlanan bulaşık domates örneklerinin mevcut baz dizilimleri "Finch TV" programı aracılığıyla görüntülenip, NCBI gen bankasında yer alan bazı verilerle "BLAST" yönteminde karşılaştırılmıştır.

Yapılan filogenetik analiz çalışmalarında ise bulaşık domates örneklerine ait DNA dizileri, "Mega 6" programı ile "Neighbour Joining" yönteminde sınıflandırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma Domates Tohum Örneklerinin Testlenmesi

50 çeşidi içeren yerli ve 100 çeşidi içeren ticari domates tohum örneklerinin tamamı PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından Pospil-FW/RE ve Vid-FW/RE primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004) ile RT-PCR yöntemi kullanılarak testlenmiştir.

Sonuçta bu çalışma amacı doğrultusunda testlenen domates tohum örneklerinin tümünün araştırılan viroid etmenleri açısından sağlıklı oldukları görülmüştür.

Testlenen domates tohumu örneklerinde araştırılan viroid etmenlerinin tespit edilmemesi olumlu bir sonuçtur ama bu durum ülkemizdeki domates bitkilerine ait tohumluk materyalin tümüyle temiz olduğu anlamını taşımamaktadır. Çok daha fazla sayıda tohum örneğinin rutin olacak şekilde testlenmesinin sürdürülmesi ile daha belirgin bazı sonuçların elde edileceği öngörülmektedir.

Domates Fide ve Yaprak Örneklerinin Testlenmesi

Yerli ve ticari çeşitleri içeren 250 adet domates bitkisine ait fide ve yaprak örneklerinin tamamı PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd açısından Pospil-FW/RE ve Vid-FW/RE primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004) ile RT-PCR yöntemi kullanılarak testlenmiştir.

Sonuçta testlenen 248 örnekte araştırılan viroid etmenleri açısından bir bulaşıklık durumu tespit edilmemiş ancak saksılı bir şekilde temin edilen "Çeri" çeşidi iki domates örneğinde ise CEVd etmeni ile bulaşıklık saptanmıştır.

2015 yılında yürütülen çeşitli sörveyler ile Adana ilinin Yüreğir ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden temin edilen bitkilerden Nisan ayında alınan bitki Örnek-1, Haziran ayında alınan bitki ise Örnek-2 olarak isimlendirilmiştir.

"Çeri" çeşidi domates örneklerinde küçük boyutta ve kıvrık yaprak yapılarının görülmesi, bitkilerin özellikle tepe kısımlarında kümeleşme oluşumları ve boğum aralarının kısılması belirtilenlerle bitkilerdeki genel gelişim geriliği ve bodurluk gibi belirtilerin (Şekil 1) gözlemlenmesi mevcut domates örneklerinin CEVd etmeni ile bulaşık durumda olabileceğini düşündürmüştür.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Simptomolojik bazı gözlemlerin ardından yapılan RT-PCR çalışmasında CEVd etmenine özgü CEVd-FW/RE primer çifti (Önelge, 1997) kullanılarak, Örnek-1 ve Örnek-2 domates bitkilerinin CEVd etmeni ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. PCR düzeninin CEVd-FW/RE

Çalışmada CEVd etmeni ile bulaşık olan örneklerin oluşturduğu bant uzunluklarının, pozitif kontrol örnekleri ile aynı seviyelerde olduğu da görülmüştür.

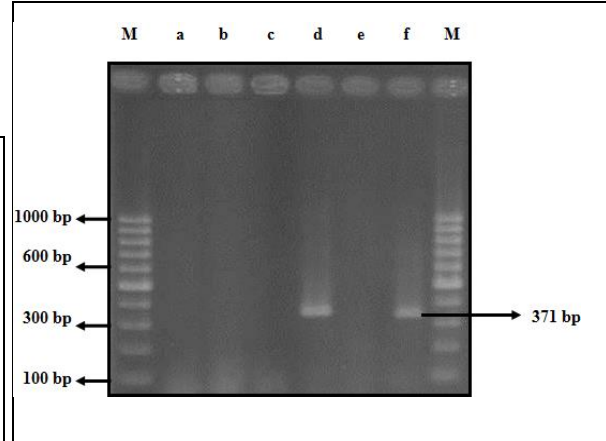


Şekil 1. Örnek-1 bitkisinde gelişim geriliği, boğum aralarının kısalığı ve bitkinin bodur bir yapıya sahip olması

Örnek-1 izolatu ile NCBI veri tabanında yürütülen çalışmalara göre karşılaştırılan ilk 100 CEVd izolatu içinde Örnek-1 izolatu, NCBI veri tabanında kayıtlı CEVd izolatlarına %91'den %98'e varan çeşitli oranlarda sekans benzerliği göstermiştir. Veriler incelendiğinde Örnek-1 izolatına sekans benzerliği gösteren birçok CEVd izolatının "*Citrus*" cinsine dahil bazı türlerden bildirildiği görülmüştür.

