

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2013-DR- 001**

**AYDIN İLİNİN BAZI İLÇELERİNDE İNCİR MOZAİK
HASTALIĞININ BELİRLENMESİ,
ETMENİN TANILANMASI VE ÜRETİM
MATERYALİNİN İNCİR SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜ
TERMOTERAPİ İLE ETMEDEN ARINDIRILMASI**

Nazlı Funda EDREMİT

**DANIŞMAN
Pof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Nazlı Funda EDREMİT tarafından hazırlanan “Aydın İlinin Bazı İlçelerinde İncir Mozaik Hastalığının Yaygınlığının Belirlenmesi, Etmenin Tanılanması ve Üretim Materyalinin İncir Sürgün Ucu Kültürü-Termoterapi ile Etmenden Arındırılması” başlıklı tez, 20.12.2012 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. M. Timur DÖKEN	ADÜ
Üye :	Prof. Dr. Semih ERKAN	EGE
Üye :	Prof. Dr. Aynur GÜREL	EGE
Üye :	Prof. Dr. Ahmet ÇITIR	NKÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

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.

15/01/2013

Nazlı Funda EDREMİT

ÖZET

AYDIN İLİNİN BAZI İLÇELERİNDE İNCİR MOZAIK HASTALIĞININ YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ, ETMENİN TANILANMASI VE ÜRETİM MATERYALİNİN İNCİR SÜRGÜN UCU KÜLTÜRÜ-TERMOTERAPİ İLE ETMENDEN ARINDIRILMASI

Nazlı Funda EDREMİT

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Serap AÇIKGÖZ

2012, 119 sayfa

Türkiye, yaklaşık Dünya taze incir üretiminin % 26'sını, kuru incir üretiminin de % 59' unu karşılamaktadır. Yine Türkiye, Dünya'nın en önemli incir üreticisi olmanın verdiği avantajla, kuru incir üretiminde ve ihracatında da lider ülke konumundadır. Ayrıca Dünyanın en kaliteli siyah inciri olan “Bursa Siyahı”, sahip olduğu olağanüstü tat, sert meyve yapısı ve uzun raf ömrü ile Avrupa ülkelerinde her yıl artan miktarlarda talep edilmektedir. Türkiye’de incir üretiminin % 90’ından fazlasını oluşturan Sarılop çeşidinin en önemli üretim alanı, sahip olduğu özel iklimi nedeniyle Aydın yöresidir. Bu derece önemli dış satım ürünü incirin yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen “İncir mozaik hastalığı”, incir yetiştirilen tüm bölgelerde görülür. Ağaçlarda zayıflık, verim ve kalite düşüklüğüne neden olan bu hastalık, incir yapraklarında ve özellikle olgunlaşmamış meyvelerde kendini gösterir. İncir mozaik hastalığı, stres koşulları ve yüksek sıcaklıklarda özellikle fidanlarda şiddetini artırdığı ve kurumalarla birlikte ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmektedir. Bu araştırma İncir mozaik hastalığının Aydın İli’ndeki yaygınlığını belirlemek, hastalığa neden olan etmenleri tanılamaya yönelik moleküler ve biyolojik çalışmalar yapmak ve hastalık etmenlerinden temiz Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri elde etmek üzere planlanmıştır. Buna göre, Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde sörveyler gerçekleştirilmiş ve hastalığın incir bahçelerindeki durumu değerlendirilmiştir.

İncir mozaik hastalığı'na neden olduğu düşünölen etmenlerden, İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV), İncir mozaik ilişkili virüs-1 (Fig mosaic associated virus-1, FMaV-1), İncir mozaik ilişkili virüs-2 (Fig mosaic associated virus-2, FMaV-2), İncir yaprak leke ilişkili virüs-1 (Fig leaf mottle associated virus-1, FLMaV-1) ve İncir yaprak leke ilişkili virüs-2 (Fig leaf mottle associated virus-2, FLMaV-2) etmenlerinin primer çiftleriyle, yukarıda adı geöen ilçelerden alınan örnekler ile RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR testleri sonucunda Aydın izolatlarında FMV ile FMaV-1 viral etmenleri saptanmış ve DNA dizi analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılmış ve filogenetik akrabalıkları ortaya konmuştur. Ayrıca Aydın yöresi izolatları kullanılarak etmenin konukçu çevresi, bitki özsuyu taşınması ile belirlenmeye çalışılmış ve hastalık etmeninin incir tomurcuk akarı *Aceria ficus* Cotte. ile taşınma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sürgün ucu kültürü ve termoterapi yöntemleri ile sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir materyalleri elde edilmiş, hızlı ve güvenilir bir yöntem olan RT-PCR ile *in vitro* koşullarda elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir fidanları FMV ve FMaV-1 viral etmenleri yönünden temiz oldukları belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Sarılop, Bursa Siyahı, *Aceria ficus*, mekanik inokulasyon, FMV, FMaV-1, klonlama, dizi analizi, sürgün ucu, termoterapi

ABSTRACT

DISTRIBUTION OF FIG MOSAIC DISEASE IN SOME DISTRICTS OF THE AYDIN PROVINCE, IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT, ELIMINATION OF FIG MOSAIC BY FIG SHOOT-TIP CULTURES AND THERMOTHERAPY

Nazlı Funda EDREMİT

PhD. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2012, 119 pages

Turkey meets about 26% of world fresh fig production and 59% of dry fig production. With the advantage of being the most important fig producer in the world, Turkey is also the leader in dried fig production and its exportation. Besides, “Bursa Black”, is the highest quality black figcultivar in the world, receives an increasing demand from European countries because of its extraordinary taste, hard fruit structure and long shelf life. The most important production area of the Sarılop variety, which consists more than 90% of fig production Aydın province with its unique microclimate. Fig mosaic disease reduces growing potential of this key export product. This is a disease causing weakness in trees, and low yield and quality occur seen in all regions where figs are grown. Manifesting itself on fig leaves and particularly in unripe fruits, it is reported to increase its effects particularly in saplings under stress conditions with high temperatures and resulted in economic losses due to dryings. This study was to determine the prevalence of fig mosaic disease in the province of Aydın, molecular and biological studies to diagnose the disease-causing agents to make and factors of disease-free, Sarılop and Bursa Black Figs plants are planned to achieve. Accordingly, Nazilli, Germencik, İncirliova and Bozdoğan, counties Aydın province, surveys were carried out and the disease status of fig orchards. Fig mosaic disease are caused by factors of, Fig mosaic virus (FMV), Fig mosaic associated virus-1 (FMaV-1), Fig mosaic associated virus-2 (FMaV-2), Fig leaf mottle associated virus-1 (FLMaV-1) and Fig leaf mottle associated virus-2 (FLMaV-2) with their primer pairs factors, RT-PCR analysis was made.

As a result of RT-PCR tests, Aydın isolates, of FMV and FMaV-1 viral agents were identified and exhibiting their DNA sequence analysed. The results obtained were compared and the phylogenetic relatedness of isolates was stored in gene banks.

Besides by using Aydın isolates, to the host environment, transmission and storage of plant sap bud mite *Aceria ficus* Cotte. fig determine and causal agent. Studies were carried out with the relocation. Bu employing shoot tip culture and thermotherapy to virus free materials were obtained from healthy Sarılop and Bursa Black fig. By there fast and reliable methods, which are tested by RT-PCR *in vitro*, Sarılop and Bursa Black fig seedlings, determined that the FMV and FMaV clean in terms of viral factors.

Key words: Sarılop, Bursa Siyahı, *Aceria ficus*, mechanical inoculation, FMV, FMaV-1, cloning, sequence analysis, shoot tip, thermotherapy

ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (ZRF-10018 No'lu Proje) desteklenen araştırmamız, ülkemizde ve dünyada incir üretimi açısından çok önemli paya sahip Aydın İli' ndeki incir bahçelerinde incir mozaik hastalığının yaygınlığının belirlenmesi, hastalık etmeninin biyolojik (test bitkileri üzerine mekanik inokulasyon ve *Aceria ficus* Cotte. ile taşınma çalışmaları) ve moleküler karakterizasyonuna (dsRNA analizi, RT-PCR çalışmaları, klonlama ve dizi analizleri) yönelik yeni bulgular ve sürgün ucu kültürü-termoterapi yöntemlerini kullanarak temiz Sarılop ve Bursa Siyahı incir üretim materyalleri elde etmeye yönelik olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışması süresince bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim. Ayrıca tez süresince çalışmalarına katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi'nde bulunan diğer hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Timur DÖKEN ve Sayın Prof. Dr. Semih ERKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez jürimde bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL ve Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR'a doktora tezime katkılarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımdaya yardımcılarımdan ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım. Sürgün ucu kültürü ve termoterapi çalışmalarımdaya bana yardımcı olan Dr. Şadiye HAYTA'ya teşekkür ederim. Akar ile ilgili çalışmalarımdaya yol gösteren Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK'a teşekkür ederim. Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'nun değerli çalışanlarına, Aydın Tarım İl Müdürlüğü ve Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan Tarım İlçe Müdürlüklerine teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve beni destekleyen annem ve babama ve eşim Niyazi EDREMİT'e, ayrıca gösterdikleri büyük sabırdan dolayı eşime, oğullarım Cengiz EDREMİT ve Mehmet Doruk EDREMİT'e teşekkür ederim. Projemin yürütülmesinde çalışmalarımdaya maddi olanak sağlayan ADÜ Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxxı
EKLER DİZİNİ	xxxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3. 1. Materyal.....	23
3.1.1. Sörvey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler	23
3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	23
3.1.3. <i>Aceria ficus</i> Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınma Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	24
3.1.4. Toplam RNA İzolasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	24
3.1.5. Çift Sarmal RNA Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	25
3.1.6. Reverse Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	25
3.1.7. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	26
3.1.8. Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	26
3.1.9. Sürgün Ucu Kültürü ve Termoterapi Çalışmalarında Kullanılan Materyal.....	27
3. 2. Yöntem.....	28
3.2.1. İncir Virüslerini Tanılamada Kullanılan Yöntemler.....	28
3.2.2. Sörvey Çalışmaları, Örneklerin Toplanması ve Muhafazası.....	28

3.2.3. Tohumdan Sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	38
3.2.4. İncir Mozaik Hastalık Etmeninin Mekanik İnokulasyon ile Bazı Test Bitkilerine Taşınması.....	38
3. 2. 4. 1. Toprak hazırlığı.....	38
3. 2. 4. 2. Test bitkilerinin yetiştirilmesi.....	39
3. 2. 4. 3. Mekanik inokulasyon testinin uygulanması.....	39
3.2.5. İncir Mozaik Hastalık Etmeninin <i>Aceria ficus</i> Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınma Çalışmaları.....	41
3.2.6. İncir Mozaik Hastalığına Neden Olan Etmenlerin dsRNA Analizi.....	41
3.2.6.1. Fenol/Kloroform kullanılarak uygulanan CF-11 selüloz kolon yöntemi.....	42
3.2.6.2. Silica partikül süspansiyon yönteminin modifiye edildiği CF-11 selüloz kolon yöntemi.....	44
3.2.7. İncir Mozaik Hastalığına Neden Olan Etmenlerin Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Tanılanması.....	45
3.2.7.1. İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan yaprak örneklerinden Toplam RNA ekstraksiyonu.....	45
3.2.7.2. İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan örneklerden elde edilen dsRNA'ların denatürasyonu.....	46
3.2.7.3. Tamamlayıcı DNA (Cdna)'nın sentezi.....	46
3.2.7.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın PCR ile çoğaltılması.....	47
3.2.7.5. İncir mozaik ilişkili virüs 1 (FMaV-1) için toplam RNA'dan direkt olarak RT-PCR testi.....	47
3.2.8. Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)' nun da Sonuç Alınan İncir Viral Etmenlerinin Klonlama Çalışmaları.....	48
3.2.8.1. pUC 19 vektörü içeren <i>Escherichia coli</i> DH10B bakterisinden plazmid ekstraksiyonu.....	59

3.2.8.2. pUC 19 plasmid DNA'sının (klonlama vektörü) <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> endonükleaz enzimleri ile kesimi.....	50
3.2.8.3. İncir mozaik virüsü (FMV) primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA'ların <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> endonükleaz enzimleri ile kesimi.....	50
3.2.8.4. İncir mozaik ilişkili virüs 1 (FMaV-1) primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA'ların <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> endonükleaz ile kesimi.....	51
3.2.8.5. <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> endonükleaz enzimleri ile kesimleri yapılmış pUC19 plasmid DNA'sı ile FMV ve FMaV-1 primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA'ların presipitasyonu.....	51
3.2.8.6. Presipitasyonu yapılmış pUC19 plasmid DNA'sı ile FMV ve FMaV-1 primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA'ların ligasyonu.....	52
3.2.8.7. <i>Escherichia coli</i> DH10B bakteri hücrelerinin kompetent (alıcı) hale getirilmesi.....	52
3.2.8.8. Rekombinant bakteri kolonilerini belirleyen Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyerinin hazırlanması.....	52
3.2.8.9. pUC19 rekombinant vektörünün <i>Escherichia coli</i> DH10B bakterisine elektrotransformasyonu ve rekombinant kolonilerin seçimi.....	53
3.2.8.10. Beyaz kolonilerin (Rekombinant pUC19'a ilişkin) PCR analizleri.....	53
3.2.9. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....	54
3.2.10. İncir Mozaik Hastalığı ile Enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin Sürgün ucu Kültürü ve Termoterapi ile Arındırma Çalışmaları.....	54
3.2.10.1. Başlangıç kültürünün hazırlanması.....	54
3.2.10.2. Sürgün çoğaltımı.....	55
3.2.10.3. <i>In vitro</i> koşullarda elde edilen çoklu sürgünlere termoterapi uygulaması.....	55

3.2.10.4. Termoterapi uygulanmış çoklu sürgünlerin köklendirilmesi.....	55
3.2.10.5. <i>In vitro</i> elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkilerinin dış ortama alıştırmaları (Aklimatizasyon).....	56
3.2.10.6. <i>In vitro</i> elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkilerinin RT-PCR testleri.....	56
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	57
4.1. İncir Mozaik Hastalığının Aydın İli' nin Bazı İlçelerindeki İncir Bahçelerindeki Yaygınlık Durumuna İlişkin Bulgular.....	57
4.2. Test Bitkilerine Mekanik İnokulasyon Uygulaması.....	59
4.3. İncir Mozaik Hastalık Etmenlerinin <i>Aceria ficus</i> Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınmasına İlişkin Bulgular.....	69
4.4. İncir Mozaik Hastalığına İlişkin dsRNA İzolasyonuna ait Bulgular.....	73
4.5. İncir Mozaik Hastalık Etmenlerine İlişkin RT-PCR Bulguları.	82
4.6. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik Virüsü ile İlişkili Virüs-1'in Klonlanması.....	87
4.6.1. pUC 19 Vektörü İçeren <i>Escherichia coli</i> DH10B Bakterisinden İzole Edilen Plazmidin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine ait Bulgular.....	87
4.6.2. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik Virüsü ile İlişkili Virüs-1' e ait Amplikon DNA'ların <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine ait Bulgular.....	88
4.6.3. Rekombinant pUC19 Vektörünü Taşıyan <i>Escherichia coli</i> Bakteri Kolonilerinin Tespiti.....	88
4.6.4. <i>Escherichia coli</i> Bakteri Kolonilerinden Rekombinant Plazmidin İzolasyonu, İnsört ve PCR Analizi	89
4.7. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik İlişkili Virüs-1'e ait Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları.....	91
4.8. Sürgün Ucu Kültürü ve Termoterapi İle Sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Fidanlarının Elde Edilmesi.....	98

4.8.1. Başlangıç Kültürü, Çoklu Sürgün ve Küçük Bitkilerin Elde Edilmesi.....	98
4.8.2. <i>In vitro</i> Elde Edilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılmaları (Aklimatizasyon).....	100
4.8.3. <i>In vitro</i> Elde Edilen Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin RT-PCR Testleri.....	101
5. SONUÇ.....	102
KAYNAKLAR.....	105
EKLER.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	117

