

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
2016-YL-013**

**İNCİR MOZAIK HASTALIK ETMENLERİNİN  
BAZI VEKTÖRLER İLE TAŞINMASININ  
BELİRLENMESİ**

**HAZIRLAYAN  
Sevdiye YORGANCI**

**TEZ DANIŞMANI:  
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

**AYDIN-2016**



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sevdıye YORGANCI tarafından hazırlanan “İncir Mozaik Hastalık Etmenlerinin Bazı Vektörler ile Taşınmasının Belirlenmesi” başlıklı tez, 20.01.2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı,	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ	.....
Üye :	Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU	ÇÜ	.....
Üye :	Prof. Dr. Tülin AKŞİT	ADÜ	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../2016

Sevdiye YORGANCI



## ÖZET

### İNCİR MOZAİK HASTALIK ETMENLERİNİN BAZI VEKTÖRLER İLE TAŞINMASININ BELİRLENMESİ

Sevdiye YORGANCI

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2016, 35 sayfa

İncir üretimi yapılan alanlarda karşılaşılan problemler içerisinde en önemlilerinden birisi İncir mozaik hastalığıdır. İncir mozaik hastalığına neden olan 12 viral ve 2 viroidal olmak üzere toplam 14 etmen; *Fig leaf mottle-associated virüs 1-2* (FLMaV 1-2) *Fig mosaic virüs* (FMV) *Fig mosaic associated virus 1-2* (FMaV 1-2) *Fig latent virüs-1* (FLV-1) *Fig mild mottle associated virüs* (FMMaV) *Fig cryptic virüs* (FCV) *Fig badnavirüs-1* (FBV-1) *Arkansas fig closterovirüs 1-2* (AFCV 1-2) *Fig fleck-associated virüs* (FFkaV) Hop stunt viroid (HSVd) Citrus exocortis viroid (CEVd) belirlenmiştir. Ülkemizde yaygın olduğu belirlenen *Fig mosaic virüs* (FMV)'ünün *Aceria ficus* Cotte. tarafından incirden incire ve *Catharanthus roseus* bitkisine taşındığı saptanmıştır. *Ceroplastes rusci* L. 'nin ise FLMaV-1 ve FLMaV-2'yi taşımadığı belirlenmiştir. *A. ficus* ve *C. rusci*'nin İncir mozaik hastalığına neden olan virüs etmenlerini taşıma konusu bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla İncir mozaik hastalığının simptomlarını gösteren bitkilerden alınan *C. rusci* ve *A. ficus* bireyleri sağlıklı incir çöğürlerine aktarılmış ve takiben yapraklarda deformasyon ve damarlarda renk açılmaları gözlenmiştir. Virüs belirtisi gösteren ve üzerinde vektör bireyleri barındıran enfekteli bitki yapraklarından, taşıma sonrası belirti gösteren bitki yapraklarından ve *A. ficus* ile *C. rusci* bireylerinden elde edilen total nükleik asitler kullanılarak 12 incir virüs etmenine özgü primer çiftleriyle RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Ana bitkilerinin FLMaV-1, FMV ve FMaV-1 ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. İki yıl ve iki tekerrürlü olarak yapılan taşıma sonrası *C. rusci* aktarılan bitki yapraklarında ve *C. rusci* bireylerinde FLMaV-1 saptanmıştır. *A. ficus* aktarılan bitkilerde ise FMaV-1 ve FMV belirlenmiştir. Sonuç olarak; *C. rusci*'nin İncir mozaik hastalık etmenlerinden biri olan FLMaV-1'i taşıyan vektör olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İncir mozaik hastalığı, FLMaV-1, FMV, FMaV-1 *Aceria ficus* ve *Ceroplastes rusci*





**ABSTRACT****DETERMINATION OF SOME VECTORS FOR FIG MOSAIC DISEASE AGENTS TRANSMISSION**

Sevdiye YORGANCI

Master Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2016, 35 pages

One of the most important sufficient problems is Fig mosaic disease in the fig production area. A total of 14 viruses have been identified, *Fig leaf mottle-associated virüs 1-2* (FLMaV1-2) *Fig mosaic virüs* (FMV) *Fig mosaic associated virus 1-2* (FMAV 1-2) *Fig latent virüs-1* (FLV-1) *Fig mild mottle associated virüs* (FMMaV) *Fig cryptic virüs* (FCV) *Fig badnavirüs-1* (FBV-1) *Arkansas fig closterovirüs 1-2* (AFCV 1-2) *Fig fleck-associated virüs* (FFkaV) Hop stunt viroid (HSVd) Citrus exocortis viroid (CEVd), which include 12 viral and 2 viroidal agents that cause Fig mosaic disease. *Fig mosaic virus* (FMV), identified as common in our country, was determined to be transmitted by *Aceria ficus* Cotte. from fig to fig and *Catharanthus roseus*. *Ceroplastes rusci* L. wasn't identified as transmitting vector for FLMaV-1 and FLMaV-2. The transmission of the virus agents that caused the fig mosaic disease by *A.ficus* and *C. rusci*, is the objective of this study. For this purpose, *A. ficus* and *C. rusci* individuals which was taken from donor plants that showing Fig mosaic disease symptoms were transferred to healthy fig seedlings and then leaf deformation and vein clearing were observed. Total nucleic acids of donor plants leaves which showing symptoms and contain vector individuals, after transmission plants leaves showing symptoms, *A. ficus* and *C. rusci* individuals were analyzed with RT-PCR using 12 specific primers. The donor plant was determined to be infected with FLMaV-1, FMV and FMAV-1. After two replications transmission on two years, FLMaV-1 was detected on the leaves of the inoculated plants and *C. rusci* individuals. FMV and FMAV-1 were determined from *A. ficus* inoculated plants. As a result; concluded that *C. rusci* is a transmit vector for one of the Fig mosaic disease agents FLMaV-1.

**Key Words:** Fig mosaic disease, FLMaV-1, FMV, FMAV-1 *Aceria ficus* and *Ceroplastes rusci*.



## ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Öğretim Elemanı Yetiştirme Programı tarafından (ÖYP-12032 No'lu Proje) desteklenen bu araştırma, ülkemizde ve dünyada incir üretimi açısından çok önemli paya sahip incir ağaçlarında İncir mozaik hastalığının bazı vektörler ile taşıma çalışmalarına yönelik olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışması süresince büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof.Dr. Serap AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarındaki yardımları ve manevi destekleri ile Sayın Prof.Dr. Tülin AKŞİT ve Prof.Dr. İbrahim ÇAKMAK hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Pozitif kontrollerin temini sağlayan Prof.Dr. Mustafa GÜMÜŞ ve Dr. Toufic ELBEAINO'ya teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve destekleyen annem, babam ve eşim Hüsnü YORGANCI'ya ayrıca gösterdikleri büyük sabırdan dolayı eşime teşekkür ederim. Projemin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan ÖYP fonuna teşekkür ederim.

Sevdiye YORGANCI



## İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xix
EKLER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	10
3.1. Materyal .....	10
3.1.1. Taşıma Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	10
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1. Toprak hazırlığı .....	10
3.2.2. Tohumdan İncir Çöğürlerinin Yetiştirilmesi.....	10
3.2.3. Enfekteli İncir Yaprak Örneklerinin Toplanması.....	11
3.2.4. Taşıma Denemeleri .....	12
3.2.5. Taşıma Sonrası Bitkilerde Simptom Çıktılarının Gözlemlenmesi.....	14
3.2.6. <i>Aceria ficus</i> Cotte. ve <i>Ceroplastes rusci</i> L. Örneklerinin Toplanması.....	14
3.2.7. Viral Etmenlerin Moleküler Tanısı .....	15
3.2.7.1. Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu .....	17
3.2.7.2. RT-PCR Çalışmaları .....	17
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	18

4.1. Örnek Alınan Enfekteli İncir Bitkilerinde Simptomların ve <i>Aceria ficus</i> Cotte. ile <i>Ceroplastes rusci</i> L.' nin Belirlenmesi .....	18
4.2. Taşıma Denemeleri.....	19
4.3. Total Nükleik Asit Miktarları.....	21
4.4. RT-PCR Çalışmaları.....	21
5. SONUÇ .....	25
KAYNAKLAR.....	27
EKLER .....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFCV-1	: <i>Arkansas fig closterovirus-1</i>
AFCV-2	: <i>Arkansas fig closterovirus-2</i>
FBV-1	: <i>Fig badnavirus -1</i>
FCV	: <i>Fig cryptic virus</i>
FLMaV-1	: <i>Fig leaf mottle associated virus-1</i>
FLMaV-2	: <i>Fig leaf mottle associated virus-2</i>
FLV-1	: <i>Fig latent virus-1</i>
FFkaV	: <i>Fig fleck-associated virüs</i>
FMaV-1	: <i>Fig mosaic-associated virus-1</i>
FMaV-2	: <i>Fig mosaic-associated virus-2</i>
FMMaV	: <i>Fig mild mottle associated virüs</i>
FMV	: <i>Fig mosaic virus</i>
°C	:Santigrad derece
2-ME	:2-Merkaptoetanol
Bp	:Base pair
cDNA	:Komplementer Deoksiribonücleikacid
DAS-ELISA	:DAS-Enzim-linked immunosorbent assay
dNTP	:Deoksinükleotidtrifosfat
dsRNA	:Double stranded Ribonücleikacid
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
KOAc	:Potasyumasetat
L	: Litre
M	:Molarite
Mg	:Miligram
ml	:Mililitre

mM	:Milimolar
NaCl	:Sodyum klorür
NaOAc	:Sodyum asetat
PCR	:Polymerase Chain Reaction
pH	:Hidrojen iyonu konsantrasyonu
RNA	:Ribonükleik asit
Rpm	:Dakikadaki devir sayısı
RT	:Reverse transcription
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
Taq	:Taq polimeraz ( <i>Taq</i> Polymerase)
U	:Ünite
UV	:Ultraviyole
V	:Volt
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar



## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. İncir mozaik hastalığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler.....2
- Şekil 3.1. İncir çöğürlerinin yetiştirilmesinde kullanılan tohumlar (A) ve yetiştirilen sağlıklı incir çöğürleri.....11
- Şekil 3.2. Simptom gösteren ve üzerinde *Aceria ficus* Cotte. (A) ve *Ceroplastes rusci* L. (B) bulunan incir yaprakları.....12
- Şekil 3.3. *Aceria ficus* Cotte. taşıma denemelerinde kullanılan yaprak örneği (A) ve taşıma yapılan incir çöğürü (B).....13
- Şekil 3.4. Yaprak örneklerinin stero-binoküler mikroskopta incelenmesi (A) ve sağlıklı çöğürlere *C. rusci* taşıma denemesinin yapılması (B).....14
- Şekil 4.1. İncir mozaik hastalığının mozaik belirtisini gösteren ve *Aceria ficus* cotte. ile bulaşık incir yaprakları.....18
- Şekil 4.2. *Ceroplastes rusci* L.'nin hareketli 1. nimf döneminin stero-binoküler mikroskop görüntüsü (A), bahçelerdeki İncir mozaik hastalığıyla enfekteli ve *Ceroplastes rusci* L. ile bulaşık yaprakları(B).....19
- Şekil 4.3. *Aceria ficus* Cotte. ile taşıma yapılan bitkilerde ortaya çıkan renk açılmaları (A) ve sararma-damar nekrozu (B) simptomları.....20
- Şekil 4.4. *Ceroplastes rusci* L. ile taşıma yapılan bitkilerde ortaya çıkan sararma (A) ve damar renk açılmaları (B).....21
- Şekil 4.5. *Aceria ficus* Cotte. ile taşıma sonrası incir çöğür yapraklarından yapılan RT-PCR'ın FMV'e özgü sonuçları, Marker:M; Negatif kontrol:1; FMV: 2,4,8,12; Pozitif kontrol:16.....23
- Şekil 4.6. *Ceroplastes rusci* L. ile yapılan taşıma sonrası incir yapraklarından yapılan RT-PCR'ın FLMaV-1'e sonuçları, Marker:M; Negatif kontrol:1, FLMaV-1 profili: 3,4; 16, Pozitif kontrol.....23
- Şekil 4.7. Taşıma sonrası *Ceroplastes rusci* L. bireylerinden yapılan RT-PCR'ın FLMaV-1'e özgü sonuçları, Marker:M Negatif kontrol:1; silik bant alınmış örneklere ait profiller: 3,8,11,12,13,14.....24