Örnek-1'e en yüksek oranda sekans benzerliği gösteren ve mevcut bu benzerlik

primer çiftinin uygun bağlanma sıcaklığı olan 58 °C sıcaklık koşullarına göre modifiye edildiği çalışmalarda, mevcut domates örneklerine ait 371 bp'lik DNA bantları agaroz jel üzerinde (Şekil 2) görüntülenmiştir.



Şekil 2. RT-PCR ile testlenen Örnek-1 domates bitkisine ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.

M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril su), d: Örnek-1, f: Pozitif kontrol (CEVd)

oranının da %97 ile %98 olduğu ilk beş CEVd izolatının mandarin (*C. reticulata*), portakal (*C. sinensis*) ve greyfurt (*C. paradisi*) türlerinden bildirildiği görülmüştür. Domates bitkilerinde bazı doğal enfeksiyonlara sebep oldukları bildirilen CEVd izolatları ise Örnek-1 izolatına %89-92 arasında değişen oranlarda sekans benzerliği sergilemiştir (Çizelge 2).

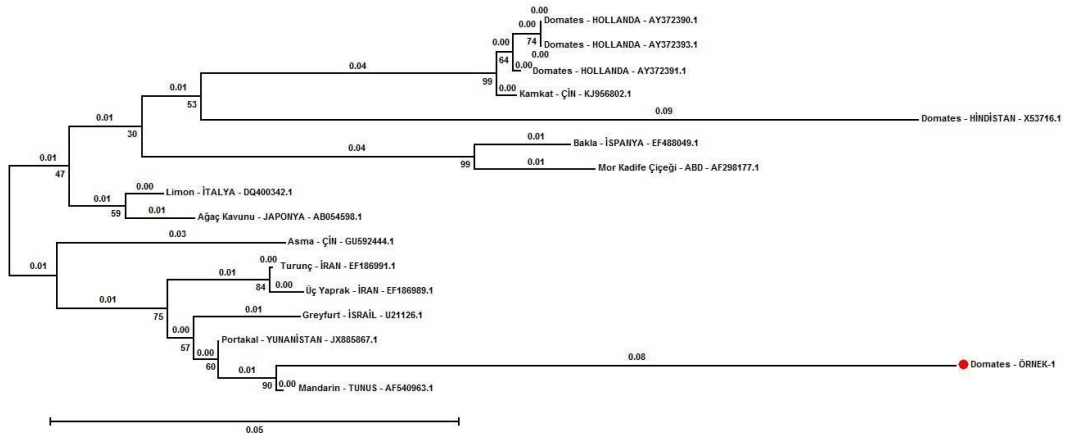
Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 2. Örnek-1 ile CEVd varyantlarının NCBI veri tabanında karşılaştırılması

Varyant Adı	Erişim Numarası	Konukçu Bitki Türü	Bildirilen Ülke	Benzerlik Oranı (%)
CEVd-tun/c14	AF540963.1	Mandarin (<i>C. reticulata</i>)	Tunus	%98
EK4-CEVd	JX885867.1	Portakal (<i>C. sinensis</i>)	Yunanistan	%97
BSE	EF186991.1	Turunç (<i>C. aurantium</i>)	İran	%96
CEVd-225	U21126.1	Greyfurt (<i>C. paradisi</i>)	İsrail	%96
LMPE3	EF186989.1	Üç Yaprak (<i>P. trifoliata</i>)	İran	%96
Variant KA	AB054598.1	Ağaç Kavunu (<i>C. medica</i>)	Japonya	%95
ISA 8-NA-1	DQ400342.1	Limon (<i>C. limon</i>)	İtalya	%94
CEVd-4-20	EF488049.1	Bakla (<i>Vicia faba</i>)	İspanya	%94
Hb-G1	GU592444.1	Asma (<i>Vitis vinifera</i>)	Çin	%94
CEVd-S	AF298177.1	Mor Kadife Çiçeği (<i>G. aurantiaca</i>)	ABD	%93
CEVd 2	KJ956802.1	Kamkat (<i>C. japonica</i>)	Çin	%93
8900808	AY372390.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%92
89002600	AY372393.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%92
89002594	AY372391.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%91
CEVd-4	X53716.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hindistan	%89