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	:	Santigrad derece
2-ME	:	2-Merkaptoetanol
A, G, C, T	:	Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
ACP ELISA	:	Acid Phosphatase Enzim-linked immunosorbent assay
AFCV-1	:	Arkansas fig closterovirus-1
AFCV-2	:	Arkansas fig closterovirus-2
BHI	:	Beyin kalp erylđi (Brain heart infusion)
BLAST	:	Basic local alignment search tool
Bp	:	Baz çifti (Base pair)
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleikacid
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
CIAP	:	Alkalin fosfataz
Da	:	Dalton
DAS-ELISA	:	Enzim-linked immunosorbent assay
dATP	:	Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	:	Deoksisitidintrifosfat
dGTP	:	Deoksiguanozintrifosfat
Dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleikacid
dNTP	:	Deoksinükleotidtrifosfat
dsRNA	:	Çift iplikli (Double stranded) ribonükleikacid
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EMERAV-GP	:	European mountain ash ringspot-associated virus
EMERAV-NP	:	European mountain ash ringspot-associated virus
FAO	:	Gıda ve Tarım örgütü (Food and Agriculture Organization)
FBV-1	:	Fig badnavirus-1
FCV	:	Fig cryptic virus
FLMaV-1	:	Fig leaf mottle associated virus-1
FLMaV-2	:	Fig leaf mottle associated virus-2
FLV-1	:	Fig latent virus-1

FMaV-1	:	Fig mosaic associated virus-1
FMaV-2	:	Fig mosaic-associated virus-2
FMMaV	:	Fig mild mottle associated virüs
FMV	:	Fig mosaic virus
g	:	Gram
IPTG	:	izopropiltiyogalaktozid
kb	:	kilo baz (kilo base)
KOAc	:	Potasyumasetat
L	:	Litre
M	:	Molarite
MCS	:	Çoklu klonlama bölgesi (Multiple cloning side)
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NaCl	:	Sodyum Klorür
NaK	:	Sodyum Potasyum
NaOAc	:	Sodyum asetat
NCBI	:	The national center for biotechnology information
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	:	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
Pmol	:	Pikomol
RNA	:	Ribonükleik asit
RNaz	:	Ribonükleaz
Rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RT	:	Tersine transkripsiyon (Reverse transcription)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
Taq	:	Taq polimeraz (<i>Taq</i> Polymerase)
U	:	Ünite
UV	:	Ultroviyole
V	:	Volt
W/V	:	Ağırlık/Hacim
WPM	:	Odunsu bitki ortamı (Woody Plant Medium)

X-gal	:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside
μg	:	Mikrogram
μl	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar
İMİ	:	İncir mozaik hastalığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ege Bölgesindeki antik yerleşim alanı Caria Bölgesi.....	1
Şekil 1.2. Aydın merkez ve ilçelerindeki toplam incir ağaç sayısı.....	3
Şekil 1.3. Aydın merkez ve ilçelerindeki incir üretim miktarları (ton).....	4
Şekil 1.4. İncir mozaik hastalığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler a) İncir yapraklarında sarı yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekeler b) İncir yapraklarında kenarları, pas renginde nekrozlu lekeler c) Küçük ve asimmetrik incir yaprakları d) Olgunlaşmamış incir meyveleri üzerinde sarı lekeler.....	6
Şekil 2.1. A) İncir Mozaik Hastalığı'nın incir yaprağında meydana getirdiği mozaik belirtisi B) Parankima hücrelerinde yer alan çift membranlı yapılar C) Çok esnek ipliğimsi partiküller D) Parankima hücrelerindeki kloroplastlarda (Ch) yer alan yarı sert ipliğimsi virüs benzeri yapılar (V).....	14
Şekil 3.1. pUC 19 plasmid vektörünün haritası.....	27
Şekil 3.2. Nazilli ilçesinde sömrey yapılan köyler.....	31
Şekil 3.3. Germencik ve İncirliova ilçelerinde sömrey yapılan köyler.....	32
Şekil 3.4. Bozdoğan ilçesinde sömrey yapılan köyler.....	33
Şekil 3.5. İncir yaprakları üzerindeki mozaik belirtilerine göre hazırlanmış olan 0-6 skalası 0: Belirti yok, 1: Zayıf mozaik 2: Orta şiddetli mozaik, 3: Şiddetli mozaik, 4: Damar bandlaşması, 5: Yaprak üzerinde pas belirtisi, 6: Küçük deforme yapraklar üzerinde şiddetli mozaik.....	34
Şekil 3.6. Tohumdan yetiştirilen Sarılop (a) ve Bursa Siyahı (b) incir fideleri.....	38
Şekil 3.7. İki yaşındaki Sarılop tüplü incir fidanı (a), iki yaşındaki Sarılop incir fidanı kökleri (b) ve iki yaşındaki Bursa Siyahı incir fidanı kökleri (c).....	40
Şekil 4.1. Sarılop incir çeşidine ait genç sürgünlerdeki şiddetli mozaik belirtisine sahip yapraklar.....	58
Şekil 4.2. Bursa Siyahı incir çeşidi meyvelerinde meydana gelen mozaik belirtileri.....	58
Şekil 4.3. Şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun <i>Cucumis sativus</i> L. yapraklarında oluşturduğu, klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları.....	61

- Şekil 4.4. Damar bandlaşması belirtisine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cucumis sativus* L. yapraklarında oluşturduğu lokal lekeler ve şekil bozuklukları..... 61
- Şekil 4.5. Pas belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cucumis sativus* L. yapraklarında oluşturduğu, klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları..... 62
- Şekil 4.6. Orta ve Şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun, *Gomphrena globosa* L.'ya inokulasyonundan sonra meydana gelen klorotik lokal (a,b) ve sistemik kırmızı lekeler (c)..... 63
- Şekil 4.7. Damar bandlaşması belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun, *Gomphrena globosa* L.'ya inokulasyonundan sonra meydana gelen; a) kırmızımsı kahverengi lokal lekeler b) nekrotik lekeler c) sağlıklı bitki..... 63
- Şekil 4.8. Damar bandlaşması belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Chenopodium amaranticolor* L. yapraklarına mekanik inokulasyonundan sonra meydana gelen klorotik lokal (a) ve nekrotik lekeler (b)..... 64
- Şekil 4.9. Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Chenopodium amaranticolor* L. yapraklarına mekanik inokulasyonundan sonra meydana gelen mozaik belirtileri..... 65
- Şekil 4.10. Pas belirtilerine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cataranthus roseus* L. yapraklarına, inokulasyonundan 8-10 gün sonra meydana gelen klorotik lekeler..... 66
- Şekil 4.11. Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cataranthus roseus* L. yapraklarına inokulasyonundan 3 hafta sonra yapraklarda meydana gelen mozaik ve şekil bozukluğu belirtileri..... 67
- Şekil 4.12. Mozaik belirtileri gösteren Sarılop incir yapraklarında bulunan *A. ficus* erginlerinin, *Catharanthus roseus* L. yapraklarında meydana getirdiği şekil bozukluğu ve kloroz..... 69

- Şekil 4.13. Mozaik belirtileri gösteren Bursa Siyahı incir yapraklarında bulunan *A. ficus* erginlerinin *Chataranthus roseus* L. yapraklarında meydana getirdiği yaprak ayasında çukurlaşma belirtisi..... 70
- Şekil 4.14. Mozaik belirtileri gösteren Sarılop incir yapraklarında bulunan *A. ficus* erginlerinin *Chataranthus roseus* L. yapraklarında meydana getirdiği mozaik belirtileri..... 70
- Şekil 4.15. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçaları ile taşıma çalışmaları sonrası Bursa Siyahı incir bitkilerinde meydana gelen mozaik belirtileri..... 71
- Şekil 4.16. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçalarının sağlıklı Sarılop incir bitkilerine aktarıldıktan sonra meydana gelen mozaik belirtileri..... 71
- Şekil 4.17. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçalarının sağlıklı Bursa Siyahı incir bitkilerine aktarıldıktan sonra meydana gelen pas belirtisi 72
- Şekil 4.18. Sarılop ve Bursa Siyahı incir örneklerinin dsRNA izolasyonu sonucunda elde edilen band profil sayıları..... 77
- Şekil 4. 19. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2 ve 3; 3 banda sahip dsRNA profili, 7,8,9 ve 10; 4 banda sahip dsRNA profili..... 78
- Şekil 4.20. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2; 3 banda sahip dsRNA profili, 3 ve 8; 1 banda sahip dsRNA profili, 4; 2 banda sahip dsRNA profili, 13; 6 banda sahip dsRNA profili, 14 ve 15; 4 banda sahip dsRNA profili..... 78
- Şekil 4.21. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; 3 banda sahip dsRNA profili, 2,3,4 ve 5; 2 banda sahip dsRNA profili..... 79
- Şekil 4.22. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2,4 ve 5; 2 banda sahip dsRNA profili, 3; 3 banda sahip dsRNA profili, 7; 1 banda sahip dsRNA profili..... 79

- Şekil 4.23. *Aceria ficus* Cotte. aktarılmış bitkilere ait dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1)*Aceria ficus* taşınmış ve kloroz belirtisi göstermiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 2)*Aceria ficus* taşınmış ve yaprak şekil bozukluğu belirtisi göstermiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 3)*Aceria ficus* taşınmış ve pas belirtisi göstermiş Sarılop incir çöğürü, 4) *Aceria ficus* taşınmış ve şiddetli mozaik belirtisi göstermiş Sarılop incir bitkisi, 5)*Aceria ficus* taşınmış ve pas belirtisi göstermiş Bursa Siyahı incir bitkisi, 6)*Aceria ficus* taşınmış ve şiddetli mozaik belirtisi göstermiş Bursa Siyahı incir bitkisi..... 81
- Şekil 4.24. RT-PCR analizi sonucunda İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik ilişkili virüs-1 viral etmenleri ile enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı incirlerine ait örnek sayıları..... 83
- Şekil 4.25. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen total RNA'ların, İncir mozaik virüsü primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 83
- Şekil 4.26. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen toplam RNA'ların, İncir mozaik virüsü primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri 83
- Şekil 4.27. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen total RNA'ların, İncir mozaik ilişkili virüs-1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17; Sarılop FMaV-1 pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 29; Bursa Siyahı FMaV-1 pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 87
- Şekil 4.28. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik virüsü primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2-19; FMV pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 87

- Şekil 4.29. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik virüsü primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2-13; İncir mozaik virüsü pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 84
- Şekil 4.30. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik virüsü primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11; İncir mozaik virüsü pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 85
- Şekil 4.31. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen dsRNA'ların, FMV primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11; FMV pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri..... 85
- Şekil 4.32. *Aceria ficus* Cotte. ile İncir mozaik hastalık etmeni taşınmış bitkilerin RT-PCR test sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2; Sarılop inciri bitkisi, 3; Bursa Siyahı incir bitkisi, 4; Yaprak şekil bozukluğu belirtisi meydana gelmiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 5; Kloroz belirtisi meydana gelmiş *Catharanthus roseus* bitkisi..... 86
- Şekil 4.33. *Escherichia coli* DH10B bakterisinden izole edilen plazmidin *EcoRI* ve *XbaI* endonükleazlar ile kesimi, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 23, 26 numaralı bandlar kesim öncesi, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27 numaralı bandlar kesim sonrası..... 87
- Şekil 4.34. *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi yapılmış İncir mozaik virüsüne ait ampikon DNA, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 1, 3, 5, 7, 9; kesim öncesi, 2, 4, 6, 8, 10 kesim sonrası DNA profili..... 88
- Şekil 4.35. *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi yapılmış İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1'e ait ampikon DNA, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 1, 3, 5, 7; kesim öncesi, 2, 4, 6, 8 kesim sonrası DNA profili..... 88

Şekil 4.36. Ampisilin-Xgal-IPTG'li besi yerinde rekombinant <i>Escherichia coli</i> bakteri kolonilerinin seçimi.....	89
Şekil 4.37. <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleriyle kesilmiş rekombinant plazmidde ait band profilleri. M, Markör (Lambda DNA/ <i>Pst</i> I), FMV; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 numaralı bandlar kesim öncesi, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23 numaralı bandlar kesim sonrası. FMaV-1; 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 numaralı bandlar kesim öncesi, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 numaralı bandlar kesim sonrası.....	90
Şekil 4.38. Klonlama sonrası FMV ve FMaV-1 örneklerine ait band profilleri. M; 700bp, FMV; 1-14 arası ile 16, 17, 18, 20, 22 numaralar klonlanmış örnekler, 15 numaralı örnek negatif kontrol, 19, 21 numaralar klonlanamamış örnekler, FMaV-1; 23-29 arası klonlanmış örnekler.....	90
Şekil 4.39. FN666274.1 erişim numaralı FMV-1 izolatının dünyada kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması.....	92
Şekil 4.40. FN666274.1 erişim numaralı FMV-1 izolatının, FMV'ye ait filogenetik soy ağaçtaki yeri	93
Şekil 4.41. CAQ03479.7 erişim numaralı FMV-2 izolatının dünyada kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması.....	94
Şekil 4.42. CAQ03479.7 erişim numaralı FMV-2 izolatının, FMV'ye ait filogenetik soy ağaçtaki yeri	95
Şekil 4.43. FJ211073.1 erişim numaralı FMV-3 izolatının dünyada kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması.....	96
Şekil 4.44. FJ211073.1 erişim numaralı FMV-3/FMV-4 izolatlarının, FMaV'ye ait filogenetik soy ağaçtaki yeri.....	97
Şekil 4.45. Sürgün ucu kültürü ile küçük incir bitkiciği elde edilmesi; a,b) Sürgün ucu, c) Kallus başlangıcı, ç,d,e,f) Kallus oluşumu, g,h) Çoklu sürgün oluşumu, ı,i) Kök gelişimi sağlanmış incir bitkiciği.....	99
Şekil 4.46. <i>In vitro</i> elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri; a,b,c) dış ortama alıştırma (aklimatizasyon) d,e,f) toprak: torf: perlit (2:1:1) karışımı içeren plastik saksılara aktarılmış bitkiler, g,h) sürgün ucu kültürü ve termoterapi uygulanarak elde edilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri.....	100

Şekil 4.47. *In vitro* elde edilmiş incir bitkilerinin FMV ve FMaV-1 primerleri ile yapılmış RT-PCR sonrası jel elektroforezindeki görüntüsü. M; Markör, 1; FMV pozitif kontrol, 2-6 arası FMV'den temiz *in vitro* Sarılop incirleri, 7-11 arası FMV'den temiz *in vitro* Bursa Siyahı incirleri, 16; FMaV-1 pozitif kontrol, 17-21 arası FMaV-1'den temiz *in vitro* Sarılop incirleri, 22-26 arası FMaV-1'den temiz *in vitro* Bursa Siyahı incirleri..... 101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya kuru incir üretim miktarları (ton) (Anonim, 2010a)...	2
Çizelge 2.1. İncir mozaik hastalığının hafif, orta ve kuvvetli İncir Mozaik Hastalığı belirtisi gösteren incir ağaçlarının belirti farklılıkları nedeniyle, meyve veriminde meydana gelen farklar (Özalp ve Heper,1972).....	10
Çizelge 2.2. İncir mozaik hastalığının konukçu çevresini belirlemek amacıyla yapılan mekaniksel inokulasyonda kullanılan test bitki türleri, inokulum kaynağı enfekteli 5 incir çeşidi ve meydana gelen belirtiler (Serrano vd., 2004).....	12
Çizelge 2.3. İncir Mozaik Hastalığına neden olan onbir viral etmene ait isim, literatür, primer baz dizilimi ve ampikon büyüklükleri.....	19
Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyon testinde kullanılacak indikatör bitkilerin isimleri, inokule edildiği dönem ve literatür bilgileri.....	24
Çizelge 3.2. FLMaV-1,FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 etmenlerine ait primer baz dizileri, beklenen PCR ürünü büyüklüğü ve literatür bilgisi.....	26
Çizelge 3.3. Çiftçi Kayıt Sistemine göre Aydın İlçelerine ait ağaç ve bahçe sayıları (Anonim, 2009).....	29
Çizelge 3.4. İncir mozaik hastalığının yaygınlığını belirlemek için sörvey yapılan ilçeler, ilçelere bağlı köyler, sörvey yapılan bahçe sayısı, incelenen ağaç sayısı ve rakım değerleri.....	35
Çizelge 3.5. Aydın İli Nazilli, Germencik, İncirlioiva ve Bozdoğan ilçelerinde sörvey yapılan köyler, bahçeler, incelenen ağaç sayısı ve incir çeşitlerine göre toplanan örnek sayıları.....	36
Çizelge 3.6. Mekanik inokulasyonda kullanılmak üzere 0-6 skalasına göre gruplandırılmış Sarılop ve Bursa Siyahı incir inokulum kaynakları.....	40
Çizelge 3.7. FLMaV-1, FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 etmenlerinin PCR koşulları (sıcaklık dereceleri ve süreleri) ve döngü sayıları...	48
Çizelge 3.8. FMV ve FMaV-1 etmenlerinin, <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> kesim noktaları eklenen primer çiftlerine ait baz dizilimleri.....	49

Çizelge 4.1. Sörvey yapılan ilçelerden 0-6 Skalasına göre toplanan ve çalışmada kullanılan Sarılop ve Bursa Siyahı incir yaprak örnek sayıları.....	59
Çizelge 4.2. İncir mozaik hastalık etmeni veya etmenlerine ait mekanik inokulasyon testlerine ait bulgular.....	68
Çizelge 4.3. dsRNA izolasyonuna tabi tutulan örnek sayısı, çeşit ismi, belirti şekli, inokulum kaynağı, dsRNA profiline ait band sayıları ve örneğin alındığı ilçe.....	74

EKLER DİZİNİ

Ek. 3.1. Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar.....	113
Ek. 3.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	114

1.GİRİŞ

İncir, anavatanı doğu Akdeniz ve güneybatı Asya (Türkiye'den Afganistan'a kadar) olan, ağaç ya da ağaççık nitelikli bir bitki türü ve bu türün meyvesidir. Dutgiller (Moraceae) familyasına dâhil olan incirin, botanik ismi *Ficus carica*'dır. Adını Ege Bölgesindeki antik yerleşim alanı Caria'dan alan incir (Şekil 1.1), Anadolu ve Ege'de binlerce yıllık bir geçmişe sahiptir. Eski Yunan ve Mısır uygarlıklarında verimlilik sembolü olarak kabul edilen incirin Anadolu'daki kültürünün insanlık kültürü kadar eski olduğunu, Herodotos M.Ö. 484 yılında yazdığı yazılarda belirtmiştir.