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İncir mozaik hastalığına neden olan viral etmenler.....	3
Çizelge 3.1. RT-PCR da kullanılan primerlere ait diziler, koşullar, elde edilecek ürünün moleküler ağırlıkları .....	17



**EKLER DİZİNİ**

Ek:1 Yapaktan Total Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar.....	33
Ek:2 Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit Protokolü.....	33
Ek:3 %1 'lik Agaroz Jel .....	33
Ek:4 10X TBE Buffer (1 LİTRE).....	34



## 1. GİRİŞ

Moraceae familyasının *Ficus* cinsinin üyesi olan incir (*Ficus carica*) 600 türü olan ticari yönden önemli bir bitkidir. Gelişimi için tropik ve subtropik iklim kuşağının hakim olduğu Doğu Akdeniz ve Güneybatı Asya Bölgeleri idealdir. Tropik Bölgelerde 800–1800 m yüksekliğe kadar yetiştirilebilmektedir. Meyve gelişimi için kuru bir iklime, ışık ve sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Türkiye dünyadaki taze incir üretiminin %26' sını, kuru incirde ise 58.000 ton üretimle %59'unu karşılamaktadır (Anonim, 2012). Bu sebeple ülke ekonomisine katkısı her geçen yıl artarak devam etmektedir. Ayrıca incir, yetiştiriciliğinin yaygın olması nedeniyle ekonomik anlamda insanlara istihdam sağlandığı bir üründür. İncir üretimi yapılan bahçelerde ve fidanlıklarda hastalık ve zararlıların neden olduğu bir takım problemlerle karşılaşmaktadır. Bu problemlerin en önemlilerinden birisi İncir mozaik hastalığıdır. Bu hastalığa neden olan etmenler uzun yıllar tanımlanmamış olmasına karşın, mekanik olarak bitki özsuyu ile test bitkilerine taşınabildiği, doğada enfekteli aşı-çelik ve *Aceria ficus* Cotte. akarı ile hızla yayıldığı saptanmıştır. Ülkemiz başta olmak üzere dünyada incir yetiştiriciliği yapılan hemen her yerde özellikle Akdeniz ülkelerinde (Serrano vd., 2004) görülmektedir. Hastalık belirtilerinin şiddetli olduğu durumlarda ağaçların strese girdiği, meyve kalitesinin düştüğü, zamansız yaprak ve meyve dökümüne yol açtığı belirtilmektedir (Yakubi vd., 2007). Diğer taraftan ağaçların budanmasından sonra sıcaklık artışıyla bitkilerin strese girmesinin hastalık belirtilerinin artışına neden olduğu saptanmıştır (Salomon, 2004).

İncir mozaik hastalığı, incir ağaçlarının sürgünlerindeki genç yapraklarında dağınık sarı-yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekeler veya bantlar oluşturmaktadır. Genelde bu lekelerin kenarının pas renginde veya kırmızı-kahverengi renkte olduğu, nadir olarak nekroz oluşturduğu tanımlanmıştır. Fakat hastalığın görüldüğü yüksek sıcaklığa sahip bölgelerde bu lekelerin maskelendiği ve olgunlaşmamış meyvelerde görülen sarı ve açık renkli lekelerin meyve olgunlaştığında kaybolduğu bildirilmiştir (Şekil.1.1) (Açıkgöz ve Döken, 2001).



Şekil 1.1. İncir mozaik hastalığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler

İncir mozaik hastalığının mekanik olarak bitki özsuuyuyla vejetatif üretim materyali olan enfekteli aşı ve çelikler aracılığıyla ve Eriophyidae familyası üyesi *Aceria ficus*'un vektörlük yapmasıyla taşındığı bilinmektedir (Flock ve Wallace, 1955). Yapılan çalışmalarda hastalık etmeninin tohumla taşımadığı belirtilmektedir (Özar vd., 1986). İncirde zararlı olan unlubit, kanlı balsıra, virgül koşnili vb. diğer zararlı türlerinde hastalığın taşınmasında vektör olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Blodgett ve Gömeç, 1967; Özalp ve Heper, 1972). Blodgett ve Gömeç 1967, *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) ve *Ceroplastes rusci* L. 'nin (Hemiptera: Coccidae) hastalık etmeninin taşınmasında etkin olmadığını herhangi bir taşıma çalışması yapmaksızın belirtmiştir. Özalp ve Heper, (1972), *Lepidosaphes ficus* Fernald. (Hemiptera:Coccoidea)'un (virgül koşnili) vektör olabileceğinden bahsetmiş, fakat denemeleri yapmamışlardır.

Eriophyidae familyası üyesi olan *A. ficus* akarı için yapılan ilk çalışmada hastalığın akar tarafından taşındığı ve hastalığın taşınmasında tek bir *A. ficus* bireyinin bile hastalığı taşımada etkili olduğu fakat hastalığın taşınmasında akar yumurtalarının rolünün olmadığı belirtilmiştir (Flock ve Wallace, 1955). İlerleyen yıllarda *A. ficus* 'un genç ve ergin bireylerinin etmeni kazanma süresinin beş dakika gibi kısa bir süre olduğunu ve etmeni bünyesine aldıktan sonra 6-10 (Proeseler vd., 1972) ve 20 gün (Özalp ve Heper, 1972) kadar tutabildiği belirlenmiştir. Buna ilave olarak bitkilerdeki akar sayısının artmasıyla hastalık belirtisi gösteren ağaçların sayısının arttığı da gözlemlenmiştir (Proeseler vd., 1972; Özalp ve Heper, 1972).



Daha sonra *A. ficus* bireyleri incir dışında *Catharanthus roseus* bitkisine taşınmış ve 40 gün sonra yapraklarda klorotik lekeler ile birlikte mozaik görüntüsü, çiçeklerde ise sarımsı lekelerin meydana geldiği saptanmıştır (Credi, 1998).

İncir mozaik hastalığı etmeninin viral kaynaklı olduğu biyolojik (Salomon vd., 2002), serolojik (Serrano vd., 2004), dsRNA analiz bulguları (Açıkgöz ve Döken, 2001,2003) ve son yıllarda yapılan moleküler tanı (RT-PCR) çalışmalarıyla (Elbeaino vd., 2006, 2011) ortaya konmuştur. İncir mozaik hastalığına 12 virüs ve 2 viroid etmeni olmak üzere toplam 14 etmen neden olmaktadır. 12 viral etmen aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge.1.1.).

Çizelge 1.1. İncir mozaik hastalığına neden olan viral etmenler

<b>VİRÜS ADI</b>	<b>LİTERATÜR</b>
<i>Fig leaf mottle associated virüs-1</i> (FLMaV-1)	Elbeaino vd.,2006
<i>Fig leaf mottle associated virüs-2</i> (FLMaV-2)	Elbeaino vd., 2007
<i>Fig mosaic virüs</i> (FMV)	Elbeaino vd., 2009
<i>Fig latent virüs</i> (FLV-1)	Castellano vd., 2009
<i>Arkansas fig closterovirüs-1</i> (AFCV-1)	Tzanetakis vd., 2010
<i>Arkansas fig closterovirüs-2</i> (AFCV-2)	Tzanetakis vd., 2010
<i>Fig badna virüs-1</i> (FBV-1)	Tzanetakise vd., 2010
<i>Fig mild mottle associated virüs</i> (FMMaV)	Elbeaino vd., 2010
<i>Fig cryptic virüs</i> (FCV)	Elbeaino vd., 2011
<i>Fig fleck-associated virüs</i> (FFKaV)	Elbeaino vd., 2011
<i>Fig mosaic-associated virus-1</i> (FMaV-1)	Walia vd., 2009
<i>Fig mosaic-associated virus-2</i> (FMaV-2)	Walia vd., 2009

Ülkemizde incir yetiştirilen bölgelerde incir viral etmenlerinin belirlendiği çalışmalarda; Hatay ilinde Bursa siyahı incir çeşitlerinde FMV saptanmıştır (Çağlayan vd., 2010). Aydın yöresinde ise Bursa siyahı ve Sarılop incir çeşitlerinde FMV ve FMaV-1 RT -PCR çalışması yapılan örneklerde tespit edilmiştir (Edremit ve Açıkgöz, 2011). Adana, Hatay, Şanlıurfa'daki incir ağaçlarından toplanan örneklerde FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMV'nün bu

yörelerdeki varlığı belirlenmiştir (Çağlar vd., 2010). Hatay, İzmir, Aydın, Bursa, Şanlıurfa'daki incir çeşitlerinde FLMaV-1, FLMaV-2, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV-1, AFCV-2, FBV-1 ve FCV'nün bulunduğu ve örneklerin en çok FBV-1 ve FMV ile enfekteli olduğu ve aynı zamanda karışık enfeksiyonların varlığı saptanmıştır (Elçi vd., 2012).

Dünyada ve ülkemizde incir ağaçlarında İncir mozaik hastalığının neden olduğu kalite ve verim kayıplarını önlemek için etmenlerin ayrı ayrı yayılma ve taşıma yollarının belirlenmesi çok önemlidir. Ayrıca doku kültürü ve termoterapi yolu ile elde edilmiş sağlıklı üretim materyalinin korunabilmesi, etmenlere ait taşıma yollarının engellenmesi ile mümkün olabilecektir. İncir bitkisinde hastalığa neden olan etmenlerin taşımaları konusunda çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. *A. ficus*'un FMV dışında diğer virüslerin taşıyıp taşımadığı hala açıklığa kavuşmamıştır. *C. rusci*'nin incirde FLMaV-2 ve FLMaV-1'i taşımadığı tespit edilmiş olsa da durum diğer incir viral etmenleri için belirlenmemiştir. Bu nedenle *A. ficus*'un FMV dışında diğer etmenler için vektör olup olmadığı ve *C. rusci*'nin İncir mozaik hastalığı virüs etmenlerini taşıyıp taşımadığını belirlemek amacıyla bu çalışma yürütülmüştür.

Bu amaçla ilk olarak İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren bitkilerden yaprak örnekleri ve bu yapraklar üzerinde bulunan *C. rusci* ile *A. ficus* bireyleri toplanmıştır. Bu örnekler stero-binoküler mikroskop altında incelenerek *A. ficus*'un ergin ve *C. rusci*'nin hareketli 1. nimf bireylerinin teşhisleri yapılmıştır. Daha sonra bu bireyler sağlıklı incir çöğürlerine iki yıl ve ikişer tekrarlı olarak aktarılmıştır. Hastalık belirtisi gösteren enfekteli bitki yaprak örnekleri, taşıma sonrası hastalık belirtisi gösteren yapraklar ve *A. ficus* ile *C. rusci* bireylerinden elde edilen total nükleik asitler kullanılarak 12 viral etmene özgü primer çiftiyle RT-PCR çalışması yapılarak örneklerin hangi incir viral etmenlerinin olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular bize incir viral etmenlerinin taşımada *A. ficus* ile *C. rusci*'nin vektörlüğü konusunda yeni bilgiler elde etmemizi sağlamıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

İncir mozaik hastalığı ilk kez 1933 yılında California’da rapor edilmiş ve incir yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkelerde yaygın olarak görüldüğü belirtilmiştir (Condit ve Horne, 1933). İncir bitkilerinde görülen bu hastalığın viral olabileceğinden bahsedilmiş ve mozaik belirtilerine neden olduğu ifade edilmiştir (Alfieri,1967; Condit ve Horne, 1933). Büyük Menderes havzasında incir bahçelerinin İncir mozaik hastalığı ile enfekteli olduğu ülkemizde ilk kez 1967 yılında belirlenmiştir (Blotgett ve Gömeç, 1967). Aydın ve İzmir’deki incir bahçelerinde hastalığın genel dağılımı ve çeşitlerin simptomatolojik gözlemlerle dayanıklılık reaksiyonları belirlenmiş ve sonuç olarak 46.647 incir ağacının virüsle bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Özalp ve Heper, 1972).

İncir mozaik hastalığı karakteristik olarak; ağaçların sürgünlerindeki genç yapraklarında dağınık sarı-yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte mozaik görüntüsünde lekeler veya bantlar oluşturmaktadır. Genelde bu leke kenarlarının pas renginde veya kırmızı-kahverengi tonunda olduğu nadir de olsa nekroz oluşturduğu ifade edilmiştir (Blodgett ve Gömeç, 1967; Şahtiyancı, 1972). Belirtiler yaprağın üst kısmında görülür ve simptomlu yapraklar ağaçtaki diğer yapraklara göre daha küçük olup, asimetrik bir şekil alır. İncir meyvelerinde de benzer simptomlar görülür fakat daha az belirgindir. Meyvelerde olgunlaşmamış dönemde sarı ve açık renkli lekeler olduğu ve meyveler olgunlaştığında bu lekelerin kaybolduğu belirtilmektedir. Hastalığın görüldüğü yüksek sıcaklığa sahip bölgelerde yaprak ve meyvelerdeki lekelerin maskelendiği gözlenmiştir (Açıkgöz ve Döken, 2001). İncir üretim alanlarında yaprak ve meyvelerde görülen mozaik, yaprak deformasyonları ve meyve dökümleri nedeniyle ekonomik kayıpların meydana geldiği bildirilmektedir (Nakasone ve Kusakari, 1991).