Şekil 3'teki soyağacında Örnek-1 izolatu kendisine %96-98 arasında değişen oranlarda sekans benzerlikleri sergileyen AF540963, X885867, U21126, EF186989 ve EF986991 izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Bu grup çeşitli turunçgil türlerinden bildirilen izolatlar olmakla birlikte Tunus, Yunanistan, İsrail ve İran izolatlarından oluşmuştur. Örnek-1'e %89-

92 arasında değişen çeşitli bazı oranlarla sekans benzerliği sergileyen ve domates bitkilerinden bildirilmiş olan Hollanda (AY372390, AY372391, AY372393) ile Hindistan (X53716) izolatları ise aynı grupta ve farklı dallarda yer almıştır.



Şekil 3. Örnek-1 izolatu ile CEVd varyantlarının filogenetik yakınlıklarını gösteren soyağacı (Kimura 2-Parametre Modeli, Bootstrap Değeri: 1000 Tekrar)

Sonuçlar

Yürütülen bu çalışmanın sonucunda CEVd etmeni ile bulaşık oldukları belirlenen domates bitkilerinde, CEVd'inin 371 nükleotid uzunluğuna sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuç, CEVd etmeninin saptanan nükleotid uzunluğu bakımından mevcut literatür bilgileri ve dünyada yapılmış çeşitli çalışmalarla uygunluk içerisinde olduğunu göstermektedir.

CEVd ile bulaşık domates örneklerinin alındığı ticari işletmede süs bitkileri, bazı sebze fideleri ve çeşitli meyve fidanlarının da satışı gerçekleştirilmektedir.

Kaynaklar

- Bora, T., Karaca, İ. (1970) Bitki hastalıklarının sürveyi: *Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi*. 167:8-43, Ege Üni. Matbaası, İzmir.
- Diener, T. O. (1987) *The Viroids*. Plenum Publishing Corporation, USA.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N. (1996) Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetables. *Plant Path.* 45:45-53.
- FAO (2013) Faostat Agricultural Database. www.faostat.org. Accessed: 17.02.2015.
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., Diener, T. O. (2005) A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143(3):623-629.
- Flores, R., Grubb, D., Elleuch, A., Nohales, M. A., Delgado, S., Gago, S. (2011) Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: *Variations on a Theme*.
- Galindo, J., Smith, D. R., Diener, T. O. (1982) Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopatology* 72:49-54.
- Hammond, R. W., Smith, D. R., Diener, T. O. (1989) Nucleotid sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid* (CLVd): A natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17:10083-10094.
- Leontyeva, J. A. (1980) Tomatoes and *Potato spindle tuber viroid*. *Zashc. Raste.* 8: 22.
- Ling, K. S., Bledsoe, M. E. (2008) First report of *Mexican papita viroid* (MPVd) infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease* 93(8):839.
- Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R., Diener, T. O. (1991) Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid*. *J. Gen. Virol.* 72:1-5.
- Mongera, W., Tomlinsona, J., Boonhama, N., Marnb, M. V., Pleskob, I. M., Molinero-Demillyc, V., Tassus, X., Meekesd, E., Toonend, M., Papayiannise, L. (2010) Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods* 169:207-210.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8(19):4321-4325.
- Önelge, N. (1997) Direct nucleotide sequencing of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *Turk. J. Agric. For.* 21:419-422.
- Puchta, H., Herold, T., Verhoeven, K., Roenhorst, A., Ramm, K., Schmidt-Puchta, W., Sanger, H. L. (1990) A new strain of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) exhibits major sequence differences as compared to all other strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology* 15:509-511.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S., Porsoongnurn, J. (2011) First report of natural infection

Domates Bitkisinde Pospiviroid Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

- of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Dis. Rep.* 24:6.
- Singh, R. P., Boucher, A., Somerville, T. H. (1992) Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Dis.* 76(9):951-953.
- Singh, R. P., Nie, X., Singh, M. (1999) *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd): An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J.Gen. Virol.* 80:2823-2828.
- Şeniz, V. (1992) Domates, Biber ve Patlıcan Yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, İstanbul.
- Verhoeven, J. TH. J., Jansen, C. C. C., Willems, T. M., Kox, L. F. F., Owens, R. A., Roenhorst, J. W. (2004) Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:823-831.
- Walter, B., Thouvenal, J. C., Fauquet, C. (1980) Les virus de la tomate en Cote d'Ivoire. *Annales de Phytopathologie* 12:259-275.
- Walter, B. (1987) Tomato apical stunt: *The Viroids*. T. O. Diener (Ed.), 321-328, Plenum Publishing Corporation, USA.