Şekil 1.1. Ege Bölgesindeki antik yerleşim alanı Caria Bölgesi

Anadolu ve Ege' nin bütün medeniyetlerinde yer alan incir, nesiller boyu hep bolluğun, bereketin simgesi olmuş dinsel kitaplarda yer alışıyla da kutsal bir nitelik kazanmıştır (Anonim, 2011). İncir meyvelerinin besin değeri oldukça yüksek olup bileşimini % 30–40 şeker, A,B ve C vitaminleri oluşturmaktadır. Çok lifli bir besin olan incir; sodyum, potasyum, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve demir mineralleri açısından da oldukça zengindir.

Özellikle kuru incirde omega-3,omega-6 yağ asitleri ve protein bulunmaktadır (Anonim, 2011). Gerek kuru, gerekse taze olarak tüketilen incirin, insan beslenmesindeki öneminin yanı sıra, ülke ekonomisine katkısı her geçen yıl artarak devam etmektedir. Ayrıca, incirin en yoğun yetiştiriciliğinin yapıldığı Aydın İli' nde dağlık alanların ekonomik anlamda değerlendirilmesi sonucu yarattığı istihdam ile sosyo-ekonomik açıdan da oldukça değerli bir üründür (Özden, 2008).

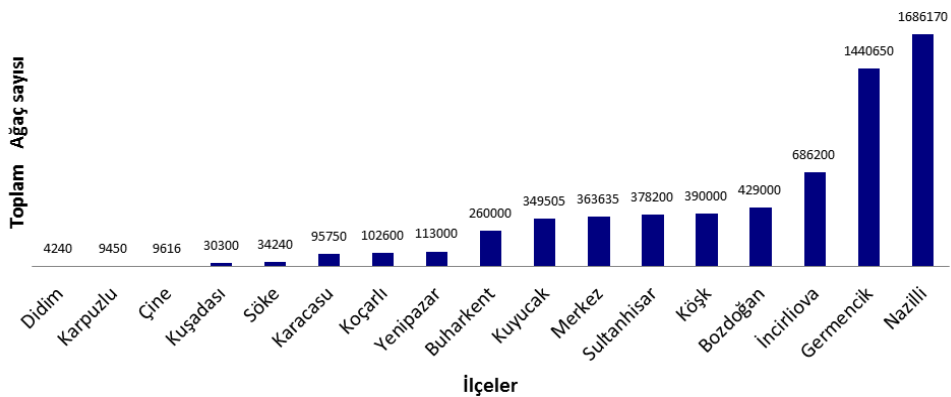
Çizelge 1.1. Dünya kuru incir üretim miktarları (ton) (Anonim, 2010a)

YILLAR ÜLKELER	2006/2007	2007/2008	2008/2009	2009/2010
Türkiye	60.393	48.012	50.604	56.590
İran	43.000	25.000	22.000	23.000
ABD	12.000	13.100	11.000	12.000
Yunanistan	12.000	10.000	8.000	9.000
İspanya	3.500	5.000	4.500	5.000
İtalya	5.000	4.000	4.000	4.000
TOPLAM	135.893	105.112	100.104	109.590

Kaynak: T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Teşkilatlandırma Genel Müdürlüğü, 2010 yılı İncir Raporu.

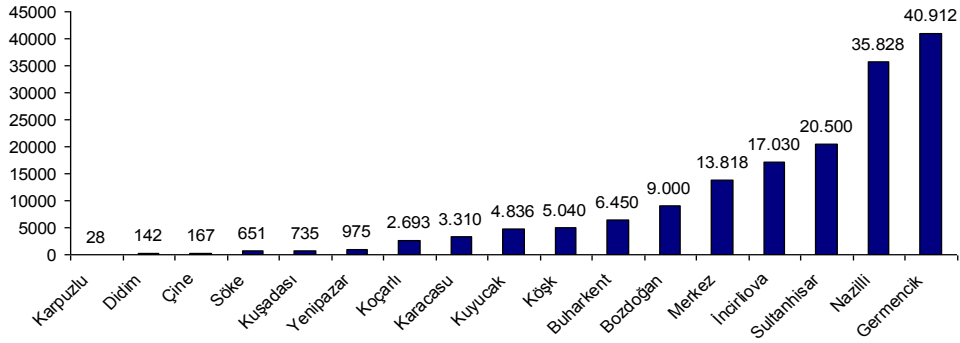
Ekolojik koşulların uygunluğu ile incirin en önemli gen merkezlerinden biri olan Türkiye, FAO verilerinin 2006-2010 yılları arasındaki ortalama değerlerine göre 265.210 ton üretim ile dünya yaş incir üretiminin yaklaşık % 25'ini karşılayarak ilk sırada yer almaktadır. Türkiye'yi Mısır (194.847 ton), İran (80.174 ton), Cezayir (75.080 ton), Fas (73.265 ton), Suriye (46.852 ton), ABD (43.298 ton) ve İspanya (35.500 ton) takip etmektedir (Anonim, 2010a). Dünya taze incir üretiminde büyük bir paya sahip olmanın verdiği avantaj ile kuru incir üretimi ve ihracatında da Türkiye 56.590 ton üretim (Çizelge 1.1) ile dünya üretiminin yarısını karşılayarak, bu alanda en çok üretim yapan ülke konumundadır (Anonim, 2010a).

İncir üretimi ülkemizde hemen her bölgede yapılabilmesine karşın, üstün nitelikli kurutmalık incir, iklim koşulları, özellikle meyve olgunlaşma ve kurutma mevsimindeki sıcaklık, nem ve rüzgar durumu gibi ekolojik istekleri nedeni ile Ege Bölgesi'nde Büyük ve Küçük Menderes Havzalarında yetiştirilmektedir. Birçok özelliği nedeniyle üreticiler tarafından tercih edilen Sarılop, yetiştirilen tüm çeşitlerin yaklaşık % 90'nı oluşturmaktadır (Anonim, 2010a). Türkiye genelinde ise Aydın İli, kaliteli incir üretimi ve sahip olduğu incir ağacı varlığına bağlı kapasite üstünlüğü ile kuru incir üretiminde ilk sırada yer almakta ve ülkemizin ihraç ettiği incirin % 65'ini karşılamaktadır.



Şekil 1.2. Aydın merkez ve ilçelerindeki toplam incir ağaç sayısı

Kurutmalık incirin ticari anlamda yetiştiriciliği tümüyle Aydın dağlarının her iki yöndeki yamaçları ile kır ve taban arazilerde yapılmaktadır. Aydın İli'nde ise merkez ve ilçeler dikkate alındığında toplam ağaç sayısı bakımından Nazilli ilçesi 1.686.170 adetle birinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2). Nazilli ilçesini sırasıyla, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçeleri takip etmektedir (Anonim, 2010b).



Şekil 1.3. Aydın merkez ve ilçelerinde incir üretim miktarları (ton)

Aydın merkez ve ilçelerindeki incir üretim miktarları ise Şekil 1.3’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi Germencik ilçesi 40.912 ton ile ilk sırada yer almaktadır. Germencik ilçesinden sonra 35.828 ton ile Nazilli, 20.500 ton ile Sultanhisar ve 17.030 ton ile İncirliova ilçeleri gelmektedir (Anonim, 2010b). Türkiye taze incir ihracatında söz konusu olan en önemli incir çeşidi, Bursa ve yöresinde yoğun olarak yetiştirilen, fakat son yıllarda Aydın, Muğla, İzmir gibi sahil kuşağında üretimi artan Bursa Siyahı incir çeşididir. Bursa Siyahı meyveleri iri ve gösterişli, kabuk rengi ile albenili sofralık bir çeşit olup Avrupa ülkelerinde her yıl artan miktarlarda talep edilmekte ve taze olarak tüketilmektedir.

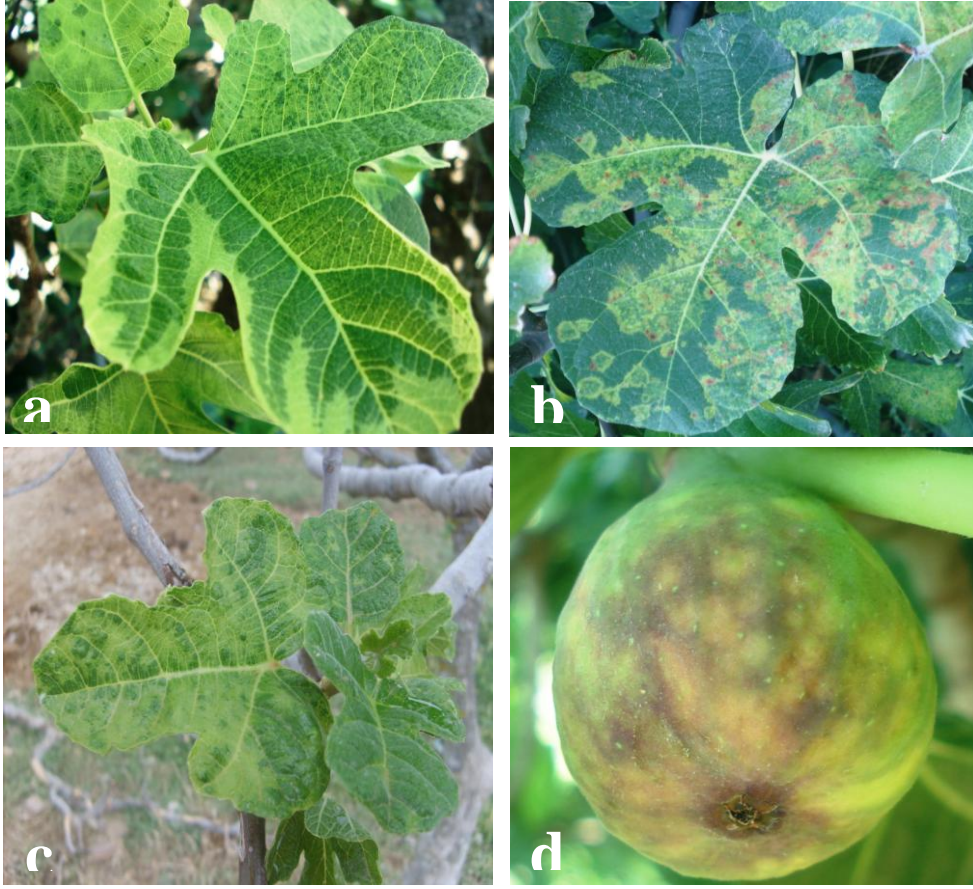
Hem kurutmalık hemde yaş olarak tüketilen, üstün kaliteli incir üretimi yapılan kapama bahçelerde ve son yıllarda incir üretiminde devreye giren fidanlıklarda bitki koruma açısından ciddi bir takım problemlerle karşılaşmaktadır. Bu problemlerden biri de viral etmen veya etmenlerin neden olduğu düşünülen “İncir mozaik hastalığı (İMH)” dır. Hastalık, dünyada incir yetiştiriciliği ve üretimi yapılan hemen her yerde, başta subtropik ve ılıman iklim kuşağına sahip özellikle Akdeniz ülkelerinde görülmektedir (Al-Mughrabi ve Anfoka, 2000, Serrano vd., 2004).

İncir mozaik hastalığı, aşı, çelik ve Eriophyidae (Acarina) familyası akarlarından *Aceria ficus* Cotte. ile taşınmakta (Flock ve Wallace, 1955) ve ayrıca mekanik olarak da taşınabildiği belirtilmektedir (Salomon vd., 2002, Serrano vd., 2004, Salomon vd., 2005).

İMİH etmeni tohumla taşınmamaktadır (Flock ve Wallace, 1955). İMİH, incir yetiştirilen tüm bölgelerde görülen, ağaçlarda zayıflık, verim ve kalite düşüklüğüne neden olan bir hastalıktır (Nakasone ve Kusakari, 1991, Salomon vd., 2005, Yakubi vd., 2007).

İMİH'nin karakteristik belirtisi; yapraklarda sarı yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükteki mozaik lekeleridir (Şekil 1.4a) (Alfieri, 1967). Bu lekelerin kenarları, pas renginde veya kırmızı-kahverengi zaman zaman da nekrozlar şeklinde olabilmektedir (Şekil 1.4b) (Alfieri, 1967). Bununla beraber, yaprakların normalden daha küçük ve asimetrik olduğu (Şekil 1.4c), olgunlaşmamış meyve üzerinde sarı ve renksiz lekelerin görüldüğü (Şekil 1.4d), ancak; bu lekelerin meyve olgunlaşmasıyla kaybolduğu belirtilmektedir (Açıkgöz ve Döken, 2001). Bu belirtilerin şiddetli olması durumunda hastalığın zamansız meyve ve yaprak dökümüne neden olabileceği de ifade edilmektedir (Salomon vd., 2005). Ayrıca, incir sürgünlerinin eğilip bükülmesi, budanması ve ardından sıcak hava ile ağır strese girmesi sonucu, etmenin latent durumdan çıkıp, hızlı bir şekilde çoğaldığı bildirilmektedir (Salomon, 2004).

İMİH etmenin viral kaynaklı olabileceği biyolojik (Serrano vd.,2004), serolojik (Serrano vd., 2004, Salomon vd., 2005) ve dsRNA analiz (Falk ve Salem, 2006) bulguları sonucunda belirlenmiştir. İMİH' ye neden olan etmenin moleküler tanımlanmasına yönelik yapılan çalışmalar ise bir veya birden fazla viral etmenin bu hastalığı meydana getirdiği sonucunu ortaya koymuştur. Şöyleki; İtalyan araştırmacılar İMİH' ye neden olan etmenler grubunda İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 (Fig leaf mottle associated virus 1, FLMaV-1), İncir yaprak benek ilişkili virüs 2 (Fig leaf mottle associated virus 2, FLMaV-2 (Elbeaino vd., 2006), İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV RNA-1, 2, 3, 4) (Elbeaino vd., 2009)' ün yer aldığını belirlemişlerdir. Daha sonra İncir mozaik ilişkili virüs 1 (Fig mosaic associated virus 1, İncir mozaik ilişkili virüs 2 (Fig mosaic associated virus 2, FMaV-2) (Walia vd., 2009), İncir latent virüsü (Fig latent virus 1, FLV-1) (Gattoni vd., 2009), İncir hafif benek ilişkili virüs 1 (Fig mild mottle-associated virus 1, FMaV-1) (Elbeaino vd., 2010), Arkansas incir closterovirüs 1 (Arkansas fig closterovirus-1, AFCV-1), Arkansas incir closterovirüs 2 (Arkansas fig closterovirus-2, AFCV-2) (Tzanetakakis vd., 2010), İncir banda virüsü 1 (Fig badnavirus 1, FBV-1) (Tzanetakakis vd., 2010) ve İncir kriptik virüs (Fig crytic virus, FCV) (Elbeaino vd., 2011).