Yukarıda ifade edildiği gibi İncir mozaik hastalığı ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda hastalığın viral kaynaklı olabileceği ileri sürülmüş ancak etmen tam olarak belirlenememiştir. Daha sonra enfekteli incir hücrelerinin sitoplazmasında membranla çevrili yuvarlak yapıların varlığı elektronmikroskopik incelemeler sonucu ortaya çıkmıştır (Bradfute vd., 1970; Plavsic ve Milicic, 1980; Appiano vd., 1990). İlerleyen yıllarda “hastalıkla ilişkili yapılar” olarak adlandırılan farklı büyüklükte çubuk şeklindeki virüs benzeri yapıların hastalıktan sorumlu olduğu ve mekanik olarak test bitkilerine taşınabildiği saptanmıştır (Martelli vd., 1993).

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenin belirlenmesi amacıyla enfekteli bitkilerden yapılan dsRNA analizinde 6.6 kbp üzerinde bir, 2.0 ile 0.6 kbp arasında iki bant elde edilmiş ve bu bantların viral bir etmene ait olabileceği kanısına varılmıştır (Açıkgöz ve Döken, 2001). Aydın yöresi için dsRNA izolasyonunda en uygun örnekleme zamanının mayıs ve haziran ayları olduğu bildirilmiştir (Açıkgöz ve Döken, 2003). İncir mozaik hastalığına neden olan etmeni serolojik yöntemlerle belirlemek amacıyla enfekteli incir örnekleri ile Potyvürüs grubuna giren Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe virus: LYSV*) antiserumunun pozitif reaksiyon verdiği belirtilmiştir (Salomon vd., 2002). Elektron mikroskobunda gözlemlenen “Çift Membranlı Yapıların” yanı sıra hem incir hem de duyarlı konukçu bitkilerin hücrelerinde 720 nm uzunluğunda, 230 nm’lik kuyruğa sahip çubuk şeklindeki yapıların virüs olabileceği bildirilmiştir (Serrano vd., 2004). İncir mozaik hastalığından fitoplazmaların da sorumlu olabileceği elektron mikroskopi ve RT-PCR çalışmaları sonucu ifade edilmiştir (Çağlayan vd., 2007).

Elbeaino vd. (2006), klorotik beneklenme ve damar açılması semptomlarını gösteren incir bitkilerinden yapılan dsRNA analizleri sonucu 19 kb büyüklüğünde profil elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu etmenin mekanik inokulasyonla aktarılamayan, ipliksi, 1800 nm büyüklüğünde *Closterovirus* üyesi bir virüs olduğunu ve *Fig leaf mottle-associated virüs-1* (FLMaV-1) olarak adlandırılmasını önermişlerdir (Elbeaino vd., 2006). Bunu takiben *Ampelovirus* grubu üyesi *Fig leaf mottle-associated virüs-2* (FLMaV-2) etmeni de *Fig leaf mottle-associated virüs* grubuna dahil edilmiştir (Elbeaino vd., 2007). Viroidlere ait spesifik primerler kullanılarak yapılan RT-PCR çalışmalarında Hop stunt viroid (HSVd) ve Citrus exocortis viroid (CEVd) lerinin de İncir mozaik hastalığına neden olan etmenler olabileceği saptanmıştır (Yakoubi vd., 2007).

Elbeaino vd. (2009), *Fig mosaic virüs* (FMV)’ü gen haritasına göre *Bunyaviridae* familyası üyesi, multipartite, negative sense ssRNA virüsü olduğunu ve RNA’sının dört segmentten (7093, 2252, 1490, 1472 nükleotid büyüklüğünde) oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ardından enfekteli incir dokularında çok parçalı, negatif polariteli RNA virüsü, *Fig mosaic associated virüs 1-2* (FMaV 1-2) saptanmıştır (Walia vd., 2009).

Gattoni vd. (2009), incir bitkilerinde 700 nm büyüklüğünde ipliksi, pozitif polariteli, 4 ORF içeren RNA virüsünü tespit etmişler ve bu virüsün mekanik inokulasyon ile taşındığını saptamışlardır. Bu çalışmayı *Flexiviridae* familyasına ait Trichovirus grubu üyesi *Fig latent virüs-1* (FLV-1)' nin tespiti izlemiştir (Gattoni vd., 2009). Elbeaino vd. (2011), incir yapraklarından aldığı örneklerde 2000 nm büyüklüğünde, ipliksi yapıda olan *Fig mild mottle associated virüs* (FMMaV)'ü *Closterovirus* üyesi olarak belirlemişlerdir.

Tzanetakakis vd. (2010), *Arkansas fig closterovirüs 1-2* (AFCV1-2) ve *Fig badnavirüs-1* (FBV-1) olmak üzere 3 değişik virüs tanımlanmış ve İncir mozaik hastalığına karışım enfeksiyonlarının neden olabileceğini bildirmiştir. Laney vd. (2012), FBV-1'in incir genomuna entegre olduğunu belirlemiştir. Ancak bitki hücresine entegre olmayan episomal veya entegre formlarda olabileceğini ve FBV-1'nin bitki hücresine entegre olmayan formunun kemoterapi ve termoterapi ile ortadan kaldırılabilme olasılığının çoğu zaman var olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla *Fig cryptic virüs* (FCV) (Elbeaino vd., 2011) ve *Fig fleck-associated virüs* (FFkaV) (Elbeaino vd., 2011) İncir mozaik hastalığı etmenlerine dahil edilerek 12 viral ve 2 virodal olmak üzere toplamda 14 etmenin İncir mozaik hastalığına neden olduğu saptanmıştır.

Daha sonra moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla FMV'nin genom yapısının 6 segmentten oluştuğu bulunmuş ve RNA-5/RNA-6 segmentlerinin 1752/1216 nükleotid büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir (Elbeaino vd., 2012; Ishikawa vd., 2012).

İncir mozaik hastalığı ile ilgili Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda şimdiye kadar tespit edilen etmenlerin bazılarının varlığı belirlenmiştir. Hatay ve Mersin illerindeki incir bahçelerinde FLMaV-1, FLMaV-2, FMaV-1, FMaV-2, FMV rastlanmıştır (Çağlayan vd., 2010). Adana, Hatay, Şanlıurfa'daki incir ağaçlarından toplanan örneklerde FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMV'nün bu yörelerdeki varlığı belirlenmiştir (Çağlar vd., 2010). Elçi vd. (2012), Hatay yöresinin FLMaV-1, FLMaV-2, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV-1, FBV-1 ve FCV'den en az biri ile enfekteli olduğu ve karışım enfeksiyonlarının yaygın olduğunu saptamıştır. Bu etmenlerden en sık FBV-1 ve FMV'e rastlandığını belirtmiştir. Edremit vd. (2011), Aydın yöresinde FMV nin % 30, FMaV-1 %33 ve

bu iki etmene ait karışım enfeksiyonun ise %9 oranlarında olduğunu RT- PCR yöntemi ile saptamışlardır.

Hastalık etmeninin yayılmasında Eriophyidae familyası üyesi olan *A. ficus* ve bulaşık çeliklerle fidan üretimi etken rol oynamaktadır. Ancak etmenin tohumla taşınmadığı ilk yıllarda yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Flock ve Wallace, 1955; Özar vd., 1986). Tek bir *A. ficus* bireyinin bile hastalık etmeninin taşınmasında önemli rolünün olduğu ve bitkilerde akar sayısının artmasıyla hastalık belirtisi gösteren ağaçların sayısının arttığı gözlemsel olarak tespit edilmiştir (Flock ve Wallace, 1955). Proeseler, (1972), *A. ficus* yumurtalarından çıkan yeni bireylerin etmeni taşımadığını tespit etmiştir. *A. ficus*'un İncir mozaik hastalığı etmenini taşıyan vektör olduğu Hindistan (Vashisth ve Nagaich, 1968) ve Japonya'dan da rapor edilmiştir (Nemato vd., 1980). Ülkemizde, Aydın ve İzmir illerinde yürütülen denemelerde *A. ficus* bireyelerinin beş dakika hastalıklı bitkide beslenme ile etmeni bünyesine alarak 20 gün taşıyabildikleri tespit edilmiştir (Özalp ve Heper, 1972 ). Aynı araştırmacılar incir zararlısı olan diğer akar türlerinin de *Bryobia practiosa*, *Tetranychus telarius*, *Rhyncaphytoptus ficifolia* vektör olabileceğini vurgulamışlardır. Hastalık etmeninin *A. ficus*'un bireyleri ile *C. roseus* (Cezayir menekşesi) bitkisine taşınmasından 40 gün sonra yapraklarda klorotik lekeler, mozaik görüntüsü ve çiçeklerde sarımsı lekelerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Credi, 1998). Ayrıca elektron mikroskobunda incelenen enfekteli *C.roseus* yaprak parankima dokularında double-membran yapılar saptanmıştır (Credi, 1998).

İlerleyen yıllarda moleküler çalışmaların hız kazanmasıyla hangi etmenlerin hangi vektörlerle taşınabildiği konusu araştırmaya başlanmıştır. Nitekim Credi vd. (2012), hastalık belirtisi gösteren yapraklardan alınan *A.ficus* bireyelerini tohumdan yetiştirilen sağlıklı incir çöğürlerine ve test bitkisi olan *C. roseus* 'a aktarmışlardır. Taşımadan bir ay sonra 115 bitkiden yedi tanesinde mozaik belirtileri gözlemlenmişlerdir. Bu bitkilerden geriye inokulasyon yapıldığında incir bitkisinde %98,5 ve *C. roseus* test bitkisinde % 33,3 oranında hastalığın taşındığı tespit edilmiştir. Taşıma sonrası incir ve cezayir menekşesinin yapraklarının RT-PCR sonucu FMV ile bulaşık olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, elektron mikroskobu analizleri ile bitki parankima hücrelerinde çift membranlı yapılara (DMBs) rastlamışlardır. Böylece FMV 'nin taşınmasında *A. ficus* bireyelerinin vektör olduğunu tespit etmişlerdir (Credi vd., 2012).

Ülkemizde etmen bazında yapılan taşıma çalışmaları bunlarla paralellik göstermiştir. *A. ficus* ile taşıma sonrası incir ve *C. roseus* yapraklarının sadece FMV ile bulaşık olduğu ve diğer etmenlerin (FMMaV, FLV-1, AFCV 1-2, FLMaV 1-2, FMaV, FBV1) ise var olmadığı RT-PCR ile belirlenmiştir (Çağlayan vd., 2012). Edremit, (2012), *A. ficus* ergini ile taşıma sonrası *C. roseus* yapraklarında deformasyon, kloroz, yaprak deformasyonu, yaprak ayasında çukurlaşma ve mozaik belirtileri gözlemlenmiştir. Bunu takiben taşıma sonrası *C. roseus* yapraklarının dsRNA analizlerinde FMV'e ait olduğu düşünülen viral profil elde etmişlerdir. Ayrıca, aynı vektör ile hıyar bitkisine yaptığı taşıma çalışması sonucunda hiçbir belirti gözlenmediği belirtilmiştir (Edremit, 2012). Bu çalışmalar sonucu araştırmacılar incirde zararlı olan unlubit, kanlı balsıra vb. gibi türlerin de vektör olabileceğini ve üzerinde çalışılması gerektiğini vurgulamışlardır (Çağlayan vd., 2012; Edremit, 2012).

İncirlerde başka bir zararlı tür olan *Lepidosaphes ficus*'un (virgül koşnili) vektör olabileceğine de değinilmiştir (Blodgett ve Gömeç, 1967). *P. ficus* ve *C. rusci* 'nin hastalığın taşımada etkin olmadığını taşıma çalışması yapılmaksızın gözlemler sonucu belirtilmiştir (Özalp ve Heper, 1972). Ancak daha sonra bu konu tekrar ele alınarak *P. ficus* 'un FLMaV-2 taşıdığı fakat FLMaV-1'i taşımadığı, *C. rusci* 'nin ise her iki etmeni de taşımadığı belirlenmiştir (Elbeaino vd., 2009). Mahfoudhi vd. (2009), *C. rusci* 'nin asmada (*Vitis vinifera*) *Ampelovirus* üyesi olan *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3) %3.3 ve *Grapevine leafroll associated virus-5* (GLRaV-5) %1.7 oranında taşıdığı DAS-ELISA testleriyle saptamışlardır.