Şekil 1.4. İncir mozaik hastalığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler a) İncir yapraklarında sarı yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekeler b) İncir yapraklarında kenarları, pas renginde nekrozlu lekeler c) Küçük ve asimetric incir yaprakları d) Olgunlaşmamış incir meyveleri üzerinde sarı lekeler

Ülkemizde ise İMH'ye neden olan etmenin tanılanmasına yönelik ilk çalışma Özalp ve Heper (1972) tarafından, Ege Bölgesinde incir mozaik hastalığının genel dağılımı ve çeşitlerin dayanıklılık reaksiyonları üzerine gerçekleştirilmiştir. İMH etmeninin tanılanmasında dsRNA analiz yöntemi Açıkgöz ve Döken (2001) tarafından kullanılmıştır. Bu araştırma sonucunda enfekteli bitkilerden elde edilen dsRNA profilinin gerek bant sayısı, gerekse boyut olarak daha önceden Nolasco ve Amoro de Sequeira (1991) tarafından tanımlanmış olan dsRNA profiline benzediği bildirilmiştir (Açıkgöz ve Döken, 2003).

Özçiçekçi ve Açıkgöz (2009), yaptıkları DAS-ELISA sonuçlarına göre İMH'ye neden olan etmenin Potyviriidae familyasına ait bir virüs olabileceği kanısına varmışlardır. Bunlara ilave olarak ülkemizde İMH'ye neden olan viral etmenlerin FLMaV-1, FMaV-GP, FMaV-NP, FMV (Çağlayan vd., 2009, 2010), FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMV (Çağlar vd., 2009), FLMaV 1, FLMaV 2, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV 1, 2, FBV 1 ve FCV (Elçi vd., 2012) oldukları moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

Ülkemiz incir bahçelerinde yaygın olan bu hastalığın başta fidanlıklar olmak üzere kapama incir bahçelerinde ekonomik açıdan ciddi kayıplar oluşturabileceği göz ardı edilmemesi gereken bir gerçektir. Nitekim, Özalp ve Heper (1972) İMH'nin verim düşüklüğü, meyve dökümü ve kalite bozukluğu nedeni ile % 49' lara varan verim azalışına neden olduğunu belirlemişlerdir. Nakasone ve Kusakari (1991), Salomon vd. (2005) hastalık belirtilerinin şiddetli olduğu durumlarda, hastalığın meyve kalitesini düşürdüğü hatta zamansız yaprak ve meyve dökümüne yol açtığını bu nedenle de ekonomik kayıpların meydana geldiğini bildirmişlerdir (Ashihara vd., 2004, Yakubi vd., 2007).

Genel olarak virüs hastalıklarının mücadelesinde kültürel önlemler, vektör mücadelesi ve sağlıklı üretim materyali kullanımı uygulanmaktadır. Ancak İMH'nin vektörü olan akar sürgünlerdeki gözlerde ve yapraklarda kışlamakta bunların yanı sıra, olgunlaşmamış meyvelerin ostiol pulcukları arasında bulunmaktadır. Ancak, ekolojik olarak yetiştirilen ürün grubunda yer alan incir için ülkemizde ruhsatlı akarisit bulunmamaktadır. Bu nedenle, İMH vektörüne karşı ilaçlı mücadele önerilmemektedir (Aksoy, 2010). Yapılması gereken özellikle yeni tesis edilecek bahçelerde virüsten arı iyi nitelikli incir fidanlarının kullanılmasıdır. Ancak, İMH' nin, Büyük ve Küçük Menderes Havzalarında oldukça yaygın olduğu, incir üretimi yapılan alanlarda sağlıklı incir materyalinin ise yok denecek kadar az olduğu bildirilmektedir (Blotgett ve Gömeç, 1967; Özar vd., 1986). Bu nedenle, yeni kurulacak bahçelerde, doku kültürü (meristem uç veya sürgün ucu kültürü) ve ısı uygulaması ile virüsten arındırılmış, İMH'ye neden olan etmenler yönünden testlenmiş sağlıklı üretim materyalinin kullanılması gerekmektedir. Bunun için, öncelikle etmenlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanısının yapılabileceği yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Şimdiye kadar dünyada ve ülkemizde İMH etmeninden ari incir fidan üretimine yönelik çalışmalar, incir materyalinin virüslerden arındırıldıklarını gösteren hızlı ve güvenilir testler uygulanmaksızın yapılmıştır (Pontikis ve Melas, 1986; Lopez vd., 1998; Demiralay, 1997; Fraguas vd., 2004). Çünkü bu testlerin yapılabilmesi için gerekli olan bilimsel veriler bu tarihlerden sonra belirlenmiştir (Elbeaino vd., 2009; Gattoni vd., 2009).

Bu çalışmanın ilk hedefi, ülkemizin önemli ihraç ürünleri olan, Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde verim ve kalite azalışına neden olan İMH'nin, Aydın İli'nin bazı ilçelerindeki yaygınlığının belirlenmesidir. Diğeri ise İMH'ye neden olan etmen veya etmenlerin tanılanmasına yönelik biyolojik ve moleküler çalışmalar yapmak ve vektör akar *A. ficus* ile taşınma çalışmalarını gerçekleştirmektir. Ayrıca, *in vitro* çoğaltım yoluyla sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir üretim materyalinin elde edilmesi ve elde edilen üretim materyalinin İMH'ye neden olan etmenler yönünden test edilmesi bu çalışmanın hedefleri arasında yer almaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İncir mozaik hastalığı (İMİH), ilk kez Condit ve Horne tarafından 1933 yılında saptanmış olup hastalığın bugüne kadar incir yetiştiriciliğinin yapıldığı hemen her yerde görüldüğü, özellikle Akdeniz ülkelerinde sıklıkla rastlandığı bildirilmiştir (Alfieri, 1967; Al-Mughrabi ve Anfoka, 2000). Ülkemizde ise İMİH ile ilgili ilk çalışma 1967 yılında yapılmış olup, Ege Bölgesinde yürütülen sorveylerde gerek incir bahçelerinin, gerekse fidanlıkların mozaik hastalığı ile bulaşık olduğu, İMİH'nin verim kaybının tam olarak tahmin edilemeyeceği ve bulaşık çeliklerle fidan üretiminin tamamen yanlış bir uygulama olduğu bildirilmektedir (Blodgett ve Gömeç, 1967). Özalp ve Heper (1972) Ege bölgesinde İzmir, Aydın, Muğla, Manisa ve Denizli illerindeki incir ağaçlarının % 1'den fazlasını kapsayan çalışmalarında incir mozaik hastalığının genel dağılımı ve çeşitlerin dayanıklılık reaksiyonlarını simptomatolojik gözlemlere dayalı olarak belirlemişler ve sonuçta 46.647 ağacın hepsinin virüslü olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, Erbeyli Bahçe Kùltürleri İstasyonu bahçesinde bulunan, 1967–1970 yılları arasında dört yıl sürekli kontrol altında tutulan ve son yedi yıllık verim durumları tespit edilen 171 Sarılop incir ağacından makroskobik gözlemler sonucunda sağlıklı olduğu belirlenen 9 adet ağacın anaçlık olarak yeni kurulacak damızlıklarda üretim materyali olarak kullanılabilceği kanısına varmışlardır. Hafif, orta ve kuvvetli belirti gösteren ağaçların belirti şiddeti ile verim kaybı arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır (Çizelge 2.1) ve belirtileri en hafif olan ağaçların, en yüksek verimi verdiği belirlenmiştir (Özalp ve Heper, 1972).

Çizelge 2.1. İncir mozaik hastalığının hafif, orta ve kuvvetli belirtilerini gösteren incir ağaçlarında belirti şiddeti nedeniyle meyve veriminde meydana gelen farklar (Özalp ve Heper,1972)

Ağaç Yaşı	Belirti Şiddeti		Fark (kg)
	Hafif	Orta	
31 yaş	112,9 kg	90 kg	22,9 kg
29 yaş	93,9 kg	71,5 kg	22,4 kg
27 yaş	71,2 kg	60,8 kg	10,4 kg
Ağaç Yaşı	Hafif	Kuvvetli	Fark (kg)
25 yaş	75,2 kg	19,5 kg	55,7 kg
23 yaş	65 kg	26,2 kg	38,8 kg

Özalp ve Heper (1972), incir mozaik hastalığının verim düşüklüğü, meyve dökümü ve kalite bozukluğu nedeni ile büyük zararlara yol açtığını ifade ederek, yaptıkları karşılaştırmalı verim denemelerinde incir mozaik hastalığının % 49'lara varan verim azalışına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, kurutmalık bir incir çeşidi olan Sarılop'un bu hastalığa hassas olduğu da belirtilmiştir (Özar vd., 1986).

İMH'ye neden olan bu etmenin taşınmasında bir tomurcuk akarı olan Eriophyidae familyasından *Aceria ficus*'un rol oynadığı ve bitkilerdeki akar sayısının artmasıyla hastalık belirtisi gösteren bitki sayısının arttığı ve vektörün 10 günden daha kısa sürede İMH'yi taşıdığı belirlenmiştir (Flock ve Wallace, 1955). Daha sonraki yıllarda *Aceria ficus*'un İMH vektörü olduğu Hindistan (Vashisth ve Nagaich, 1968) ve Japonya'da da rapor edilmiştir (Nemato, 1980).

İMH'nin en tipik belirtileri; genç yapraklarda dağınık sarı yeşilden, açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekelerin ve bantların olduğu, genelde leke kenarının pas renginde veya kırmızı-kahverengi, zaman zaman da nekrozların meydana geldiği belirtilmiştir (Blodgett ve Gömeç, 1967; Şahtiyancı, 1972). Sürgünlerin eğilip bükülmesi, budama, susuzluk ve sıcak hava ile ağır strese giren incir ağaçlarında, etmenin latent durumdan, patojenik duruma geçtiği ve hızlı bir şekilde belirtilerin arttığı ve özellikle fidanlıklarda kayıpların ciddi boyutlarda olduğu da ifade edilmiştir (Salomon, 2004). Belirtilerin şiddetli olduğu durumlarda ise hastalığın meyve kalitesini düşürdüğü, hatta zamansız yaprak ve meyve dökümüne yol açıp (Nakasone ve Kusakari, 1991; Salomon vd., 2005) ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Ashihara vd., 2004; Yakubi vd., 2007).

Hastalık, dünyada incir yetiştiriciliği yapılan hemen her yerde özellikle, Akdeniz ülkelerinde görülmektedir (Al-Mughrabi ve Anfoka 2000; Serrano vd., 2004). Ürdün’de İMH’nin yaygınlık ve şiddetini saptamak için, ülke genelinde incir yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı 13 ilde, 11 incir çeşidini kapsayacak sörveyler gerçekleştirilmiş ve sörvey yapılan bütün illerde İMH’nin bulunduğu bildirilmiştir (Al-Mughrabi ve Anfoka, 2000).

İspanya’da 2001 yılı boyunca 30 adet ticari incir bahçesinde 20’şer ağaç incelenmiş ve hastalık şiddetini belirlemek için 0–4 skalası kullanılmıştır. Sörvey yapılan bütün alanlarda incir mozaik belirtileri görülmüş, değerlendirmeye alınan 102 incir çeşidinin % 92,2’sinin İMH belirtileri sergilediği bildirilmiştir (Serrano vd., 2004).

İMH’ye neden olan etmenin konukçu çevresinin belirlenmesi amacıyla enfekteli incir yapraklarından elde edilen inokulum otsu konukçu bitkilere mekanik olarak uygulanmış (Elbeaino vd., 2006; 2007; Martelli vd., 2006; Çağlar vd., 2009; Çağlayan vd., 2010), ancak çok az sayıda pozitif sonuç alınmıştır. Yani, İMH’ye neden olan etmen veya etmenler mekaniksel inokülasyona zor yanıt veren etmenler içerisinde yer almaktadır. Ancak yine de özsuyu ile taşınma çalışmaları yapmış olan, Özalp ve Heper (1972), Salomon vd. (2002), *Cucumis sativus* test bitkilerinde, Serrano vd. (2004) ise *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor* ve *Nicotiana tabacum* L. cv. “Samsun” (Serrano vd., 2004) test bitkilerinde viral belirtilerin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. *Cucumis sativus* fidelerine yapılan mekanik inokulasyondan 6 gün sonra, fidelerin kotiledon yapraklarında (Salomon vd., 2002), 8-10 gün sonra ise primer yapraklarında şekil bozukluğu ile nekrotik lokal lekelerin meydana geldiğini bildirmişlerdir (Salomon vd., 2005). Bunların yanı sıra Serrano vd. (2004)’da 50 Mm (0.5M) NaK fosfat tampon çözeltisi (pH:8) içine % 1 merkaptolanol ve % 1 polivinilprolidone ilave edilerek hazırladıkları solüsyonla yaptıkları inokulasyon sonucunda bitki özsuyu ile etmenin taşınabildiğini ifade etmişler ve 4 ayrı test bitkisinde çeşitli belirtiler gözlemlenmişlerdir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. İncir mozaik hastalığının konukçu çevresini belirlemek amacıyla yapılan mekanik inokulasyonda kullanılan test bitki türleri, inokulum kaynağı enfekteli 5 incir çeşidi ve meydana gelen belirtiler (Serrano vd., 2004)

Türler	İnokulum Kaynakları					Belirtiler
	CDB	SA	FA	SF	CA	
<i>Chenopodium album</i>	-	-	-	-	3/12	LL
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	5/28	17/84	0/84	0/84	4/8	D, LL
<i>Cucumis sativus</i> "Asmley"	0/8	0/8	-	-	-	-
<i>Gomphrena globosa</i>	-	0/10	0/10	0/10	1/8	LL, C
<i>Nicotiana megalosiphon</i>	-	0/10	0/10	0/10	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> "Samsun"	-	0/10	0/15	0/15	2/12	M
<i>Nicotiana tabacum</i> "Xhanti"	0/8	0/18	0/15	0/15	0/8	-
<i>Ocinum basillicum</i>	-	0/28	0/56	0/56	0/4	-
<i>Vicia faba</i> "Bianca"	0/8	0/8	-	-	-	-
<i>Vigna radiata</i>	-	-	-	-	0/8	-

¹CA= Colar d'Albatera, CDB= Cuello de Dama Bianco, SA= San Antonio, FA= Flor Ancha, SF= Superfig ²C= Kloroz, D=Cücelik, LL= Lokal lezyon, M= Mozaik

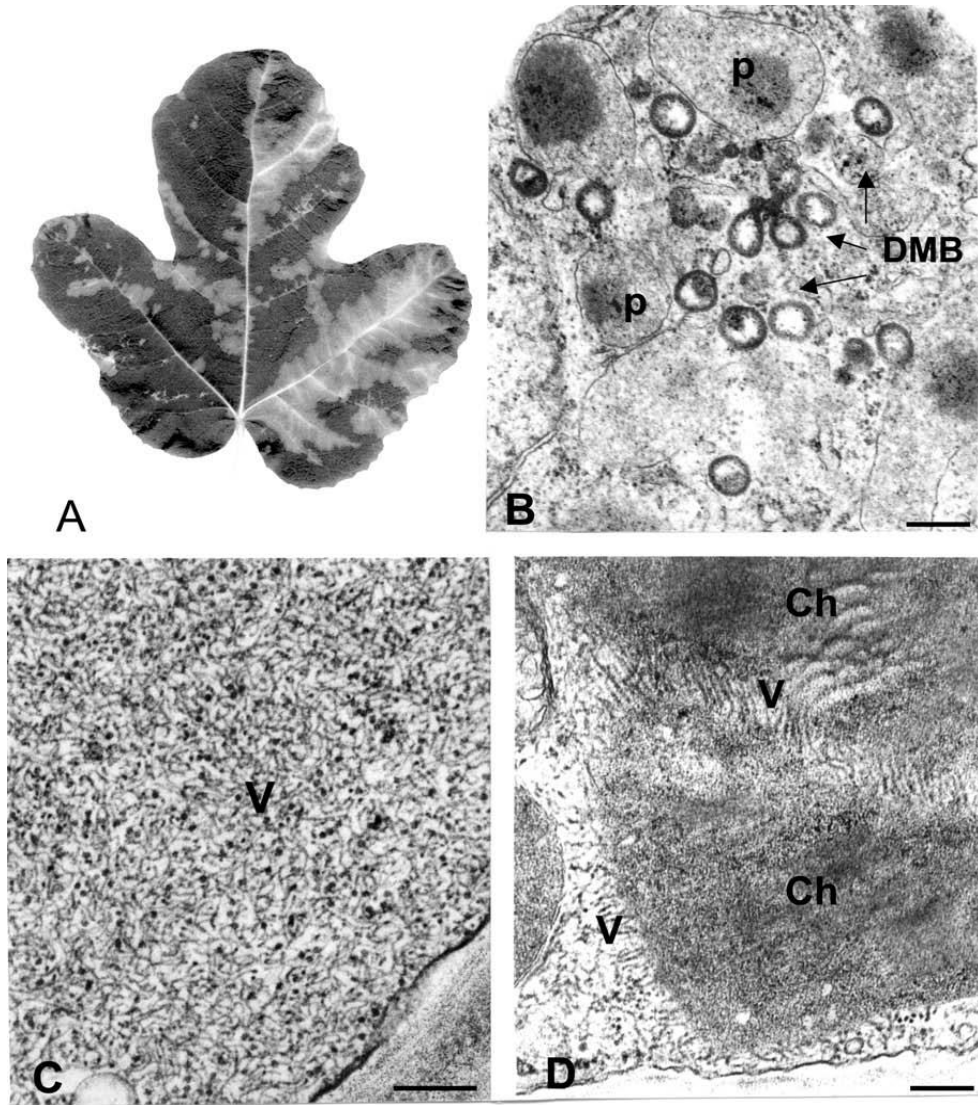
Hastalık etmeninin mekanik taşınmasının yanında, vektör akar *Aceria ficus* Cotte.'un İMH etmenini taşıma etkinliği ve hastalığı kazanma süresi üzerine ayrıntılı çalışmalar da yapılmıştır (Proeseler, 1972). Çalışma sonuçlarına göre tek bir akarın dahi hastalığı taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca, akarlar önce 5 dakika hastalıklı bitkide, daha sonra 5 dakika sağlıklı bitkide tutulmuş ve sağlıklı bitkilerde hastalık belirtilerinin gözlemlendiği belirtilmiştir. Bunlara ek olarak hem genç, hem de ergin dönemlerin birkaç saat içinde hastalık etmenini bünyesine alabildiği, etmeni 6–10 gün bünyesinde tutabildiği ve taşıyabildiği, ancak akar yumurtası ile bu etmenin taşınmadığı bildirilmiştir (Proeseler, 1972). Credi (1998), hastalık etmenini *Aceria ficus* ile *Catharanthus roseus* (Cezayir menekşesi) bitkisine taşımaya denemiş ve 40 günlük bir inkübasyon periyodu sonunda, yapraklarda klorotik lekelerin, mozaiklerin ve çiçeklerde sarımsı lekelerin meydana geldiğini bildirmiştir.