Dünyada ve ülkemizdeki İncir mozaik hastalığı ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalar viral etmenlerin moleküler tanılanması yönünden oldukça doyurucu olmasına karşılık etmenlere özgü konuların özellikle de taşıma ile ilgili bulguların eksik olduğu görülmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Taşıma Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Bu çalışmanın materyalini, 2014-2015 yıllarının ağustos ve eylül aylarında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi incir bahçelerindeki İncir mozaik hastalığı belirtileri gösteren ağaçlardan alınan 89 adet yaprak örneği ile bu bitkiler üzerinden toplanan *A. ficus* ve *C. rusci* bireyleri oluşturmuştur. Ayrıca tohumdan yetiştirilmiş incir çöğürleri, taşıma çalışmalarında sağlıklı bitki ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Toprak Hazırlığı

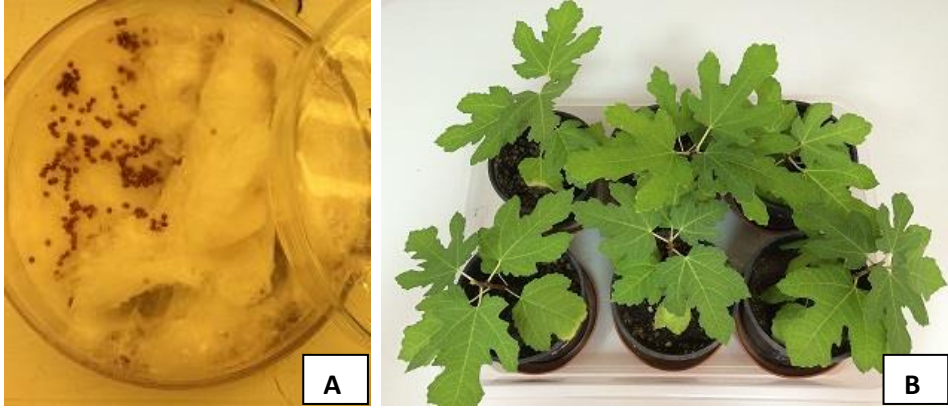
İncir çöğürlerinin yetiştirilmesinde kullanılacak toprak karışımı için eşit oranda (1:1:1:1) gübre, kum, perlit ve toprak içeren harç hazırlanmıştır. Harç olası bulaşmaları önlemek için 121°C’de bir saat süreyle iki kez otoklavlanıp, sterilize edilmiştir (Şekil3.1.).

##### 3.2.2. Tohumdan İncir Çöğürlerinin Yetiştirilmesi

Taşıma çalışmalarında sağlıklı bitki ve negatif kontrol olarak kullanılmak üzere tohumdan incir çöğürleri yetiştirilmiştir. Bunun için kuru incir meyveleri 500 ml su içerisinde 24 saat bekletildikten sonra, ikiye kesilerek serilmiştir tohumlar bir eleğe alınarak iyice yıkandıktan sonra kurutma kağıdı üzerine alınmıştır. Elde edilen incir tohumları steril edilmiş gübre, kum, perlit ve toprak (1:1:1:1) içeren plastik saksılara ekilmiştir. İki günde bir sulamaları ve bakımları yapılarak 16:8 saat aydınlık:karanlık periyot, 10.000 lux ışık altında, % 60-70 nem ve 25±2°C sıcaklığa sahip iklim odasında yetiştirilmiş ve kullanılmaya kadar bakımı yapılmıştır (Şekil 3.1).

Tohumdan elde edilen incir çöğür yaprak örnekleri alınarak taşıma çalışmalarında kullanılmadan önce 12 incir viral etmenine özgü primerler ile RT-PCR yapılarak sağlıklı olup olmadığını belirlemek için -20°C deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

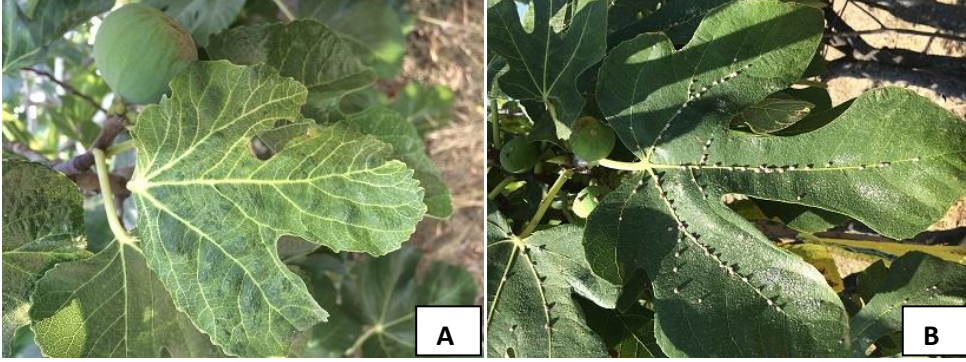




Şekil 3.1. İncir çöğürlerinin yetiştirilmesinde kullanılan tohumlar (A) ve yetiştirilen sağlıklı incir çöğürleri (B)

### 3.2.3. Enfekteli İncir Yaprak Örneklerinin Toplanması

Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi koleksiyon bahçesinde bulunan Sarılop incir ağaçlarından İncir mozaik hastalığı belirtileri gösteren ve üzerinde *C. rusci* bulunan yapraklar 15 Ağustos- 15 Eylül 2014-2015 yıllarında, tarihleri arasında toplanmıştır. Hastalık belirtileri gösteren ve *A. ficus* içeren yapraklar da eylül ayında toplanmıştır. Toplam 89 adet yaprak örneği (Şekil 3.2.) kültür kavanozlarına konup etiketlenmiş uygun koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Daha sonra stereo-binoküler mikroskop altında zararlıların popülasyon yoğunlukları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *A. ficus* ergin bireylerinin teşhisi Prof. Dr. İbrahim Çakmak tarafından *C. rusci* bireylerinin 1. nimf dönemi ise Prof. Dr. Tülin AKŞİT tarafından yapılmıştır. Bu yapraklardan alınan *A. ficus*'un ergin bireyleri ve *C. rusci*'nin hareketli 1.nimf dönemleri taşıma çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Simptom gösteren ve üzerinde *Aceria ficus* Cotte. (A) ve *Ceroplastes rusci* L. (B) bulunan incir yaprakları

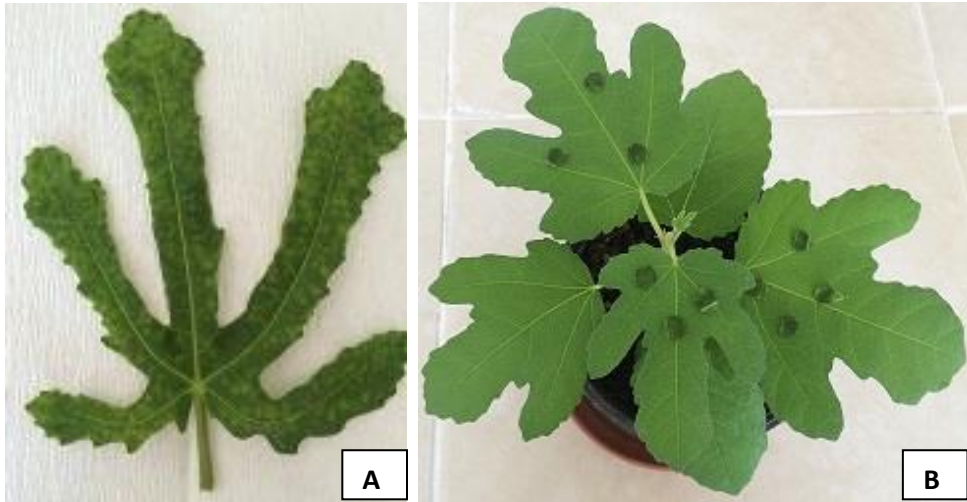
### 3.2.4. Taşıma Denemeleri;

Taşıma denemeleri; 2014-2015 yıllarının ağustos ve eylül dönemlerinde Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi incir bahçelerindeki İncir mozaik hastalığı belirtileri gösteren ağaçlardan alınan yapraklar üzerindeki *A. ficus* ve *C. rusci* bireyleri, tohumdan yetiştirilen 12'şer incir çöğürüne iki tekerrürlü olarak yapılmıştır.

#### a) *Aceria ficus* Cotte. ile Yapılan Taşıma Denemeleri

Eylül ayı içerisinde toplanan *A. ficus* ergini bulunduran incir yaprakları ilk olarak stereo- binoküler mikroskop altında incelenerek zararlının tespiti yapılmıştır. *A. ficus*'un yoğun olarak bulunduğu her bir incir yaprağından delici yardımıyla kesilen üzerinde 10'ar birey bulunan üçer küçük yaprak parçası, iki-üç yapraklı dönemdeki 12 adet sağlıklı incir çöğürlerinin üç farklı yaprağına ayrı ayrı pens yardımıyla aktarılmıştır (Şekil 3.3). İncir yapraklarının alt yüzeyi, test bitkileri yaprağının üst yüzeyine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Bu işlemden sonra kesilen yaprak disklerinin nemini kaybetmemesi için bitki yaprak parçaları spreyleme yöntemi ile sulanmıştır. Yapraklar tamamen kuruyuncaya kadar sağlıklı bitkilerin üzerinde bırakılmış ve akarların çöğürlere geçişi sağlanmıştır. Daha sonra incir çöğürleri tül kafesler içerisine konularak iklim odasında alınmıştır. Kontrol bitkilerine hiçbir müdahale yapılmadan aynı ortamda tutulmuştur. Bu bitkilerin iki günde bir sulama işlemleri ve bakımları yapılmış ve bitkiler 16sa:8sa aydınlık:karanlık periyot, 10.000 lux ışık, % 60-70 nem ve 25±2 °C sıcaklığa

sahip iklim odasında 30-45 gün gözlem altında tutularak simptom çıkışları için izlenmiştir.



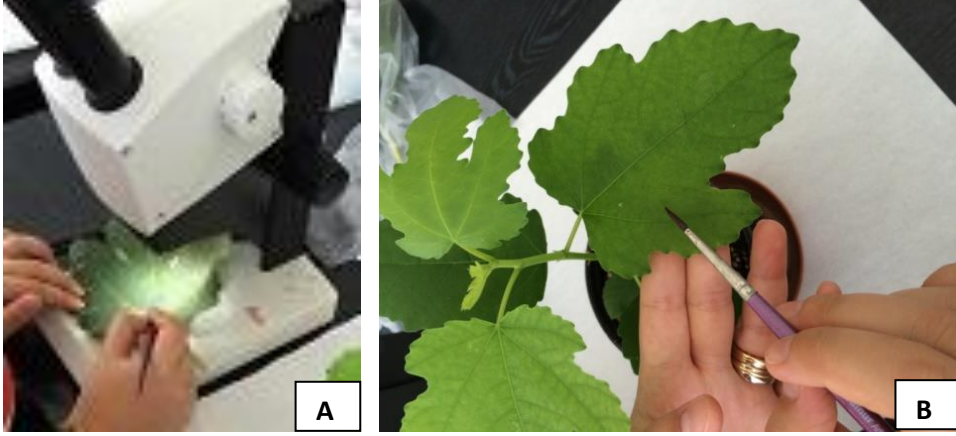
Şekil 3.3. *Aceria ficus* Cotte. taşıma denemelerinde kullanılan yaprak örneği (A) ve taşıma yapılan incir çöğürü(B).

*A. ficus* ile bulaşık olan ve İncir mozaik hastalığı simptomları gösteren enfekteli bitki yaprak örnekleri total nükleik asit ekstrasyonu ve RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C 'de depolanmıştır.