1989 yılında Japonya'nın Osaka bölgesinde ilk kez ortaya çıkan ve *Aceria ficus* ile taşınan İMH etmeninin, incir üretimi yapılan 53 ha'lık bir bahçede, yaprak ve meyvede mozaik belirtilerine neden olduğu ve erken meyve dökümü sonucu ekonomik kayıplara yol açtığı Ashihara vd. (2004) tarafından belirtilmiştir.

Ultrastrüktürel çalışmalar yapılıncaya değin öncelikle bu hastalığın viral kaynaklı olduğu düşünülmüş, daha sonraki çalışmalarda enfekteli incir yapraklarına ait hücrelerin sitoplazmalarında membranla çevrili yuvarlak yapıların bulunduğu ortaya çıkmıştır (Bradfute vd., 1970; Plavsic ve Milicic, 1980;

Appiano vd., 1990). İlerleyen yıllarda ise "hastalıkla ilişkili yapılar" olarak adlandırılan farklı büyüklük ve şekildeki virüs benzeri yapıların bu hastalığa neden olduğu ileri sürülmüştür (Martelli vd., 1993). Kumar vd. (2003), *tenuivirüs* grubuna giren ve akarla taşınan Hint bezelyesi kısırlık mozaik virüsü (Pigeonpea sterility mosaic virüs, PPSMV) ile enfekteli hint bezelyesi ve *Nicotiana benthamiana* yaprak dokularının elektron mikroskop görüntülerinde belirlenen, membrana bağlı yapıların, İMH etmeni ile enfekteli yapraklarda saptanan görüntüler ile benzer olduğunu bildirilmişlerdir. İspanya'da yapılan bir çalışmada ise elektron mikroskopta hastalıkla ilişkili yapıların yanı sıra, hem incir, hem de duyarlı konukçu bitkilerin hücrelerinde 720 nm uzunluğunda esnek çubuk şeklinde bir virüsün hastalık etmeni olabileceğini belirtilmiştir (Serrano vd., 2004). Ayrıca bu çalışmada, hastalıktan sorumlu olarak bulunan çubuk şeklindeki bir virüsün uzun poli-A sekanslarına sahip olduğu ve mekanik olarak test bitkilerine taşınabildiği saptanmıştır (Serrano vd., 2004).

Meksika ve Güney Afrika incir yapraklarına ait örneklerde yapılan bir çalışmada ise İMH ile ilişkili tipik, çift membranlı yapıların bulunduğu ayrıca yarı sert iliğimsi ve kıvrımlı virüs benzeri yapıların da parankima ve floem hücrelerinde toplanmış olduğu Castellano vd. (2007) tarafından bildirilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. A) İncir mozaik hastalığının incir yaprağında meydana getirdiği mozaik belirtisi, B) Parankima hücresinde yer alan çift membranlı yapılar. C) Çok esnek ipliğimsi partiküller, D) Parankima hücresindeki kloroplastlarda (Ch) yer alan yarı sert ipliğimsi virüs benzeri yapılar (V) (Castellano vd., 2007).

İspanya’da yapılan bir başka çalışmada mozaik belirtileri sergileyen 47 incir yaprak örneğinden 2 tanesinin Elma mozaik virüsü (Apple mosaic virüs, ApMV), 7 tanesinin Elma gövde yivlenme virüsü (Apple stem grooving virüs, ASGV) poliklonal antiserumlarına ve 25 örnekten 1 tanesinin de monoklonal potyvirus antiserumuna pozitif reaksiyon verdikleri belirtilmiştir (Serrano vd., 2004).

Kısmi saflaştırılmış incir mozaik virüsü antiserumu kullanılarak yapılan ELISA testinde ise 26 örnekten hiçbirinde pozitif sonuç alınmamıştır (Serrano vd., 2004). Ancak, Salomon vd. (2002) İMH’ye neden olan etmenin serolojik tanısında, potyvirus grubuna giren Pırasa sarı çizgi virüsü (Leek yellow stripe virüs, LYSV) antiserumuna pozitif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Aydın yöresi izolatları ile yapılan ELISA testlerinde ise İMH hastalık etmenine karşı denenen üç antiserumdan yalnızca Potyvirus grubuna karşı düşük absorbansta sonuç alınmıştır (Özççekçi ve Açıkgöz, 2009).

Etmeni tanılamak için yapılan dsRNA izolasyon çalışmalarında Açıkgöz ve Döken (2001) etmene ait 6.6 kbp üzerinde bir bant, 2.0 ile 0.6 kbp arasında da iki bandın yer aldığını ve dsRNA izolasyonu için en uygun örnekleme zamanının Aydın yöresi için mayıs ve haziran ayları olduğunu bildirmişlerdir (Açıkgöz ve Döken, 2003). Salomon vd. (2005)’ da etmenin 3 banda sahip olduğunu belirtmişler, ancak tekrarlanabilir sonuçlar elde etmediklerini ifade etmişlerdir. Bu durum, Valverde vd. (1990)’ nın bildirdikleri gibi İMH etmeninin de yer aldığı tahmin edilen (Brunt vd., 1996; Salomon vd., 2005) potyvirus gibi bazı viral grupların düşük kalitede dsRNA ürünü vermeleri ile açıklanmıştır. Ayrıca Falk ve Salem (2006)’in İMH ile ilgili yaptıkları çalışmada nükleotid sekans analizine göre, İMH’ye neden olan etmenin, *Closteroviridae* familyasına ait bir virüs olabileceği ve İtalya’da İncir yaprak benekle ilişkili virüs (Fig leaf mottle-associated virüs, FLMaV) olarak isimlendirilen viral etmen ile baz dizilimi yönünden önemli benzerlikler gösterdiği de bildirilmiştir. Ayrıca, yapmış oldukları dsRNA izolasyon çalışmalarında 1 ile 3 arasında değişen band profilleri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Çağlayan vd. (2010) ise deneysel enfekteli bitkilerden yaptıkları dsRNA analiz sonucunda 1.30 kbp ve 1.96 kbp büyüklüğünde iki band elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Etmenin tanısının yapılabilmesi için spesifik potyvirus primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR yönteminde ise 1.7-3.0 kbp' lik (Serrano vd., 2004) ve 500-800 nükleotidlik PCR ürünleri elde edilmiştir (Salomon vd., 2005). İncir mozaik hastalığına neden olan etmenin viral olduğu düşünülürken, Tunus'ta yapılan bir çalışmada etmenin viroid olabileceği ihtimali de ortaya çıkmıştır (Yakoubi vd., 2007).

İncir mozaik hastalığı belirtilerinin gözleendiği incir ağaçlarında Şerbetçi otu (*Hop stunt*) ve Turunçgil cüceleşme (*Citrus exocortis*) viroidleri de saptanmış ve bu etmenlerinde İMH'ye neden olan etmenler içerisinde bulunabileceği bildirilmiştir (Yakoubi vd., 2007). Ülkemizde de bu konuya benzer bir çalışma yürütülmüş ve çalışma sonucunda Yediveren çeşidi incir fidanlarında fitoplazma benzeri yapıların gözleendiği bildirilmiş ancak aynı yaprakta yer alan akarlarda fitoplazma ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanılmadığı belirtilmiştir (Çağlayan vd., 2007).

İMH ile yapılan genom çalışmalarında ise İMH neden olan etmenin İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 ve 2 (*Fig leaf mottle associated virüs, FLMaV 1, 2*) (Elbeaino vd., 2007)'nin Avrupa üvez ağacı halkalı leke virüsü (*European mountain ash ringspot associated virüs, EMARAV*) ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur (Walia vd., 2009). Ancak EMARAV, İncir mozaik ilişkili virüs (*Fig mosaic associated virüs, FMaV*) ile homoloji gösterdiği için FMaV olarak isimlendirilmiştir (Walia vd., 2009).

Elbeaino vd. (2009a), İncir mozaik virüsü (*Fig mosaic virus, FMV*)'nün gen haritasını tamamlamış ve RNA'sının dört segmentten oluştuğunu, bu dört RNA'nın, sırası ile 7093, 2252, 1490 ve 1472 nükleotid büyüklüğünde ve tek bir okunabilir alana sahip olduğunu bildirmişlerdir. İMH'ye neden olan dört RNA segmentli bu etmenin EMARAV, Güvercin bezelye kısırılık virüsü (*Pigeon pea sterility mosaic virüs, PPSMV*) ve Mısır kırmızı çizgi virüsü (*Maize red stripe virüs, MRSV*) ile bazı benzerlikleri paylaştıkları, ayrıca, *Bunyaviridae* familyasından, negative-sense ve multipartite bir RNA virüsü olduğu da belirlenmiştir (Elbeaino vd., 2009b). İMH neden olan bir diğer etmen ise Gattoni vd. (2010) tarafından İtalya'da, mozaik belirtisi gösteren ve göstermeyen incir ağaçlarında belirlemiş oldukları İncir latent virüs-1 (*Fig latent virüs 1, FLV-1*)'dir. FLV-1'in, 700 nm uzunluğunda, ipliksi, mekanik inokulasyon ve tohum ile taşınan bir virüs olduğu, viral genom yapısının, *Flexiviridae* familyasının *Trichovirüs* cinsi üyelerine benzediği bildirilmiştir.

Sarılop, Sarızeybek ve Yediveren incir çeşitleri ile yapılan RT-PCR testlerinde ise bir örneğin İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 (Fig leaf mottle-associated virüs-1, FLMaV-1), beş örneğin EMARAV-GP ve 21 örneğin de EMARAV-NP primerleri ile pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (Çağlayan vd., 2009).

İMİH' nin moleküler tanımlanmasına yönelik Bursa Siyahı ve deneysel enfekteli incir yaprak/bitkilerinde yapılan RT-PCR testinde ise FMaV-GP bölgesi için spesifik 468 bp ve FMaV-NP bölgesi için spesifik 298 bp büyüklüğünde ampliconlar belirlenmiş ve yapılan nükleotid sekanslarının blast analizlerinde ise Bursa Siyahı incir bitkisinin % 90, deneysel enfekteli incir bitkilerinin % 94-96 oranında FMV ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Çağlayan vd., 2010). Benzer bir çalışmayı da Çağlar vd. (2009), Adana, Hatay, Urfa ve Mersin illerini kapsayan bölgede Keten Köyneği, Sarılop, Göklop ve Bardakçı incir çeşitlerinde yapmışlardır. Bu çalışmada 132 örnek, RT-PCR (Reverse Transcription PCR) ile FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMV primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 6 örneğin FLMaV-2, 10 örneğin de FMV ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

İMİH neden olan etmenler grubuna Elbeaino vd. (2010) tarafından İncir hafif benek ilişkili virüs 1 (Fig mild mottle-associated virüs, FMMAV) de dâhil edilmiştir. FMMAV' nin, 2000 nm uzunluğunda, yedi okunabilir alana sahip, yeni bir *Closterovirüs* olduğu ve ayrıca enfekteli incir yapraklarından yapılan RT-PCR testlerinde ampliconların 311 bp büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.

Tzanetakakis vd. (2010), İncir mozaik virüsünün moleküler karakterizasyonuna yönelik yapmış oldukları çalışmada kullandıkları tek bir incir ağacında, FMV, iki yeni *closterovirüs* (Arkansas fig closterovirus-1 ve Arkansas fig closterovirus 2 (AFCV-1 ve 2) ve bir *badnavirüs* (Fig badnavirus-1, FBV-1) tespit etmişlerdir. Ayrıca AFCV-1 ve 2'nin İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 (Fig leaf mottle associated virus-1), FBV-1'in de Turunçgil sarı mozaik virüsü (Citrus yellow mosaic virus) ve Kakao şişkin sürgün virüsü (Cacao swollen shot virus) ile yakından ilişkili oldukları belirtilmiştir. Ayrıca yapılan mekanik inokulasyon testleri sonucunda AFCV-2 ve FBV-1'in soya fasulyesinde hafif benek belirtileri meydana getirdiği, *N. occidentalis*, *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. sylvestris* ve *Pisum sativum* test bitkilerinde ise belirti meydana getirmediği bildirilmiştir.

Elbeaino vd. (2011) tarafından, 1696 bp ve 1415 bp büyüklüğünde iki banda sahip dsRNA profili oluşturan *Partitiviridae* familyasına giren ve İncir gizli virüsü (Fig cryptic virüs, FCV) olarak adlandırılan bir viral etmen daha tanımlanmıştır. Elçi vd. (2012) ise yapmış oldukları PCR testlerinde, FLMaV1-2, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV1-2, FBV-1 ve FCV etmenlerinden en az bir tanesinin enfekteli incir ağaçlarında bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca birçok örnekte karışım enfeksiyonlar belirlemişler, en yaygın virüslerinde FBV-1 ve FMV olduğunu saptamışlardır. Mısır da yapılan bir çalışmada ise FMV izolatlarının sekans ve filogenetik analiz sonuçlarının İtalya ve Arkansas izolatları ile %55 benzer olduğu ayrıca, FMV virüsünün kılıf protein geninden anti-FMV poliklonal antiserumu elde edilerek, İndirekt ELISA yöntemiyle otuz incir çeşidinde FMV saptanmıştır (Hafez vd., 2012). Suudi Arabistan'da yapılan bir diğer çalışmada ise Hofuf bölgesinde FLMaV-1 ve FMV viral etmenleri (Khalid, 2012), İran'da ise FLMaV-1, FMV ve FLV-1 viral etmenleri saptanmış ve FMV İran izolatının Türk izolatlarla ortak filogeniyi paylaştığı belirlenmiştir (Morteza vd., 2012).

İncir mozaik hastalığı, incirde yaygın olarak görülen önemli bir viral hastalıklar grubudur. Hastalığa neden olan etmeni tanımlamak için çok sayıda yeni RNA virüsü ve bir de DNA virüsü (FBV-1) tespit edilmiştir (Tzanetakis vd., 2010). FBV-1'in Amerika Birleşik Devletleri'nde geniş bir dağılıma sahip olduğu saptanmış, ayrıca fidan ve meristem doku kültür bitkilerinde FBV-1 varlığı ortaya konmuş ve FBV-1'in incir genomuna entegre olabilme ihtimali üzerinde durmuşlardır (Minafra vd., 2012; Laney vd., 2012).

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerden biri olan tek sarmallı ve negatif polariteli, 4 RNA'ya sahip İncir mozaik virüsünün yapılan son çalışmalarda RNA-5 ve RNA-6 olmak üzere iki RNA'ya daha sahip olduğu belirlenmiştir (Elbeaino vd., 2012; Ishikawa vd., 2012).

İncir mozaik hastalığına neden olduğu belirlenen ve yukarıda isimleri verilen on bir viral etmenin sekans dizilimlerinin tamamlanmasını takiben her bir viral etmene özgü primerler dizayn edilmiş ve RT-PCR yöntemi ile incir viral etmenlerinin tanımlanmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.3). Çizelge 2.3'de bu incir viral etmenlerinin isimleri, ilgili kaynak, primerlerine ait baz dizilimleri ve ampikon büyüklükleri listelenmiştir.

Çizelge 2.3. İncir mozaik hastalığına neden olan onbir viral etmene ait isim, literatür, primer baz dizilimi ve amplikon büyüklükleri

Virüs isimleri	Kaynak	Primer baz dizilimi		Amplikon büyüklüğü (bp)
İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 (Fig leaf mottle-associated virus 1, FLMaV-1)	Elbeaino vd., 2006	vd.,	5'-CGTGGCTGATGCAAAGTTTA-3' 5'-GTTAACGCATGCTTCCATGA-3'	352 bp
İncir yaprak benek ilişkili virüs 2 (Fig leaf mottle-associated virus 2, FLMaV-2)	Elbeaino vd., 2006	vd.,	5'-GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG-3' 5'-TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA-3'	360 bp
İncir mozaik virüsü 1,2,3,4 (Fig mosaic virus-1,2,3,4, FMV-1,2,3,4)	Elbeaino vd., 2009a	vd.,	RNA-1 5'-CGGTAGCAAATGGAATGAA-3' 5'-AACACTGTTTTTGCGATTGG-3'	302 bp
	Elbeaino vd., 2009a	vd.,	RNA-2 5'-GCCACTGACTTACCTATCCA-3' 5'-CGAGGTTGTTTCATGGCAATA-3'	725 bp
	Elbeaino vd., 2009b	vd.,	RNA-3 5'-GAGAAGCTCCAAGCCAGAAA-3' 5'-TAACCTGGCACAATCATCCA-3'	304 bp
	Elbeaino vd., 2009b	vd.,	RNA-4 5'-TGGCAGATTCAAGATAATGG-3' 5'-TGGGACATTCCTGTGTCAGG-3'	218 bp
İncir mozaik ilişkili virüs 1 (Fig mosaic-associated virus-1, FMaV-1)	Walia vd., 2009		5'-CACGAGCAAAGACAAAGAGAA-3' 5'-CACACTTACACATCTTACATCATCT-3'	298 bp
İncir mozaik ilişkili virüs 2 (Fig mosaic-associated virus-2, FMaV-2)	Walia vd., 2009		5'-GGGTACATATGCGTCATTCTTG-3' 5'-CGTTTGTCTTGGATCACAGCAA-3'	468 bp
İncir latent virüsü 1 (Fig latent virus-1, FLV-1)	Gattoni vd., 2009		5'-CCATCTTCACCACACAAATGTC-3' 5'-CAATCTTCTTTGGCCTCCATAAC-3'	389 bp
İncir hafif benek ilişkili virüs 1 (Fig mild mottle associated virus, FMMaV)	Elbeaino vd., 2010	vd.,	5'-AAGGGGAATCTACAAGGGTCG-3' 5'-TATTACGCGCTTGAGGATTGC-3'	311 bp
Arkansas incir closterovirüs 1 (Arkansas fig closterovirus-1, AFCV-1)	Tzanetakis vd., 2010	vd.,	5'-CTGTATCTGTCATTACCTCTCCGGG-3' 5'-ATGCTTCCTCGGCTGC-3'	375 bp
Arkansas incir closterovirüs 2 (Arkansas fig closterovirus-2, AFCV-2)	Tzanetakis vd., 2010	vd.,	5'-GTTCCGGAATTAGTTAATAGATACGGTC-3' 5'-ACCCGCTAGAGTAATCAGTCAAAGTT-3'	1671bp
İncir badnavirüs 1 (Fig badnavirus-, FBV-1)	Tzanetakis vd., 2010	vd.,	5'-ACCAGACGGAGGGAAGAAAT-3' 5'-TCCTTGCCATCGGTTATCTC-3'	474 bp
İncir kriptik virüs (Fig cryptic virüs, FCV)	Elbeaino vd., 2011	vd.,	RNA-1 5'-TCGGATTGTCTTTGGAGAGG-3' 5'-CGCATCCACAGTATCCCAT-3'	353 bp
		vd.,	RNA-2 5'-TTGGCCGACTACTCAAGGTCA-3' 5'-TGCGAGGTAGCATGTGTAGC-3'	375 bp

İMİH' ye neden olan etmen veya etmenlerin tanınmasına yönelik yapılan bu çalışmalar viral etmenlerden temiz incir üretim materyalinin testlenmesinde kullanılması yönüyle çok önemlidir. Ancak, onun kadar önemli olan diğer bir konu da nasıl temiz materyal elde edileceğidir. Şu bir gerçektir ki virüsler, özellikle vejetatif olarak çoğaltılan ve generasyonlar boyunca taşınabilenler üretim materyallerinde sorun oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, virüssüz bitkisel materyalin elde edilmesi, kültür bitkilerinin sürdürülebilir üretimleri için önem taşır. Birçok türün virüsten arı klonal üretiminde, meristem kültürün yanı sıra, sıcaklık uygulaması ve sürgün ucu kültürü de kullanılmaktadır. Bu *in vitro* teknikler, aynı zamanda, İMİH etmen veya etmenlerinden temiz incir fidanı üretimine yönelik çalışmaların yapılmasına da olanak sağlamıştır.

Bu konuda dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Muriithi vd. (1982), mozaik belirtisi gösteren *Ficus carica* L.'ye ait sürgünlerden aldıkları 0.5–1.0 mm uzunluğundaki meristemleri, IBA, NAA, BA ve GA ile zenginleştirilmiş Murashige Skoog (1962) (MS) ortamında kültüre almışlardır. 0,18 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA ve 0,3 mg/l GA içeren ortamda ise sürgün gelişimleri gerçekleşmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesinden sonra, seradan toprağa geçirilen bitkilerde 15 ay sonra dahi hiçbir virüs belirtisine rastlanmamıştır. Yapılan bir diğer çalışmada ise, Kalamon incir çeşidine ait sürgün uçlarının 89 mg/l phloroglucinol ilave edilmiş MS ortamında en iyi geliştikleri saptanmıştır. Bu sürgünler, 1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirildikten sonra vermikulitli ortama aktarılmışlardır (Pontikis ve Melas, 1986).

Barbosa vd. (1992) Roxo de Valinthos incirinin meristem kültürü yolu ile üretiminde çoğalma ve köklenme için en uygun MS ortamının olduğunu saptayarak, elde edilen köklü bitkilerin araziye aktarılmadan önce, toprak-kum-vermikulit karışımı içeren torbalarda 4-6 hafta süre ile alıştırma seralarında tutulmaları gerektiğini belirtmişlerdir. İncir sürgünlerinin *in vitro* ve *in vivo* da köklenme durumları Lopez vd. (1998) tarafından 0,2 ve 2,0 ppm IBA, 89 g/l phloroglucinol (PG) içeren 4 farklı MS ortamı denenmiş ve en yüksek köklenmenin PG bulunmayan 0,2 ppm IBA içeren ortamda gerçekleştiğini saptamışlardır.

In vivo 'daki en yüksek köklenmenin saptanması amacıyla, mikro çelikler 10, 30 ve 60 saniye süre ile 10^{-3} M IBA'ya batırılmış ve herhangi bir hormon uygulaması yapılmadan seraya dikilmişlerdir. Çalışmada gerçekleştirilen tüm uygulamalarda %100'e yakın köklenmelerin sağlandığı tespit edilmiştir (Lopez vd., 1998).

Çukurova koşullarına adapte olmuş ve ancak geneli İMH ile enfekteli Bursa Siyahı incir çeşidi, meristem kültürü ile üretilmiş ve virüsten arı bitkiler elde edilmiştir. Büyüme sezonunda meristemler, izole edilmiş ve 0,5 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃, 89 mg/l PG ve 2 g/l aktif karbon (AC) bulunan Linsmair ve Skoog (1965) ortamında kültüre alınmışlardır. Daha sonra büyüyen uçlar, çoğalma ortamına aktarılmışlardır. Sürgünlerin, 0,1 ve 0,2 mg/l IBA içeren köklendirme ortamlarına transferlerinden sonra, %75 oranında sağlıklı bitkiler elde edilmiştir (Demiralay, 1997). Benzer bir çalışma, Dalkılıç ve Ertan (1998) tarafından yapılmıştır. Bursa Siyahı incir çeşidine ait on yıllık ağaçlardan alınan meristemleri, bir litre de 7 g agar, 30 g sükröz, 100 mg mioinositol, 1,5 mg thiamine, 2 mg pyridoxine, 0,5 mg nikotinik asit ve 2 mg glycine içeren MS ortamına alınmışlardır.

Bu kültürler, 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA içeren ortamın oksidasyonuna engel olmak için bir hafta karanlıkta bekletilmişlerdir. Kültürün altıncı haftasında, besin ortamına 3 mg/l GA'nın ilave edilmesinden sonra meristem gelişimi sağlanmış, fakat sadece bir sürgün elde edebilmişlerdir. Gella vd. (1998) ise 0,5-0,7 cm'lik sürgün uçlarını MP katı ortamında kültüre almışlar ve ardından 37°C' de 16 saat aydınlık (5000 lüks), 34°C'de 8 saat karanlık periyot şeklinde sıcaklık uygulaması yapmışlardır. Uygulamadan bir yıl sonra, serada yetiştirilen incir bitkilerinde, İncir mozaik hastalığı belirtilerinin görülmediği bildirilmiştir.

In vitro kültür ile *Ficus carica* L. çoğaltılmasına yönelik Hepaksoy ve Aksoy (2006) tarafından klonlarının çoğaltımı için en uygun koşulları ve ortamı belirlemek üzere yapılan çalışmada ise seçilen üç incir (*Ficus carica* L.) için 1 mg dm⁻³ α -indol-3-bütirik asit (IBA), 1 mg dm⁻³ gibberellik asit içeren MS ortamının, 5 mg dm⁻³ 6-benziladenin içeren MS ortamından daha iyi olduğu belirtilmiştir. Alıştırma ortamı olarak da en iyi performansın volkanik tüfden elde edildiği bildirilmiştir.

Çömlekçioğlu vd. (2007) tarafından Alkuden ve Bursa Siyahı incir çeşitlerini FMV'den elemine etmek üzere meristem kültürleri kullanılarak çoğaltımlar yapılmış ve *in vitro*' da çoğaltılan bitkilerde virüs testlemeleri, dsRNA analiz tekniği yardımı ile belirlenmiştir. Termoterapi uygulaması ile gerçekleştirilen meristem kültürlerinin, virüssüz incir materyalini elde etmede uygun olduğu ifade edilerek, kültüre alınan bitkilerin çok sağlıklı olmaları ile birlikte, dsRNA virüs testlerinin duyarlı bir değerlendirme sağladığı belirtilmiştir.

şimdiye kadar Dünyada ve Ülkemizde İMH etmeninden ari incir fidan üretimine yönelik çalışmalarda materyalin virüslerden arındırıldıklarını gösteren hızlı ve güvenilir testleri uygulamak için gereken bilimsel veriler mevcut olmadığından uygulanamamıştır (Pontikis ve Melas, 1986; Lopez vd., 1998; Demiralay, 1997; Fraguas vd., 2004; Çömlekçioğlu vd., 2007) Ancak, bundan sonra elde edilen yeni bilimsel veriler (Elbeaino vd., 2009; Gattoni vd., 2009) bu viral testleri yapılabilir kılmıştır. şöyleki bugüne kadar saptanan tüm İMH etmenlerinin genom dizilimleri ve primerler belirlenmiş (Çizelge 2.3) olduğu için, sürgün ucu ve termoterapi ile virüsten arındırılmış incir üretim materyalinin RT-PCR yöntemi ile testlenme olanağı vardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Materyal

3.1.1. Sörvey Alanı ve Çalışma Materyali Hakkında Bilgiler

Sörvey alanı, 45-950 m rakımları arasında yer alan taban arazi ile dağlık alanlardaki incir bahçelerinden oluşmaktadır.

Bu çalışmanın materyalini, 2009-2010 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde Sarılop ve Bursa Siyahı incir bahçelerinde İMH belirtileri gözlenen ağaçlardan alınan yapraklar ve Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'ndan alınan 2 yaşındaki 20 incir fidanına (10 Sarılop, 10 Bursa Siyahı) ait dokular (yaprak ve kök) oluşturmuştur. Ayrıca testlerde negatif kontrol olarak kullanılmak üzere tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri kullanılmıştır. Arazi çıkışlarında simptomatolojik olarak, İMH ile enfekteli olduğundan şüphelenilen 1085 yaprak örneği toplanmış ve örneği 0-6 skalasına göre gruplara ayrılmıştır.

3.1.2. Mekanik İnokulasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Mekanik inokulasyon çalışmaları, sörvey alanlarından İMH etmeni ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ve 0-6 skalasına göre gruplara ayrıldıktan sonra testlemek amacı ile laboratuvara getirilmiş incir yaprakları, İncir mozaik hastalığı ile ilgili daha önceki çalışmalarda denenmiş olan indikatör bitkiler (Çizelge 3.1), steril havan ve havan eli, fosfat tampon çözeltisi, 2-merkaptetanol, sodyum sülfid, 500 mesh inceliğindeki karborandum tozu ve çeşme suyu kullanılarak yapılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmalarında, indikatör bitkilerin tohumlarının ekilmesi ve fidelerin yetiştirilmesi için kum, yanmış hayvan gübresi, toprak ve torf karışımı (1:1:1:1), plastik saksılar, plastik küvetler, plastik viyoller ve zaman zaman zararlılara karşı insektisit kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan indikatör test bitkilerinin tohumları Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Mekanik inokulasyon testinde kullanılacak indikatör bitkilerin isimleri, inokule edildiği dönem ve literatür bilgileri

İndikatör bitkilerin		İnokule edildiği dönem	Literatür
Latince ismi	Türkçe ismi		
<i>Catharanthus roseus</i>	Cezayir menekşesi	6 Yapraklı	Credi, 1998
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Sirken	5-6 Yapraklı	Özar vd., 1986 Serrano vd., 2004
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	Dikotiledon ve 2-4 Yapraklı	Özar vd., 1985 Salomon vd., 2002 Salomon, 2005
<i>Gomphrena globosa</i>	Hanım düğmesi	4-5 Yapraklı	Serrano vd., 2004
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv.'Samsun'	Tütün	4-5 Yapraklı	Serrano vd., 2004

3.1.3. *Aceria ficus* Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınma Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'ndan, İncir mozaik hastalığı etmeni ile bulaşık olduğu düşünülen ve *Aceria ficus* 'un yoğun bulunduğu Sarılop ve Bursa Siyahı incir ağaçları ve fidanlarına ait yapraklar ile 4-5 yaprak dönemindeki Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*), hıyar (*Cucumis sativus*) ve tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri *Aceria ficus* ile taşınma çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.4. Toplam RNA İzolasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Sörvey alanlarından İncir mozaik hastalık etmeni ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ve 0-6 skalasına göre gruplara ayrıldıktan sonra testlemek amacı ile laboratuvara getirilmiş incir yaprakları ve Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'ndan alınan 20 incir fidanına (10 Sarılop, 10 Bursa Siyahı) ait dokular (yaprak ve kök), ayrıca tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca, *Aceria ficus* ile taşınma çalışmaları sonucunda simptom gözlenen indikatör bitkilerden elde edilen bitki öz suları da çalışma materyalini oluşturmuştur. Toplam RNA izolasyon işlemi; tampon çözeltiler (Ek-3.1), steril havan ve havan eli, ependorf tüpler, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, masa tipi soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

3.1.5. Çift Sarmal RNA (dsRNA) İzolasyon Çalışmalarında Kullanılan Materyal

dsRNA analizi için, sörvey alanlarından İncir mozaik hastalığı etmeni ile enfekteli olduğundan şüphelenilen ve 0-6 skalasına göre gruplara ayrıldıktan sonra testlemek amacı ile laboratuvara getirilmiş incir yaprakları, 2 yaşındaki incir fidanlarının kökleri ve akar ile etmenin taşınması sağlanmış Cezayir menekşesi, hıyar ve tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı incir bitkileri kullanılmıştır. Ayrıca, dsRNA izolasyon işleminde; tampon çözeltiler (Ek-3.1), CF-11 selüloz kolon, ependorf tüpler, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, masa tipi soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. Reverse Transkriptaz–Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Çalışmalarında Kullanılan Materyal