#### b) *Ceroplastes rusci* L. ile Yapılan Taşıma Denemeleri

İncir mozaik hastalığı ile enfekteli aynı zamanda *C. rusci* ile bulaşık yaprak ve dallar stereo-binoküler mikroskop altında incelenerek hareketli 1. nimflerin tespiti 2014 ve 2015 yılları 15 Ağustos- 15 Eylül tarihleri arasında yapılmıştır. *C. rusci*'nin hareketli 1. nimf dönemleri hareketli formda oluşları ile diğer bireylerden ayırt edilmiştir. *C.rusci*'nin hareketli 1. dönem nimf dönemindeki bireylerinin bulunduğu İncir mozaik hastalığı ile enfekteli incir yapraklarından fırça yardımıyla 10 birey alınarak iki-üç yaprak dönemindeki 12 adet sağlıklı incir çöğürlerinin üçer farklı yaprağına pens yardımıyla iki tekrarlı olarak aktarılmıştır (Şekil 3.4). Taşıma işlemleri sırasında incirde zararlı olan diğer türlerin geçişinin olmamasına dikkat edilmiştir. Kontrol bitkilerine hiçbir birey aktarımı yapılmadan aynı ortamda tutulmuştur. İnokule edilen tüm bitkiler ayrı ayrı tül kafesler içerisine alınmış, daha önce açıklanmış olan şartlara sahip iklim odasında gözlem altına alınmıştır.

*C. rusci* ile bulaşık ve İncir mozaik hastalığı belirtileri gösteren enfekteli bitki yaprakları total nükleik asit ekstrasyonu ve RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$  'de depolanmıştır.



Şekil 3.4. Yaprak örneklerinin stereo-binoküler mikroskopta incelenmesi (A) ve sağlıklı çöğürlere *C. rusci* taşıma denemesinin yapılması (B)

### 3.2.5. Taşıma Sonrası Bitkilerde Simptom Çıkışlarının Gözlemlenmesi

*A. ficus* ve *C. rusci* bireylerinin sağlıklı incir çöğürlerine taşıma sonrası bitkilerde simptom çıkışları hergün takip edilerek belirtilerin görülme zamanı ile tüm fenolojik değişiklikler tespit edilmiş ve kayıt altına alınmıştır. Taşıma sonrası incir viral etmenlerine özgü tipik belirti gösteren yaprak örnekleri RT-PCR ile viral etmen tanıları yapılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanmıştır.

### 3.2.6. *Aceria ficus* Cotte. ve *Ceroplastes rusci* L. Örneklerinin Toplanması

Taşıma sonrası incir çöğürlerinin yaprakları üzerinden *A. ficus*, stereo-binoküler mikroskop altında her 1,5ml'lik eppendorf tüpte 10 ergin birey olacak şekilde steril membran (Whatman NC, Roche) üzerine aktararak toplanmıştır. *C. rusci* ise bir fırça yardımıyla ortalama 10 birey olacak şekilde 1,5ml'lik eppendorf tüp içine toplanmıştır. Elde edilen *A. ficus* ve *C. rusci* bireyleri total nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR ana kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 3.2.7. Viral Etmenlerin Moleküler Tanısı

Viral etmenlerin tanılanmasında tek basamaklı RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Viral etmenlerin moleküler tanısında;

- 1- Tohumdan yetiştirilen incir bitkilerinden,
- 2- İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren incir bahçelerinden toplanan enfekteli bitki yapraklardan,
- 3- Vektörleri ile taşıma yapıldıktan sonra tipik belirti gösteren bitki yapraklarından,
- 4- Taşıma sonrası *A. ficus* ve *C. rusci* bireylerinden elde edilecek total nükleik asitler kullanılmıştır.

#### 3.2.7.1 . Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu

##### A) İncir Bitkilerinin Yapraklarından Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Foissac vd. (2001), yöntemine göre; tohumdan yetiştirilen incir bitkilerinden, İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren incir bahçelerinden toplanan enfekteli bitki yapraklarından, vektörleri ile taşıma yapıldıktan sonra belirti gösteren bitki yaprak örneklerinden total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. İlk olarak enfekteli incir yaprakları mekanik olarak parçalandıktan sonra 100 mg yaprak dokusu 1 ml ezme solüsyonu (4M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc, 25 mM EDTA, 1 M KOAc, %2.5 PVP-40) (Ek:1) ile homojenize edilmiş ve 500 µl sıvı kısım steril eppendorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra bu tüplere, 100 µl %10'luk Sodium Lauryl Sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler 70°C 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra buz üzerine alınmıştır. Örnekler beş dakika buzda inkübe edildikten sonra 14000 rpm 10 dakika santrifüj yapılmış sonra 300 µl'lik sıvı üst faz (supernatant) alınarak üzerine 150 µl of etanol, 25 µl of resüspanse edilmiş silica ve 300 µl 6 M sodium iodide (Ek:1) bulunan steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu karışım 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Örnekler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından tüp içindeki sıvı faz uzaklaştırılarak ve pellet yıkama solüsyonu (Tris-HCl 10.0Mm pH:7.5, EDTA 0.5 Mm, NaCl 50.0 Mm, Ethanol %50) (Ek:1) ile iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi sonrası 150 µl RNase içermeyen su ile resüspanse edilmiştir. Ardından dört dakika 70°C'de inkübe edildikten sonra örnekler 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Tüm bu işlemlerin sonunda sıvı faz yeni eppendorf

tüplerine aktarılmış ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmıştır (Foissac vd., 2001).

### **B) *Ceroplastes rusci* L. Bireylerinden Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu**

Singh vd. (1995), yöntemine göre taşıma sonucu belirti gösteren yapraklardan toplanan *C. rusci* bireyleri likit nitrojen yardımıyla ezildikten sonra üzerine 300  $\mu\text{L}$  1X STE buffer + 10  $\mu\text{L}$  B-Mercaptoethanol eklenmiştir. Ardından 20 saniye iyi bir şekilde vortekslenmiş ve 10 dakika/10.000rpm  $4^{\circ}\text{C}$  de santrifüj yapılmıştır. 300  $\mu\text{L}$  supernatant alınmış ve 300  $\mu\text{L}$  chloroform ve 300  $\mu\text{L}$  phenol eklenmiş sonra 20 saniye iyi bir şekilde vortekslenmiştir. 5 dakika/10.000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  de santrifüj yapılmıştır. 300  $\mu\text{L}$  supernatant alınmış ve sadece 300  $\mu\text{L}$  chloroform eklenmiştir. 5 dakika/10.000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  de santrifüj yapılmıştır. 250  $\mu\text{L}$  supernatant yeni eppendorflara alınmış ve 750  $\mu\text{L}$  of Ethanol (100%) ve 25  $\mu\text{L}$  3M NaOAC (ph:5) eklenmiştir. Örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$  de bütün gece veya  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ardından 20 dakika 13.000 rpm de  $4^{\circ}\text{C}$  santrifüj yapılmıştır. Supernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 0.5 ml (ethanol 75% DEPC treated water) eklenmiştir. Ardından 15 dakika 13.000 rpm de santrifüj yapılmıştır. Supernatant atıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak 50  $\mu\text{L}$  RNase içermeyen su ile resüspanse edilmiştir. Elde edilen total nükleik asitler RT-PCR çalışmasında kalıp RNA olarak kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır (Singh vd., 1995).

### **C) *Aceria ficus* Cotte. Bireylerinden Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu**

Çağlayan vd. (2012)'de verilen yönteme göre, *A. ficus* ile taşıma sonucu belirti gösteren yapraklardan toplanan 10 adet birey stero-binoküler mikroskop altında selüloz membrana aktarılmış hemen ardından membranda ezme işlemi yapılmıştır. 10 birey/membran 2ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Her bir eppendorf tüpe 50  $\mu\text{L}$  0.5% Tween X100 eklenmiştir.  $95^{\circ}\text{C}$  de 10 dakika inkübasyonun ardından her örnek vortekslenerek santrifüj yapılmıştır. Daha sonra elde edilen karışımdan 5  $\mu\text{L}$  kalıp RNA RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Tüm yöntemler ile elde edilen total nükleik asitler Thermo Nanodrop cihazı ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülerek her bir örnek için nükleik asit miktarı hesaplanmıştır.

### 3.2.7.2. RT-PCR Çalışmaları

Elde edilen total nükleik asit ile Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kiti (Ek:2) kullanılarak tek basamaklı RT-PCR işlemi uygulanmıştır.

RT-PCR işlemi için 1 µl verso enzim mix, 25 µl 2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix, 2,5 µl RT Enchanter, 1 µl Forward primer (10 pmol/µl), 1 µl Reverse primer (10 pmol/µl) ile master mix hazırlanmıştır. Daha sonra 16,5 µl Nüklease- free su ile 47 µl ye tamamlanmıştır. Master Mix her PCR tüpüne 47 µl olarak dağıtıldıktan sonra üzerine 3'er µl tNA ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyonlar için primerlere ait diziler, koşullar, elde edilecek ürünün moleküler ağırlıkları (Çizelge 3.1.)'de yer almaktadır. Negatif kontrol olarak tohumdan yetiştirilen bitkilerden elde edilen tNA'lar kullanılmıştır. Ancak FBV-1 (Laney vd., 2012)'ü incir genomuna entegre olan bir DNA virüsü olduğu için cDNA'ya çevirmeden direkt PCR yaparak bu virüsün varlığı yönünden test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Prof.Dr. Mustafa Gümüş ve Dr. Toufic Elbeaino adlı araştırmacılar tarafından temin edilen örnekler kullanılmıştır. RT-PCR sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde (Ek:3) 1X TBE buffer (Ek:4) ile elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR da kullanılan primerlere ait diziler, koşullar, elde edilecek ürünün moleküler ağırlıkları

Virüs	Primerler	PCR ürün	Annealing	Literatür
FMV	5'-CGGTAGCAAATGGAATGAAA-3' 5'-AACACTGTTTTGCGATTGG-3'	302bp	58°C	Elbeaino vd., 2009
FLMaV-1	N17s: 5'- CGTGGCTGATGCAAAGTT-3' N17a: GTTAACGCATGCTTCCATGA-3'	352bp	55°C	Elbeaino vd., 2006
FLMaV-2	5'-GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG-3' 5'-TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA-3'	360bp	58°C	Elbeaino vd., 2007
FMaV-1	5'-CACGAGCAAGACAAAGAGAA-3' 5'-CACACTTACACATCTTACATCATCT-3'	298bp	54°C	Walia vd., 2009
FMaV-2	5'-GGGTACATATGCGTCATTCTTG-3' 5'-CGTTTGCTTGGATCACAGCAA-3'	468bp	54°C	Walia vd., 2009
FCV	5'-TCGGATTGTCTTTGGAGAGG-3' 5'-CGCATCCACAGTATCCATT-3'	353bp	58°C	Elbeaino vd., 2011
FLV-1	5'-CCATCTTACCACACAAATGTC-3' 5'-CAATCTTCTTTGGCTCCATAAC-3'	389bp	58°C	Gattoni vd., 2009
AFCV-1	5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG-3' 5'-ATGCTTCCTCGGCTGC-3'	375bp	55°C	Tzanetakakis vd., 2010
AFCV-2	5'-GTTTCGGAATTAGTTAATAGATACGGTC-3' 5'-ACCCGCTAGAGTAATCAGTCAAAGTT-3'	1671bp	55°C	Tzanetakakis vd., 2010
FBV	5'-ACCAGACGGAGGGAAGAAAT-3' 5'-TCCTTGCCATCGGTTATCTC-3'	474bp	55°C	Tzanetakakis vd., 2010
FFkaV	5'-ATGGGGAATCTTACAAGGGTCG-3' 5'-TATCGCGCGCTTGAGGATTGC-3'	372bp	58°C	Elbeaino vd., 2011
FMMaV	5'-AAGGGGAATCTTACAAGGGTCG-3' 5'-TATTACGCGCTTGAGGATTGC-3'	311bp	58°C	Elbeaino vd., 2010

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Örnek Alınan Enfekteli İncir Bitkilerinde Simptomların ve *Aceria ficus* Cotte. ile *Ceroplastes rusci* L.' nin Belirlenmesi

Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi koleksiyon bahçesinde bulunan Sarılop incir çeşidi için nisan ayından başlayarak kasım sonuna kadar mozaik, sararma, yaprak şekil bozukluğu, damarlarda renk açılmaları ve pas renginde belirtiler gösteren ağaçlar ve *A. ficus* ile *C. rusci*' nin gözlemleri yapılmış ve bitkiler fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1.).