İncir mozaik hastalık etmen/etmenlerinin moleküler tanısı ve dizi belirleme çalışmalarında DNA'ların elde edilmesi amacıyla yapılan RT-PCR ve PCR yöntemlerinde, virüs etmeni/etmenleri ile bulaşık bitkilerden elde edilen toplam RNA, SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase kiti (İnvitrogen 18064-022), *Taq* polimeraz (Termostabil DNA polimeraz enzim, 5U/μl, FERMENTAS, EP0401) ve 10X reaksiyon tampon çözeltisi, dNTPs set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 25 mM, FERMENTAS R0181), MgCl₂, MgCl₂ buffer, RNaz inhibitör (40U/μl FERMENTAS, EO0311), 1 kb DNA Ladder Markör (FERMENTAS SM0311), saf su, pipet ve steril pipet uçları, PCR tüpleri ve Çizelge (3.2)'de belirtilen virüs spesifik primerler kullanılmıştır. Virüs genomu üzerinde hedef bölgelerin çoğaltılması işleminde gerekli sıcaklıklar, Eppendorf marka PCR aleti kullanılarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. FLMaV-1,FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 etmenlerine ait primer baz dizileri, beklenen PCR ürünü büyüklüğü ve literatür bilgisi

Virüs	Primer çiftlerine ait baz dizileri	PCR ürünü	Literatür
FLMaV-1	N17s: 5'-CGTGGCTGATGCAAAGTTTA-3' N17a: 5'-GTTAACGCATGCTTCCATGA-3'	352 bp	Elbeaino vd., 2006
FLMaV-2	F3s: 5'-GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTG -3' F3a: 5'-TCCACCTCTGCGAAGCTAGAGAA-3'	360 bp	Elbeaino vd., 2007
FMV	5'-CGGTAGCAAATGGAATGAAA-3' 5'-AACACTGTTTTGCGATTGG-3'	302 bp	Elbeaino vd., 2009
FMaV-1	5'-CACGAGCAAGACAAAGAGAA-3' 5'-CACACTTACACATCTTACATCATCT-3'	298 bp	Walia vd., 2009

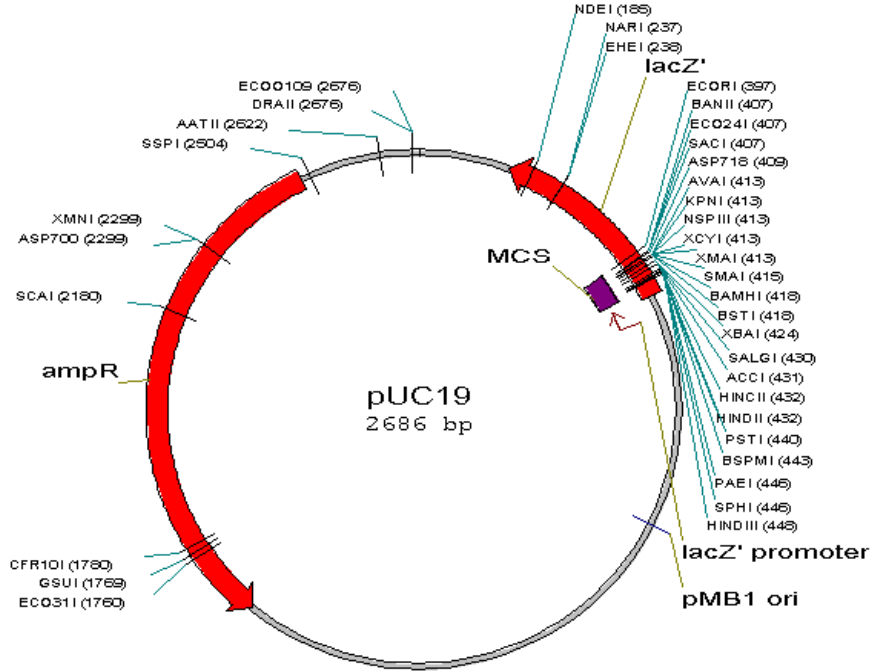
3.1.7. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında, çalışma konusu virüslere ait toplam RNA'lar, PCR ürünleri ve klonlama çalışmalarında elde edilen ürünler materyal olarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforez işleminde, agaroz (sigma), tampon çözeltiler (Ek-3.1), mini elektroforez cihazı (THERMO) ve güç kaynağı, UV ışık kaynağı (UVP Ultraviolet Transilluminator), Video Graphic yazıcı (Sony-Lip 895 CE) ile etidyum bromür muhafaza tankından yararlanılmıştır.

3.1.8. Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Çalışmada, ADÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edilen, pUC 19 plasmidini içeren *Escherichia coli* DH10B izolatu, GeneMark Plasmid Miniprep saflaştırma kiti, BHI (Brain Heart Infusion) broth besiyeri, *XbaI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan plazmidin haritası Şekil 3.1'de verilmiştir. Ayrıca, ependorf tüpler, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, masa tipi soğutmalı santrifüjle elektrotransfomasyon işleminin gerçekleştirildiği BİORAD marka elektroporatör ve kompetan hücre küveti kullanılmıştır.



Şekil 3.1. pUC 19 plasmid vektörünün haritası

3.1.9. Sürgün Ucu Kültürü ve Termoterapi Çalışmalarında Kullanılan Materyal

Sürgün ucu kültürü ve termoterapi çalışmalarında, Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu koleksiyon bahçesinden alınan İncir mozaik hastalığı ile enfekteli, 10 adet Sarılop ve 10 adet Bursa Siyahı incir çeşitlerine ait sürgünler, binoküler, bitki büyüme düzenleyici kimyasallar, 26 ± 1 'de 3500-4000 lüks ışık şiddeti sağlayabilen bitki büyütme odası, torf: perlit (1:1) karışımı, plastik saksılar kullanılmıştır.

3. 2. Yöntem

3.2.1. İncir Virüslerini Tanılamada Kullanılan Yöntemler

Çalışmada, Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde İncir mozaik hastalığına neden olan viral etmenlerin ortaya konulması amacıyla, Aydın İli, Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde belirlenen köylere arazi çıkışları yapılmış ve örnekler toplanmıştır. Bu örnekler, ticari primerlerinin temin edilmesi ile birlikte RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Bu işlemlerden sonra çalışma konusu virüsler ile enfekteli olduğu belirlenen örneklerden alınan dokular kullanılarak var olan virüslerin biyolojik (test bitkileri üzerine mekanik inokulasyon ve *Aceria ficus* ile taşınma çalışmaları) ve moleküler karakterizasyonları (dsRNA analizi, RT-PCR çalışmaları, klonlama ve dizi analizleri) gerçekleştirilmiştir. Sürgün ucu ve termoterapi ile elde edilen materyalin virüsten temiz olup olmadığı yine RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.

3.2.2. Sörvey Çalışmaları, Örneklerin Toplanması ve Muhafazası

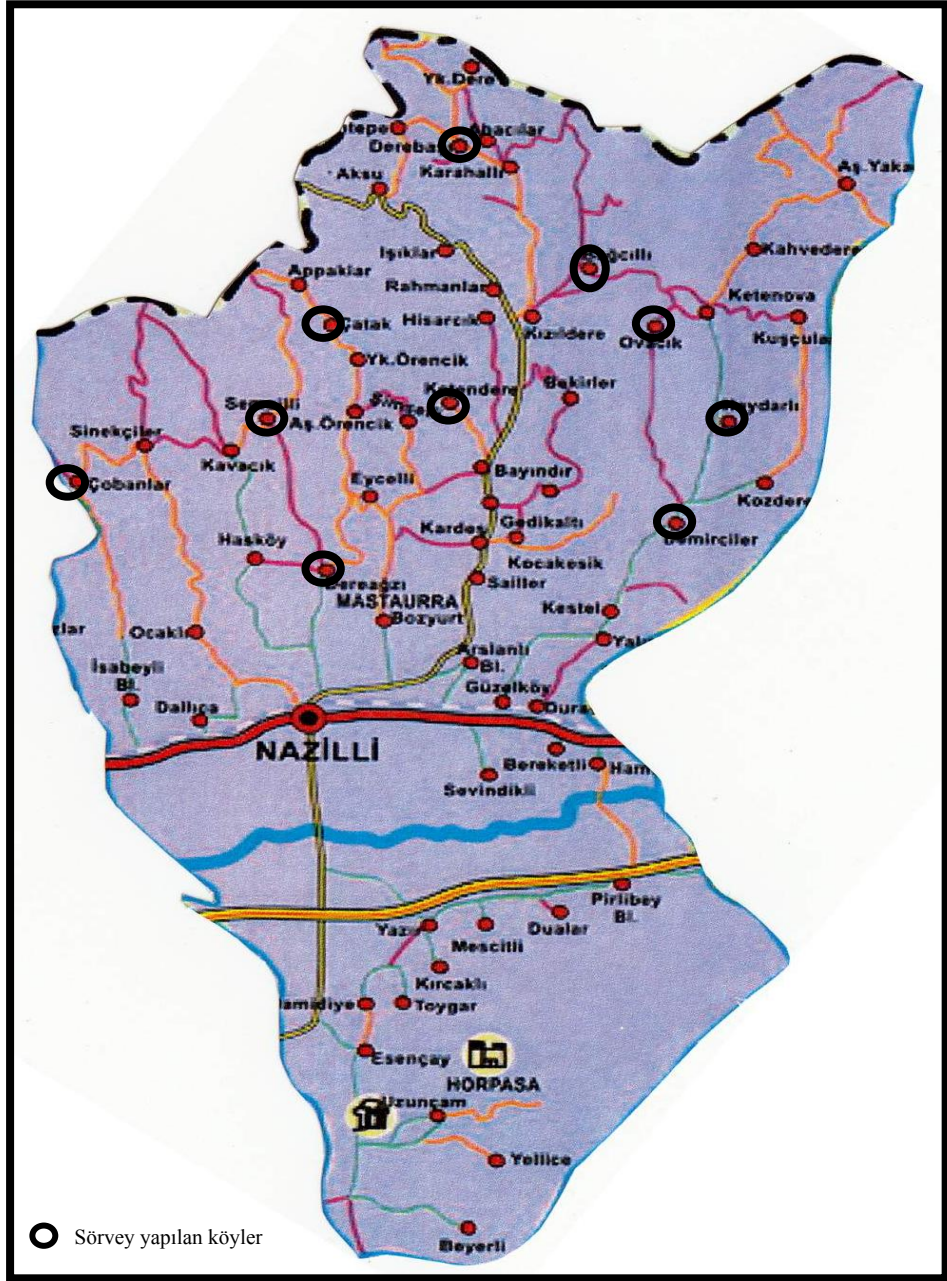
Aydın Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, 2009 yılı Çiftçi Kayıt Sisteminden alınan bilgiler doğrultusunda Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerine ait ağaç ve bahçe sayısı en fazla olan Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçeleri sörvey alanı olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Sörvey çalışmaları, İncir mozaik hastalığının yukarıda bahsedilen 4 ilçedeki yaygınlığını belirlemek ve çalışmada kullanılacak incir yaprak örneklerinin toplanması amacıyla 2009-2010 ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Çiftçi Kayıt Sistemine göre Aydın ilçelerine ait ağaç ve bahçe sayıları (Anonim, 2009)

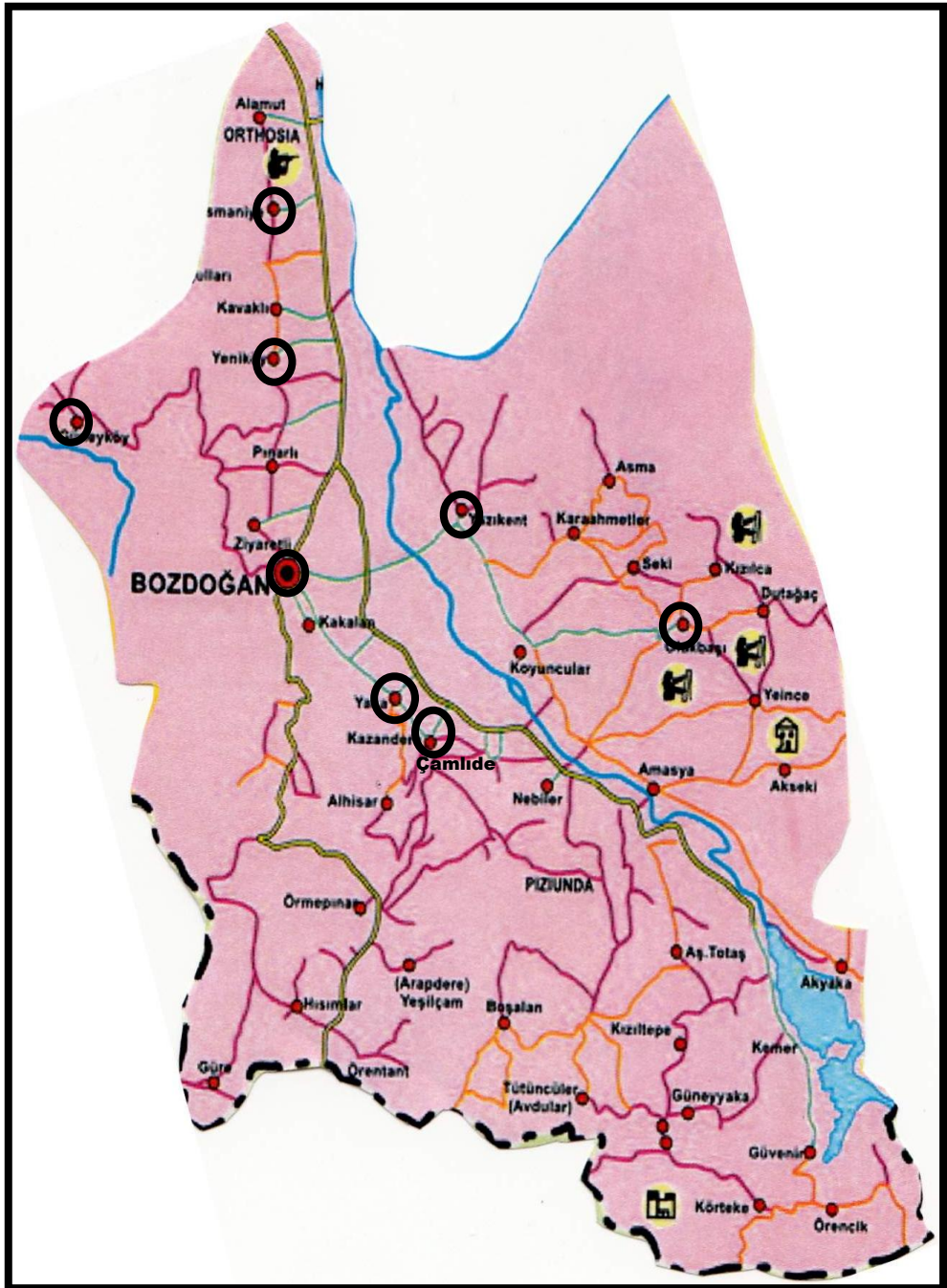
İlçe Adı	Ağaç Sayısı (adet)	Bahçe Sayısı (adet)
Nazilli	1.427.560	10.379
Germencik	1.342.340	16.291
İncirliova	500.722	2.348
Bozdoğan	321.420	2.111
Sultanhisar	318.300	1.874
Merkez	247.700	2.079
Kuyucak	204.520	1.508
Köşk	186.580	1.485
Buharkent	180.916	1.916
Yenipazar	160.786	520
Koçarlı	85.920	601
Karacasu	77.884	519
Kuşadası	28.820	205
Söke	28.682	130
Karpuzlu	6.016	39
Çine	4.278	16
Didim	648	17
TOPLAM	5.122.092	42.038

Nazilli ilçesinde, incir bahçelerinin yoğun olduğu 10 köy, Germencik ilçesinde 6 köy, İncirliova ilçesinde 3 köy ve Bozdoğan ilçesinde 8 köy sörvey alanını oluşturmuştur. Köylerin seçimi ise Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüklerinin, 2009 yılı Çiftçi Kayıt Sisteminden faydalanılarak yapılmış ve bu köylerdeki en fazla ağaç sayısının bulunduğu bahçeler dikkate alınmıştır. Bu köyler Nazilli ilçesinde, Dereağzı, Çobanlar, Haydarlı, Çatak, Demirciler, Derebaşı, Ketendere, Ovacık, Samailli ve Bağcılı köyleri (Şekil 3.2), Germencik ilçesinde, Dağyeni, Bozköy, Kızılcagedik, Balatcık, Abdurrahmanlar ve Mursallı köyleri (Şekil 3.3), İncirliova ilçesinde, İsafakılar, Erbeyli ve İkizdere köyleri (Şekil 3.3), Bozdoğan ilçesinde ise Bozdoğan Merkez, Osmaniye, Yeniköy, Güneyköy, Yazıkent, Olukbaşı, Yakaköy ve Çamlıdere köyleri (Şekil 3.4) olmuştur.