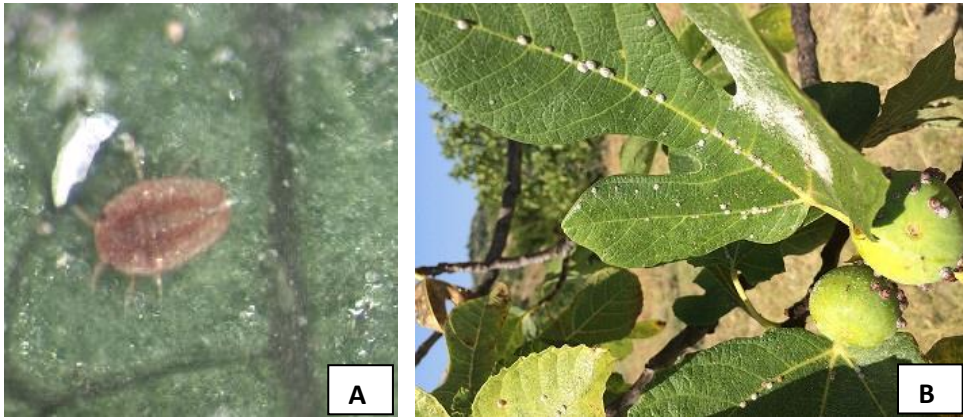
Şekil 4.1. İncir mozaik hastalığının mozaik belirtisini gösteren ve *Aceria ficus* cotte. ile bulaşık incir yaprakları.

Aydın ili incir bahçelerinde zararlı olan akar türlerini belirlemek üzere yapılan çalışmada, incir bahçelerinde zararlı 3 akar türünün *Tetranychus urticae*, *Aceria ficus*, *Panonychus ulmi* olduğu ve bunlardan en yaygının *A. ficus* olduğu belirtilmiştir (Çakmak vd., 2003). Örnekleme yapılan incir bahçelerinde *A. ficus* popülasyon yoğunluğunun ağustos ayı içerisinde artmaya başlayarak eylül ayında en yüksek seviyeye ulaştığı da tespit edilmiştir (Çakmak vd., 2003). Yaptığımız çalışmada, Aydın yöresi için yukarıda belirlenen *A. ficus* popülasyonunun yıl içindeki yoğunluğu göz önüne alınarak zararlının takibi ve tespiti yapılmıştır.



Şöyle ki; *A.ficus* mayıs sonu haziran başında gözlenirken hava sıcaklıklarının yükseldiği ağustos ayında akar sayılarında önemli ölçüde azalma ve ardından *A. ficus* popülasyonunda 15 Eylül tarihinden itibaren tekrar bir artış gözlemlenmiştir.

Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi bahçesinde bulunan İncir mozaik hastalığı ile enfekteli hastalığın belirtilerini gösteren incir ağaçlarından 15 Ağustos-15 Eylül tarihlerinde alınan yaprak örnekleri üzerinde *C. rusci* olduğu tespit edilmiş ve ağaçlar fotoğraflanarak (Şekil 4.2.) veriler kaydedilmiştir. *C rusci*'nin ilk çıkışları ağustos ayının başlarında olup ve 15 Ağustos tarihinden itibaren popülasyonunda bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. *Ceroplastes rusci* L.'nin hareketli 1. dönem nimfin stereo-binoküler mikroskop görüntüsü (A), bahçelerdeki İncir mozaik hastalığıyla enfekteli ve *Ceroplastes rusci* L. ile bulaşık yaprakları(B).

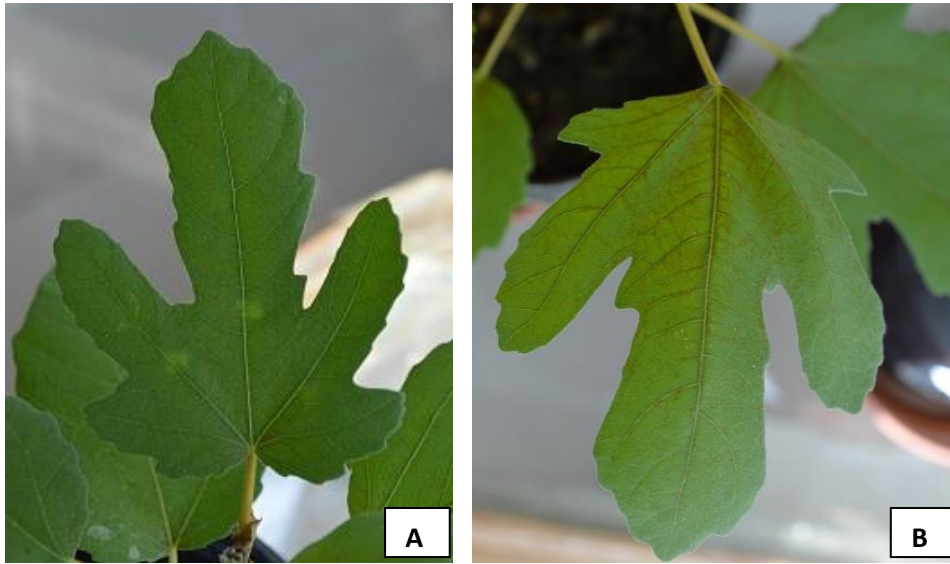
Özsemerci vd., (2003)'nin yaptığı araştırma verilerine dayanarak *C. rusci*'nin yıl içerisindeki popülasyon yoğunluğu ve 1. dönem nimf çıkışları takip edilmiştir. Nitekim Özsemerci vd. (2003), Aydın bölgesi incir bahçelerinde zararlı olan *C. rusci* ile yapılan çalışmada, incir yaprakları üzerindeki *C. rusci*'nin 1. ile 2. dönem nimf ve erkek birey popülasyonlarının ağustos ayında en yüksek seviyeye ulaştığını, eylül ayında ise nimflerin artık sürgünlerde görülmeye başladığını belirtmiş ve *C. rusci* popülasyonundaki en yüksek payı dişilerin meydana getirdiğini saptamıştır.

## 4.2. Taşıma denemeleri

### a) *Aceria ficus* Cotte. ile Yapılan Taşıma Denemeleri

Popülasyonun en yüksek olduğu 15 Eylül tarihinden itibaren İncir mozaik hastalığı ile enfekteli incir yapraklarından *A. ficus* sağlıklı çöğürlere aktarıldıktan 10 gün

sonra yapraklarda renk açılmaları ve sararma-damar nekrozu gözlemlenmiştir. İlk 15 gün içerisinde 12 bitkinin dört tanesinde belirtilen tipik mozaik belirtileri ortaya çıkmıştır (Şekil 4.3.).



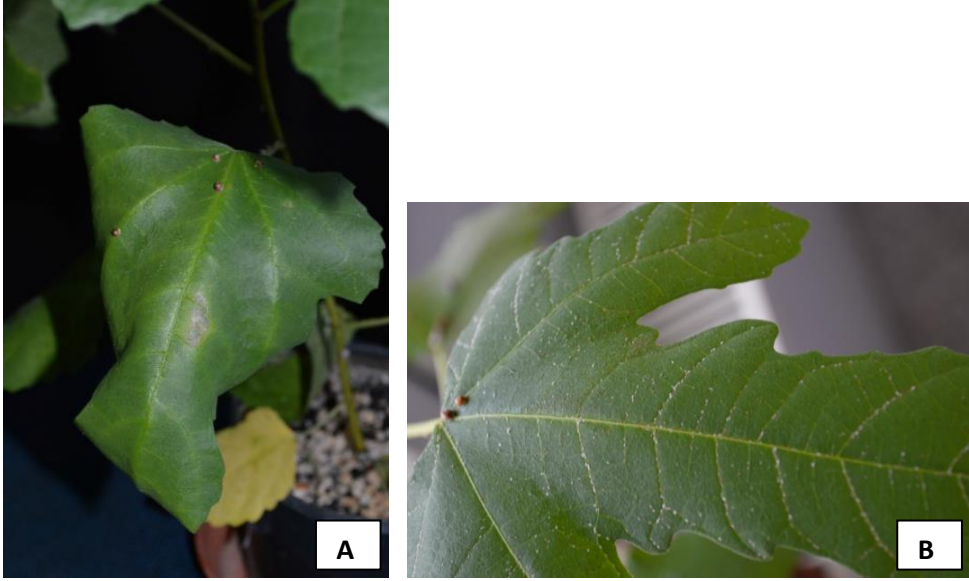
Şekil 4.3. *Aceria ficus* Cotte. ile taşıma yapılan bitkilerde ortaya çıkan renk açılmaları (A) ve sararma-damar nekrozu (B) belirtileri.

Çağlayan vd. (2012), *A. ficus* bireylerini incir ve test bitkilerine (*Cucumis sativus*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana occidentalis*, *C. roseus*, *Fraxinus excelsior*) taşımasının ardından incir ve *C. roseus* bitkisinde 10 gün ile 6 hafta arasındaki süreçte küçük sarı lekeler gözlemlerken diğer test bitkileri ve kontrol bitkilerinde hiçbir belirtmeye rastlamamışlardır. Credi vd. (2012), incir çöğürlerine ve *C. roseus* test bitkisine *A. ficus* bireylerini aktardıktan bir ay sonra hastalığın tipik mozaik belirtilerini gözlemiştir. Edremit, (2012), *A. ficus* ile taşıma sonrası *C. roseus* yapraklarında deformasyon, kloroz, yaprak deformasyonu ve yaprak ayasında çukurlaşma ile mozaik belirtileri, Sarılop ve Bursa siyahı incir yaprakları üzerinde mozaik ve pas belirtilerini elde etmiştir. Bu çalışma ile *A. ficus* ile yapılan taşıma denemeleri sonucu elde edilen belirtiler daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen belirtilerle paralellik göstermektedir.

#### **b) *Ceroplastes rusci* L. ile Yapılan Taşıma Denemeleri**

*C. rusci*'nin yoğun olarak gözlemlendiği 15 Ağustos tarihinden itibaren enfekteli incirlerden toplanan *C. rusci* hareketli 1. dönem nimfleri sağlıklı incir çöğürlerine

aktarıldıktan 30 gün sonra hastalık belirtileri gözlemlenmiştir. Daha sonra belirtiler tamamen belirginleşerek 12 bitkiden sekiz tanesinde yapraklarda sararma ve renk açılmaları şeklinde saptanmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. *Ceroplastes rusci* L. ile taşıma yapılan bitkilerde ortaya çıkan sararma (A) ve damar renk açılmaları (B).

Elbenio vd.(2009), *C. rusci* ile incirde yaptığı taşıma çalışmasında sadece moleküler alandaki bulgular belirtilirken taşıma sonrası ortaya çıkan belirtiler hakkında bilgi verilmemiştir. *C. rusci* ile taşıma sonrası elde ettiğimiz belirtiler İncir mozaik hastalığının tipik belirtileri ile benzerlik göstermektedir.

### 4.3. Total Nükleik Asit Miktarları

İzolasyonu yapılan 20 örneğin total nükleik asit miktarları Thermo Nanodrop cihazı ile 260/280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen değerler 1.7 ile 2.1 arasında bulunduğu için örneklerin protein ve diğer bileşikler yönünden temiz olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle aynı yöntemle izole edilen diğer total nükleik asitleri doğrudan RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

### 4.4. RT-PCR Çalışmaları

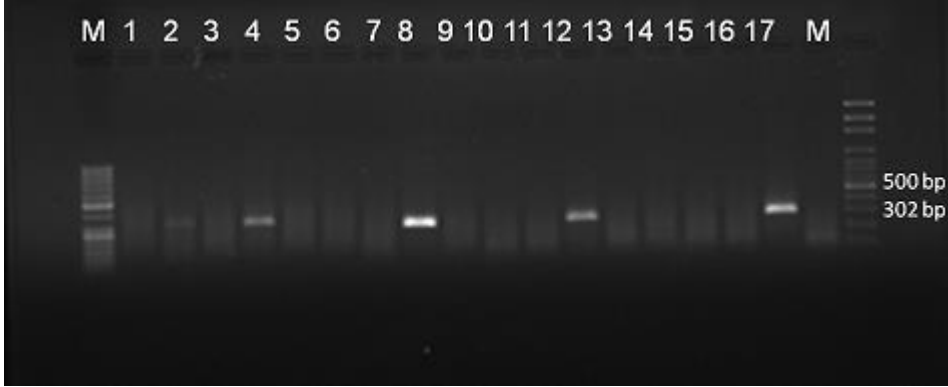
RT-PCR çalışmalarında, tohumdan yetiştirilen incir bitkilerinden, İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren incir bahçelerinden toplanan enfekteli bitki

yapraklarından, *A. ficus* ve *C. rusci* vektörleri ile taşıma yapıldıktan sonra belirti gösteren bitki yapraklarından ve *A. ficus* ile *C. rusci* bireylerinden elde edilen total nükleik asitler kullanılmıştır. İlk olarak iklim odalarında tohumdan yetiştirilen incir bitkileri 12 incir viral etmeninin primerleri ile RT-PCR ile analiz edilmiştir. Bunun sonucunda hiçbir virüs etmenine rastlanmamış böylece taşıma çalışmalarında kullanılan incir çöğürlerinin sağlıklı olduğu ortaya konulmuştur. Tohumdan yetiştirilen incir çöğürlerinde *Fig badnavirüs-1* (FBV-1)'ye rastlanmaması olasıdır. Çünkü Laney vd. (2012), FBV-1'nin bitki hücrelerine entegre olmayan episomal veya entegre formlarda olabileceğini bildirmektedir. RT-PCR sonucu test edilen incir çöğürlerinde FBV-1'nin bulunmamasının nedeni bitki hücrelerine entegre olmayan episomal formda olması ile ilişkilendirilebilir.

İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren incir bahçelerinden toplanan enfekteli bitki yapraklarından, *A. ficus* ve *C. rusci* vektörleri ile taşıma yapıldıktan sonra belirti gösteren bitki yapraklarından ve *A. ficus* ile *C. rusci* bireylerinden elde edilen total nükleik asitler FMV, FMaV, FLV-1, AFCV 1-2, FLMaV 1-2, FMaV, FBV-1, FFkaV spesifik primerleri kullanarak RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. İncir mozaik hastalığı belirtilerini gösteren incir bahçelerinden toplanan enfekteli bitki yapraklarının FMV, FLMaV-1 ve FMaV-1'i ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir.

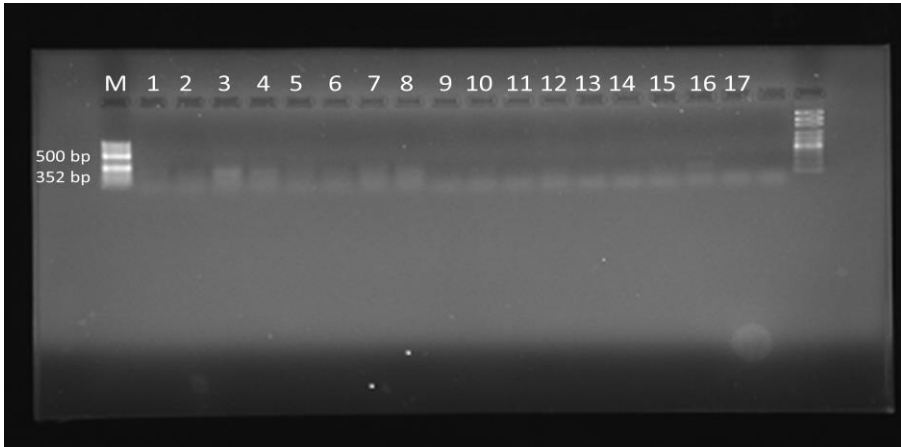
*A. ficus* ile taşıma sonrası belirtiler gösteren bitki yapraklarından elde edilen total nükleik asit ile yapılan RT-PCR sonucunda 302 bp ve 298 bp uzunluğunda elde edilen profilin *Fig mosaic virüs* (FMV) ve *Fig mosaic-associated virus-1* (FMaV-1)'ne ait olduğu belirlenmiştir.

Ancak moleküler uzunlukları yönünden birbirine yakın olan FMV (302 bp) ve FMaV-1 (298 bp) arasında sadece 808 ve 214 nts lik bir fark olması nedeniyle FMaV-1'in FMV'den ayrı bir etmen olarak ele alınmadığı Martelli vd. (2011), tarafından bildirilmiştir. Bunun için *A. ficus* ile taşıma sonrası belirtiler gösteren bitkilere ait yapraklardan RT-PCR yapıldığında FMaV-1 rastlanması yeni bir bulgu niteliğini taşımamaktadır. Sonuç olarak FMV'nin eriyofid akarlarla (*A. ficus*) incirden incire taşındığı bir kez daha tespit edilmiştir (Şekil 4.5.). Ayrıca *A. ficus* ile taşıma sonrası FLMaV-1' saptanmamıştır.



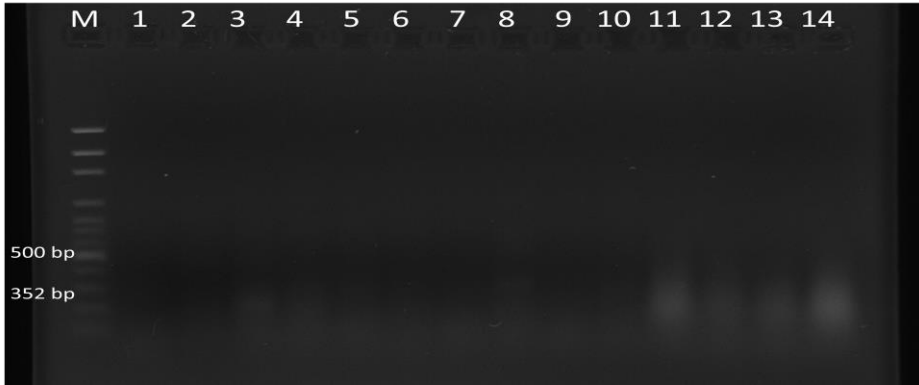
Şekil 4.5. *Aceria ficus* Cotte. ile taşıma sonrası incir çöğür yapraklarından yapılan RT-PCR'ın FMV'e özgü sonuçları, Marker:M; Negatif kontrol:1; FMV: 2,4,8,12; Pozitif kontrol:16.

*C. rusci* ile taşıma sonrasında yapraklardan elde edilen total nükleik asit ile RT-PCR yapıldığında FLMaV-1'e özgü 352 bp uzunluğunda bant elde edilirken (Şekil 4.6.) diğer incir viral etmenlerine ait herhangi bir profile rastlanmamıştır. *C. rusci* nin FLMaV-1 vektörlüğü ile ilgili yeni bir bulgu söz konusu olduğu için taşıma denemesi 2 yıl/2 tekkerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Böylece *C. rusci*'nin *Fig leaf mottle associated virüs-1* (FLMaV-1)'ü taşıyan vektör olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.6. *Ceroplastes rusci* L. ile yapılan taşıma sonrası incir yapraklarından yapılan RT-PCR'ın FLMaV-1'e sonuçları, Marker: M; Negatif kontrol:1 FLMaV-1 profili: 3,4; 16, Pozitif kontrol: 2.

Taşıma sonrası *C. rusci* bireylerinin böcek dokusundan yapılan RT-PCR ile FLMaV-1 için 352 bp uzunluğunda silik bantlar elde edilmiştir. Bunun sebebinin total nükleik asit izolasyonunda kullanılan yöntemden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İleriki dönemlerde yapılacak olan çalışmalarda ekstraksiyon metodunun *C. rusci*'ye özgü modifiye edilerek geliştirilmesi önerilebilir. Taşıma sonrası *C. rusci*'nin bünyesinde *Fig leaf mottle associated virüs-1*'e ait 352 bp uzunluğunda silik de olsa bir profilin belirlenmesi bu zararlının FLMaV-1'nin vektörü olabileceğinin göstergesidir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Taşıma sonrası *Ceroplastes rusci* L. bireylerinden yapılan RT-PCR'in FLMaV-1'e özgü sonuçları, Marker: M; Negatif kontrol:1; silik bant alınmış örneklere ait profiller: 3,8,11,12,13,14.

Elbenio vd. (2009), incir viral etmenlerinin (FLMaV-1 ve FLMaV-2) *C. rusci* dişi bireyleri ile taşımadığını RT-PCR ile saptamıştır. FLMaV-1 ve FLMaV-2'nin *C. rusci* ile taşımadığının belirlenmesinin taşıma sırasında ergin bireylerin tercih edilmesinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim asmada zararlı olan *C. rusci*'nin 1. nimf döneminde iki viral etmeni (GLRaV-3, GLRaV-5) taşıdığı DAS-ELISA testleri ile saptanmıştır (Mahfoudhi vd., 2009).

Bu çalışma kapsamında ise *C. rusci*'nin hareketli 1. nimf dönemleri kullanılmış ve taşıma sonrası bitki yapraklarından ve *C. rusci* bireylerinden yapılan RT-PCR sonucu FLMaV-1 tespit edilmiştir. Böylece ağustos ayında taşıma sonrası yapraktan ve böcek dokusundan yapılan RT-PCR ile hareketli 1. nimf dönemindeki *C. rusci* bireylerinin FLMaV-1 i taşıyan vektör olduğu saptanmıştır.

## 5. SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde incir ağaçlarında mozaik hastalık etmenlerinin neden olduğu kalite ve verim kayıplarını önlemek için her bir etmenin tanılanması ve bu etmenlerin ayrı ayrı yayılma ve taşıma yollarının belirlenmesi çok önemlidir. Ayrıca doku kültürü ve termoterapi yolu ile elde edilmiş sağlıklı üretim materyalinin korunabilmesi etmenlere ait taşıma yollarının engellenmesi ile bu tür çalışmaların ışığında mümkün olabilecektir. Fakat incir viral etmenlerinin taşıması ve vektörleri konusunda dünyada ve ülkemizde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada İncir mozaik hastalığı etmenlerinin *Aceria ficus* Cotte. ve *Ceroplastes rusci* L. ile taşıması araştırılmıştır.

2014-2015 yıllarında *A. ficus* mayıs sonu haziran başında doğada görülmeye başlanmıştır. 15 Eylül tarihinden itibaren popülasyonda artış gösteren *A. ficus* sağlıklı çöğürlere aktarılmış ve 10 gün sonra yapraklarda renk açılmaları ve sararma-damar nekrozu gözlenmiş ve %33 oranında taşıma olduğu belirlenmiştir. *C.rusci* ise 15 Ağustos tarihinden itibaren sağlıklı çöğürlere aktarım yapıldıkta 30 gün sonra belirtiler tamamen belirginleşerek yapraklarda sararma ve renk açılmaları şeklinde saptanmış ve %66 oranında taşıma belirlenmiştir.

İncir ağaçlarından toplanan enfekteli bitki yapraklarının, FMV, FMMaV, FLV-1, AFCV 1-2, FLMaV 1-2, FMaV, FBV-1, FFkaV'e ait spesifik primerler kullanarak RT-PCR çalışmaları sonucunda FMV, FLMaV-1 ve FMaV-1 ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. *A.ficus*'un ergin bireyleri ile taşıma sonrası belirtiler gösteren bitkilere ait yapraklardan RT-PCR sonucu *Fig mosaic virus* (FMV) ve *Fig mosaic-associated virus-1* (FMaV-1) için 302 bp ve 298 bp uzunluğunda bantlar elde edilirken FLMaV-1'e rastlanmamıştır. Bunun sonucunda FMV'nin *A.ficus* ile incirden incire taşındığı bir kez daha tespit edilmiştir.

*C. rusci*'nin hareketli 1.nimfi ile taşıma sonrası incir yapraklarından RT-PCR ile FLMaV-1'e özgü 352 bp uzunluğunda bant elde edilirken enfekteli bitkide saptanmış olan diğer incir viral etmenlerine ait PCR ürünü elde edilmemiştir. Taşıma sonrası *C. rusci* bireylerinin böcek dokusundan yapılan RT-PCR ile FLMaV-1'e ait yine 352 bp lik silik bantlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak; FMV, FMaV-1, FLMaV-1'in saptandığı enfekteli incir bitkilerinden alınan *C. rusci* ile iki yıl iki tekrarlı olarak yapılan taşıma sonrası, belirti gösteren incir çöğür yapraklarından ve *C. rusci* dokusundan yapılan RT-PCR sonucu 352 bp uzunluğunda bantların elde edilmesi hareketli 1. nimflerinin *C. rusci* bireylerinin *Fig leaf mottle associated virüs-1*'i taşıyan vektör olduğunu göstermiştir.



## KAYNAKLAR

- Açıkğöz, S. and M.T. Döken, 2003. The determination of sampling time for dsRNA isolation of the agent of fig mosaic disease prevalent in Aegean Region-Turkey. Proc. IInd IS on FIG. Eds. M. Lopez Corrales& M. J. Bernalte Garcia. **Acta Hort.**, 605: 307-310.
- Açıkğöz, S. ve M.T. Döken, 2001. İncir Mozaik Hastalığı Etmeninin Tanılanmasında dsRNA Analiz Yönteminin Kullanılması. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, 145s.
- Alfieri S. A., 1967. FIG MOSAIC, 19 Plant Pathology Circular No. 64 December 1967 Florida Department of Agriculture Division of Plant Industry.
- Anonim.,2012.<http://koop.gtb.gov.tr/data/5342b6b0487c8ea5e4b4d9bf/2013%20Kurur%20C4%B0ncir%20Raporu.pdf>
- Appiano, A., M. Conti and N. Zini, 1990. Cytopathological Study of the Double-Membrane Bodies Occurring in Fig Plants Affected by Fig Mosaic Disease. **XVI. International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases**, Roma-ITALY, 1 July 1995.
- Blodgett, E.C. ve B. Gömeç, 1967. FAO-UNSF Proje No:142 Ürün Araştırma ve Geliştirme Merkezi, İzmir.
- Bradfute, O. E., R. E. Whitmoyer and R. L. Nault, 1970. Ultrastructure of plant leaf tissue infected with mite-born viral-like pathogens. Proc. Electron Microsc. Soc. Amer., 28: 178-179.
- Condit, I. J. and W. T., Horne, 1933. A Mosaic of The Fig in California. **Phytopathology**, 23: 887-896.
- Credi , R., F. Terlizzi, R. Beber, C. Poggi Pollini, C. Ratti Transmission Trials Of The Fig Mosaic Disease Agent, 2012. **22nd “International Conference on Virus and Other Trandmissible Diseases of Fruit Crops”** ,(ICVF) Rome, June 3-8.

- Credi, R., 1998. Mite transmission of the fig mosaic disease agent to periwinkle. Abstracts **7th International Congress of Plant Pathology**, Edinburgh, Scotland 9-16 August 1998, Abst. 1.13.14.
- Çağlar, B.K, H.Fidan, M.E. Güldür, T. El Beaino, 2010. The Prevalence of Three viruses infecting Fig in Southern Turkey. **Journal of Phytopathology**, September 29: 1-3.
- Çağlayan K., Ç.U. Serçe, E. Barutçu, and S. Soylu, O.Çalışkan, 2010. Comparison by Sequence-Based and Electron Microscopic Analyses of Fig mosaic virus Isolates Obtained from Field and Experimentally Inoculated Fig Plants. **Plant Disease**, 94: 1448-1452.
- Çağlayan K., E. Elçi, Ç.U. Serçe, K. Kaya, M. Gazel and V. Medina, 2012. Detection of *Fig Mosaic Virus* in viruliferous eriophyid mite *Aceria ficus*. **Journal of Plant Pathology**, 94: 629-634.
- Çağlayan K., M. Gazel, Ç.U. Serçe, S. Soylu, S. Yalçın, 2007. Is a phytoplasma responsible for fig mosaic disease?. **Bulletin of Insectology**, 60: 149-150.
- Çakmak, İ. ve T. Akşit, 2003. Aydın İlinde İncir Ağaçlarında Zararlı Akar Türleri, Doğal Düşmanları Ve Önemlilerinin Popülasyon Değişimleri Üzerinde Araştırmalar , **Türk. Entomoloji Dergisi**, 27 (1) : 27-38.
- Edremit N.F., Açıkgöz S, 2011. Aydın Yöresinde İncir Mozaik Hastalığı ile İlgili İlk Rapor-**Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri** 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş (73).
- Edremit, N.F. ve S.Açıkgöz, 2011. Aydın Yöresinde İncir mozaik virüsünün Moleküler Tanınması ile İlgili İlk Rapor. **Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi**, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş, 73s.
- Edremit, N.F., 2012. Aydın İlinin Bazı İlçelerinde İncir Mozayik Hastalığının Yaygınlığının Belirlenmesi, Etmenin Tanınması Ve Üretim Materyalinin İncir Sürgün Ucu Kültürü-Termoterapi İle Etmenden Arındırılması (Doktora tezi).

- Elbeaino, M. Digiario, A. Alabdullah, A. De Stradis, A. Minafra, N. Mielke, M.A. Castellano and G.P. Martelli, 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease . **J. Gen.Virol.**, 90: 1281-1288.
- Elbeaino, T., Digiario, M. and Martelli, G.P., 2011. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family *Tymoviridae*. **Virus Research** 161: 198-202.
- Elbeaino, T., Digiario, M., De Stradis, A., Martelli, G.P.,2007. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. **Journal of Plant Pathology**, 89: 119-124.
- Elbeaino, T., Digiario, M., De Stradis, A.,Martelli, G.P.,2006. Partial characterization of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. **J. Plant Pathology**, 88: 187-192.
- Elbeaino, T., Digiario, M.; Martelli, G.P, 2012. RNA-5 and RNA-6, two additional negative-sense RNA segments associated with fig mosaic virus. **J. Plant Pathology**, 1, doi:10.4454/JPP. FA.2012.027.
- Elbeaino, T., R.A., Kubaa, M., Digiario, A., Minafra, G.P., Martelli, 2011. The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin DOI 10.1007/s11262-011-0581-0 *Virus Genes* (Epub ahead of print)
- Elçi, E., Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., 2012. Molecular Detection and Comparative Sequence Analysis of Viruses Infecting Fig Trees in Turkey **J. Phytopathology**, 160: 418–423.
- Flock, R. A. and J. M. Wallace. 1955. Transmission of fig mosaic by the eriophyid mite *Aceria ficus*. **Phytopathology**, 45: 52-54.
- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J., Candresse T., 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho,Capillo and Foveavirus by nested RT-PCR using degeneratedand inosine containing primers (DOP RT-PCR). **Acta Horticulturae**, 550: 37-43.

- Gattoni G., A. Minafra, M.A. Castellano, A. De Stradis, D. Boscia, T. Elbeaino, M. Digiario and G.P. Martelli, 2009. Some properties of fig latent virus 1, a new member of the family flexiviridae. **Journal of Plant Pathology**, 91: 555-564.
- Ishikawa, K.; Maejima, K.; Komatsu, K.; Kitazawa, Y.; Hashimoto, M.; Takata, D.; Yamaji, Y.; Namba, S., 2012. Identification and characterization of two novel genomic RNA segments of fig mosaic virus, RNA5 and RNA6. **J. Gen. Virol.**, 93:1612–1619.
- Laney, A. G., Hassan, M. and Tzanetakakis, I. E. 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. **Phytopathology**, 102:1182-1189.
- Mahfoudhi, N., Digiario M., Dhouibi M.H. 2009. Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). **Plant Disease**, 93:999-1002.
- Martelli G., 2011. Fig mosaic disease and associated pathogens. In: Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann W. (eds) *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*. Minnesota, USA, APS Press, 281–287.
- Martelli, G. P., M. A. Castelleano and R. Laforteza, 1993. An ultrastructural study of fig mosaic. **Phytopathology mediterranean**, 32: 33-43.
- Nakasone, W. and S. Kusakari, 1991. Occurrence and control of fig mosaic disease caused by mites. **Proc. Kansai Plant Prot.**, 33:116 (In Japanese).
- Nemoto, H.; Kobayashi, M.; Osawa, T.; Yamashita, S.; Doi, Y., 1980. Studies on eriophyid mites I. Two Eriophyid mites injurious to fig and chrysanthemum. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology** Vol.24 No.2: 49-53.
- Özalp, O. ve E. Heper, 1972. Ege Bölgesinde İncir Mozaik Virüsü Ve Bu Virüse Dayanıklı İncir Ağaçları Üzerinde Araştırmalar, **Bitki Koruma Bülteni**, 12 (4): 228-262.
- Özar, A. İ., P., Önder S., Özkut, M., Gündoğdu, A., Sarıbay, H., Genç, ve T. Azeri, 1986. Ege Bölgesi İncirlerinde Görülen Hastalık ve Zararlılara

Karşı Savaşım Olanaklarının Saptanması ve Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar, Bornova Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, Proje No: TOAG-429 No' lu TÜBİTAK Projesi, İzmir, 117.

Özsemerci, F. ve T. Akşit, 2003. Aydın ili incir ağaçlarında zararlı *Ceroplastes rusci* L. (Homoptera: Coccidae)'nin bazı biyolojik özellikleri ve populasyon değişimi, **Türk. Entomoloji Dergisi**, 27 (1) : 13-25.

Plavsic, B. and D. Milicic, 1980. Intracellular changes in trees infected with fig mosaic. **Acta Hort.** 110: 281-286.

Proeseler, G. 1972. Relationship between virus, vector and host plant shown by fig mosaic virus and *Aceria ficus* (Cotte). **Acta Phytopathol. Acad. Scient.**, 7:179-186.

Salomon, R. 2004. Stress-Related Expression of Virus Symptoms in Fig (*Ficus carica* L.). **Israel Journal of Plant Sciences**, 103-107.

Salomon, R., N. Voronov,. and M. Flishman, 2002. Characterization of The Fig Mosaic Virus: A Widely Speared But Little Known Virus, Dept. of Virology and Dept. of Fruit Trees. ARO. The Volcani Center. Bet Dagan 50250. ISRAEL.

Serrano, L., J.,Ramon, , J., Segarra, V., Medina, M. A. Achon, and M. Lopez, 2004. New Approach in the Identification of the Causal Agent of Fig Mosaic Disease. **XIX. International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases**, Valencia-SPAİN, 30 September 2004.

Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G., Bernard, G., 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. **J. Virol. Meth.** 55: 133-143.

Şahtiyancı, Ş. 1972. Bitki Virüs Hastalıkları (Prof.Dr. Maximillian Klinkowski) Özel Kısım Bölge Ziraî Araştırma Enstitüsü Erenköy, 155-156 S. İstanbul.

- Tzanetakakis, I.E; Laney, A.G.1; Keller, K.E.; Martin, R.R., 2010. New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. **21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops**, Julius-Kühn-Archiv, 427:79.
- Vashist, K.S. and B.B. Nagaich, 1968. *Aceria ficus* (Cotte.) as a vector of fig mosaic in India Indian. **Journal Entomology**, 30:322.
- Walia, J.J., N.M. Salem and B.W.Falk, 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA Virus Associated with Fig Mosaic. **Plant Disease**, Vol.93 No.10, p 4.
- Yakoubi S., A.Elleuch, N.Besaies, M.Marrakchi and H.Fakhkakh, 2007. First report of Hop Stunt Viroid and Citrus Exocortis Viroid on fig with symptoms of fig mosaic disease. **J. Phytopathology**, 155: 125-128.

## EKLER

### Ek:1 Yapraktan Total Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyon	Materyal
<b>Ezme Solüsyonu</b>	4M Guanidine thiocyanate 0.2 M NaOAc (pH:5.2) 25mM EDTA 1 M KOAc %2.5 PVP-40 Merkaptaethanol
<b>NaI (6M)</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> NaI
<b>Yıkama Solüsyonu</b>	Tris-HCL 110Mm 8pH: 7.5) 5M EDTA (0.5 M) NaCl 50mM (0.5 M) Ethanol %50
<b>Silica</b>	Silicon dioxide

### Ek:2 Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit Protokolü

İçerik	Miktar
<b>Verso enzim mix</b>	1 µl
<b>2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix</b>	25 µl
<b>RT Enchanter</b>	2,5 µl
<b>Forward primer (10 pmol/µl )</b>	1 µl
<b>Reverse primer (10 pmol/µl)</b>	1 µl
<b>Kalıp Dna/Rna</b>	3 µl
<b>Nüklease-free su</b>	16,5µl

### Ek:3 %1 'lik Agaroz Jel

50ml hacim için 0,5g agaroz tartılarak bir erlen içerisine konur. Üzerine 50ml hacimde 1X TBE tamponu konarak mikrodalga fırında eriyinceye kadar tutulur. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50 °C) soğuduktan sonra 2 mikrolitre safeview ilave edilir. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel tarağı yerleştirilir ve donması için 40 dk beklenir. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar

1X TBE tamponu ilave edilir. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği yerleştirilir.

**Ek:4** 10X TBE Buffer (1 LİTRE)

Tris-Base 54 g

Boric asit 27,5g

EDTA 7,44g

Tartılan kimyasaller saf su içerisinde özdürölmüřtür. Çözeltinin pH'sı 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 10X TBE buffer 1X olarak seyredikten sonra elektroforezde kullanılır.



## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Sevdıye YORGANCI

Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın/ 04.08.1986

### **EĞİTİM DURUMU**

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri  
Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Çine İlçe TARIM MÜDÜRLÜĞÜ - 2011/2012  
Adnan Menderes Üniversitesi- 2012- Devam ediyor

### **İLETİŞİM**

E-posta Adresi : sevdıyedmr@gmail.com

Tarih :