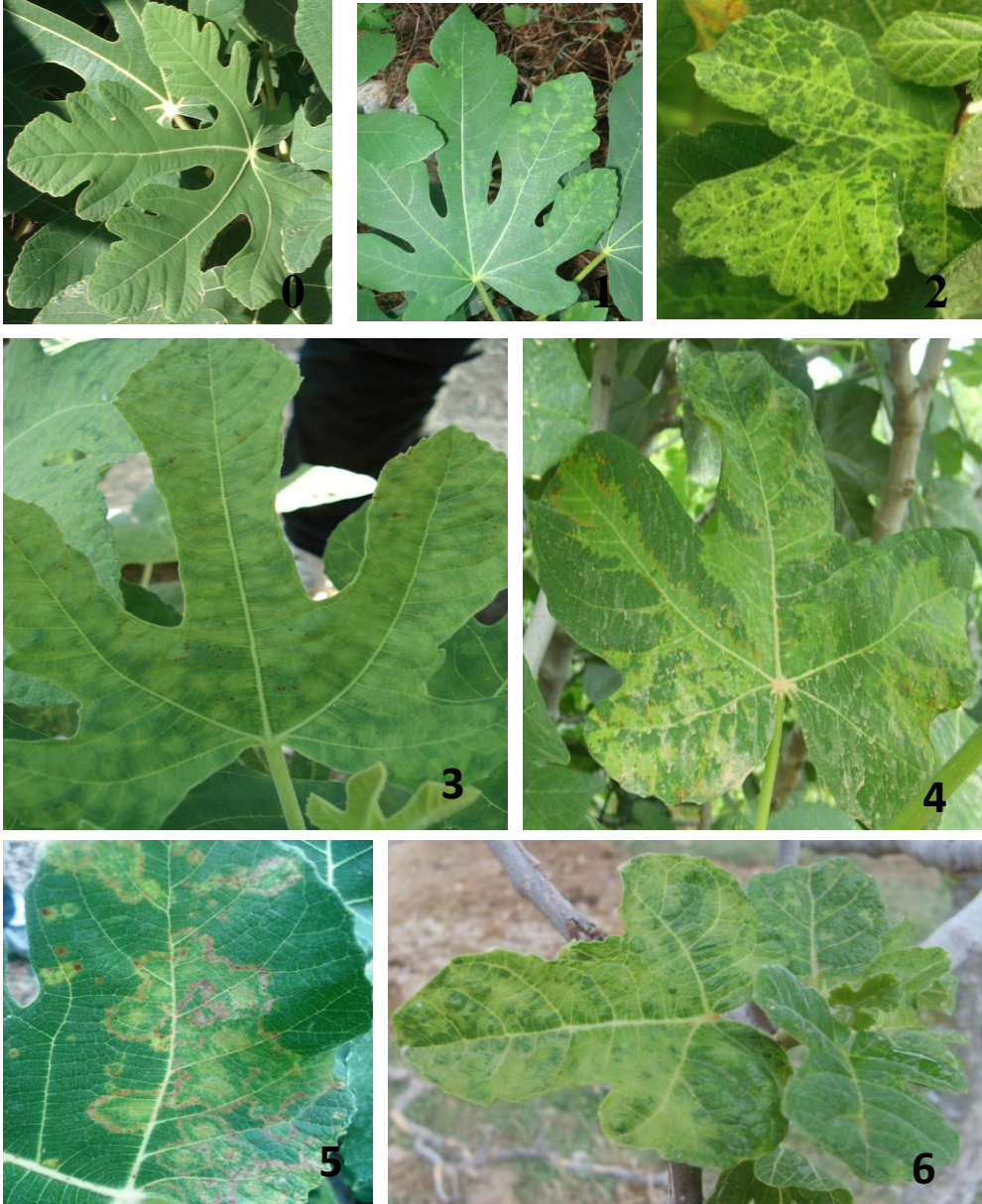
Sörvey yapılan bu köyler genelde dağlık alanda bulunmaktadır. Sörveyler ilçelere bağlı köylerdeki toplam bahçe sayısının % 5 gerçekleştirilmiş olup, incelenen ağaç sayısı da köylerdeki toplam ağaç sayısının % 1'ini temsil etmiştir. Çalışmada Barnett (1986)'ın sistematik örnekleme yöntemi kullanılmıştır. Barnett (1986)'ın sistematik örnekleme yöntemlerinden, çok yıllık bitkiler için ön gördüğü küçük bahçeler için b, büyük bahçeler için c ve e formları kullanılmıştır. Buna göre, küçük bahçelerde bahçenin bir köşesinden diğer bir köşesine kadar olan ağaçlar incelenerek yaprak örnekleri toplanmıştır. Büyük bahçeler için ise bahçenin köşegenlerinden çapraz (X) olacak şekilde ya da bahçenin köşesinden girilip W harfi çizerek ağaçlar incelenmiş ve yaprak örnekleri toplanmıştır. Örnekler, incir yaprakları üzerindeki mozaik belirtilerinin sınıflandırılması ile hazırlanmış olan 0-6 skalasına (Şekil 3.5) göre virüs ile enfekteli olduğu gözlenen ağaçlardan alınmıştır. Genelde virüsler ağaçta homojen dağılmadığından yaprak örnekleri ağacın değişik yerlerinden toplanmış, hastalık belirtilerini az ya da çok gösteren ağaçlar hasta olarak kabul edilmişlerdir. Hastalığın yaygınlığı, gezilen toplam bahçe sayısı içinde hastalıklı bahçe sayısı dikkate alınarak hesaplanmıştır. Toplanan örnekler etiketlenmiş ve polietilen poşetlere konularak çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Nazilli ilçesinde sörvey yapılan köyler



Şekil 3.4. Bozdoğan ilçesinde sörvey yapılan köyler



Şekil 3.5. İncir yaprakları üzerindeki mozaik belirtilerine göre hazırlanmış olan 0-6 skalası 0: Belirti yok, 1: Zayıf mozaik, 2: Orta şiddetli mozaik, 3: Şiddetli mozaik, 4: Damar bandlaşması, 5: Yaprak üzerinde pas belirtisi, 6: Küçük bozuk şekilli yapraklar üzerinde şiddetli mozaik

Çizelge 3.4. İncir mozaik hastalığının yaygınlığını belirlemek için sörvey yapılan ilçeler, ilçelere bağlı köyler, sörvey yapılan bahçe sayısı ve incelenen ağaç sayısı

İlçeler	İlçelere Bağlı Köyler	Bahçe Sayısı	Sörvey Yapılan Bahçe Sayısı	Ağaç Sayısı	İncelenen Ağaç Sayısı
Nazilli	Dereağzı	80	4	10.784	110
	Çobanlar	113	6	15.416	155
	Haydarlı	136	7	29.560	295
	Çatak	200	10	22.456	225
	Demirciler	229	11	22.696	225
	Derebaşı	229	11	71.584	710
	Ketendere	231	12	30.470	305
	Ovacık	308	30	83.888	840
	Samailli	432	21	60.322	600
	Bağcılı	434	21	97.150	950
Germencik	Kızılçagedik	140	7	43.060	430
	Abdurrahmanlar	165	8	33.930	340
	Balatcık	439	22	45.986	460
	Mursallı	450	23	54.890	550
	Dağyeni	570	28	90.476	900
	Bozköy	688	34	130.352	1300
İncirlioiva	İkizdere	107	5	16.432	165
	Erbeyli	111	6	17.902	180
	İsafakılar	434	22	107.930	1100
Bozdoğan	Olukbaşı	299	15	52.974	530
	Merkez	92	4	9.844	100
	Yazkent	49	3	8.884	90
	Yakaköy	79	4	7.248	75
	Güneyköy	21	1	5.938	60
	Yeniköy	38	2	4.474	45
	Çamlıdere	50	3	3.586	35
	Osmaniye	12	1	2.092	20
GENEL TOPLAM		6.130	321	1.080.324	10.795

İMİH'nın yaygınlığını belirlemek için Aydın İli' nin Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde toplam 27 köy ve 321 incir bahçesinde sörveyler gerçekleştirilmiş olup, toplam 10.795 ağaç incelenmiş ve 1085 adet yaprak örneği 0-6 skalasına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Aydın İli Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde sörvey yapılan köyler, incelenen ağaç sayısı ve incir çeşitlerine göre toplanan örnek sayıları

İlçeler	İlçelere Bağlı Köyler	İncelenen Ağaç Sayısı	Toplanan Enfekteli Yaprak Örneği Sayısı	İncir Çeşidi
Nazilli	Dereağzı	110	7	Sarılop
			4	Bursa Siyahı
	Çobanlar	155	10	Sarılop
			6	Bursa Siyahı
	Haydarlı	295	22	Sarılop
			8	Bursa Siyahı
	Çatak	225	23	Sarılop
	Demirciler	225	23	Sarılop
	Derebaşı	710	51	Sarılop
			20	Bursa Siyahı
	Ketendere	305	31	Sarılop
	Ovacık	840	68	Sarılop
			17	Bursa Siyahı
	Samailli	600	45	Sarılop
			15	Bursa Siyahı
	Bağcılı	950	85	Sarılop
10			Bursa Siyahı	

Çizelge 3.5. Aydın İli Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde sörvey yapılan köyler, incelenen ağaç sayısı ve incir çeşitlerine göre toplanan örnek sayıları (devam)

İlçeler	İlçelere Bağlı Köyler	İncelenen Ağaç Sayısı	Toplanan Enfekteli Yaprak Örneği Sayısı	İncir Çeşidi
Germencik	Kızılcagedik	430	35	Sarılop
			8	Bursa Siyahı
	Abdurrahmanlar	340	34	Sarılop
			Balatcık	460
	10	Bursa Siyahı		
	Mursallı	550	40	Sarılop
			15	Bursa Siyahı
Dağyeni	900	90	Sarılop	
Bozköy	1300	130	Sarılop	
İncirliova	İkizdere	165	9	Sarılop
			8	Bursa Siyahı
	Erbeyli	180	10	Sarılop
			8	Bursa Siyahı
	İsafakılar	1100	76	Sarılop
			34	Bursa Siyahı
Bozdoğan	Olukbaşı	530	42	Sarılop
			11	Bursa Siyahı
	Merkez	100	10	Sarılop
	Yazıkent	90	9	Sarılop
	Yakaköy	75	5	Sarılop
			3	Bursa Siyahı
	Güneyköy	60	6	Sarılop
	Yeniköy	45	5	Sarılop
	Çamlıdere	35	2	Sarılop
2			Bursa Siyahı	
Osmaniye	20	2	Sarılop	
Genel Toplam		10.795	1.085	896 Sarılop 189 Bursa Siyahı

3.2.3. Tohumdan Sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Mekanik inokulasyon, *Aceria ficus* ile test bitkilerine taşınma çalışmaları, dsRNA ve RT-PCR testlerinde kullanılmak üzere tohumdan sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri yetiştirilmiştir. Bunun için öncelikle Sarılop ve Bursa Siyahı incirlerinin taze meyveleri ikiye kesilerek içleri açılmış ve bir süre kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra meyve içindeki tohumlar bir cımbız yardımıyla meyveden ayrılmıştır. Elde edilen incir tohumları, 1:1:1:1 oranında gübre, kum, perlit ve toprak bulunan plastik saksılara ekilmiştir. Toprak harcı, 121°C'de 1 saat otoklavda sterilize edilmiştir. Sağlıklı olarak çimlenen her bir fide tek tek plastik bardaklar içerisine şaşırtılmıştır (Şekil 3.6). Bu işlemin ardından 2-3 günde bir sulamaları yapılmak suretiyle çalışmalarda kullanılmak üzere 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta, 10.000 lüks ışık altında, % 60-70 nem ve 25±2° C sıcaklığa sahip iklim odasına yerleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Tohumdan yetiştirilen Sarılop (a) ve Bursa Siyahı (b) incir fideleri

3.2.4. İncir Mozaik Hastalık Etmeninin Mekanik İnokulasyon ile Bazı Test Bitkilerine Taşınması

3.2.4.1. Toprak hazırlığı

Mekanik inokulasyon sırasında kullanılan test bitkilerini yetiştirmek üzere eşit oranda (1:1:1:1) gübre, kum, perlit ve toprak içeren harç hazırlanmıştır. Bu harç kullanılmadan önce olası bulaşmaları önlemek için 121°C'de 1 saat süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.4.2. Test bitkilerinin yetiştirilmesi

Çizelge 3.1’de yer alan test bitkilerine ait tohumlar, toprak karışımı içeren plastik dikdörtgen saksılara ekilmiştir. Sağlıklı olarak çimlenen her bir fide tek tek plastik bardaklar içerisine şaşırtılmıştır. Bu işlemin ardından 2-3 günde bir sulamaları yapılmak suretiyle inokule edilecekleri zamana kadar (yaklaşık 4-5 yapraklı oldukları döneme kadar) 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta, 10.000 lüks ışık altında, % 60-70 nem ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa sahip iklim odasında yetiştirilmişlerdir (Martelli vd., 1993) . Bitkilerin sağlıklı büyümeleri için gerekli makro ve mikro besin elementleri sulama suyuna ilave edilerek bitkilere verilmiştir. Zararlılara karşı gerektiğinde pestisit uygulamaları yapılmıştır.

3.2.4.3. Mekanik inokulasyon testinin uygulanması

RT-PCR yöntemi ile saptanan virüslerin biyolojik karakterizasyonlarının yapılması amacıyla, virüs ile bulaşık olduğu saptanan arazi örnekleri ile Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü incir fidanlığından alınan Bursa Siyahı ve Sarılop incir fidanlarına ait yaprak ve kökler inokulum olarak kullanılmış ve test bitkilerine inokule edilmiştir (Çizelge 3.6).

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanmak amacıyla, İncir mozaik hastalığı belirtileri gösteren enfekteli incir yapraklarından ve köklerinden yaklaşık 3-4 g doku sıvı azot ile steril porselen havanda ezilmiştir. Daha sonra pH’sı 7.2 olan ve % 1 oranında mercaptoethanol ile % 1 oranında polivinilpirolidon (PVP) içeren 10 ml’lik 50mM sodyum fosfat (Na-K) tamponunda ezme işlemi tekrarlanmış ve önceden karborandum tozu serpilmiş indikatör bitkilerin yapraklarına pamuk yardımıyla mekanik olarak inokule edilmiştir. Kısa bir süre bekledikten sonra inokulasyon yapılan yapraklar çeşme suyu ile yıkanmış ve indikatör bitkilerde belirti gözlenmesi amacıyla 2 ay süreyle kontrollü koşullardaki (% 60-70 oransal nem, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık periyot, 10000 lüks ışık ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık) iklim odasında gözlem altına alınmıştır (Serrano vd., 2004).

İnokulum olarak fidanlara ait köklerin kullanılabilmesi için öncelikle 2 yaşındaki tüplü fidanlar (Şekil 3.7) bir gece boyunca suda bekletilmiş ve ertesi gün akan suda yıkanarak toprakları uzaklaştırılmıştır. Açığa çıkan köklerden özellikle beyaz renkli olan taze kısımlar bir makas yardımıyla kesilmiş ve çalışmada kullanılıncaya kadar -20°C ’deki derin dondurucuda bekletilmiştir.

Çizelge 3.6. Mekanik inokulasyonda kullanılmak üzere 0-6 skalasına göre gruplandırılmış Sarılop ve Bursa Siyahı incir inokulum kaynakları

Çeşit İsmi	Skala No	Grup İsmi	İnokulum Kaynağı
Sarılop	1 (Zayıf mozaik)	A	Ağaç, yaprak
	2 (Orta şiddetli mozaik)	B	Ağaç, yaprak
	3 (Şiddetli mozaik)	C	Ağaç, yaprak
	4 (Damar bandlaşması)	D	Ağaç, yaprak
	5 (Yaprakta pas)	E	Ağaç, yaprak
	6 (Küçük deforme yapraklar üzerinde şiddetli mozaik)	F	Ağaç, yaprak
	4 (Damar bandlaşması)	G	Fidan, yaprak
	5 (Yaprakta pas)	H	Fidan, kök
Bursa Siyahı	1 (Zayıf mozaik)	A	Ağaç, yaprak
	2 (Orta şiddetli mozaik)	B	Ağaç, yaprak
	3 (Şiddetli mozaik)	C	Ağaç, yaprak
	4 (Damar bandlaşması)	D	Ağaç, yaprak
	5 (Yaprakta pas)	E	Ağaç, yaprak
	6 (Küçük deforme yapraklar üzerinde şiddetli mozaik)	F	Ağaç, yaprak
	4 (Damar bandlaşması)	G	Fidan, yaprak
	5 (Yaprakta pas)	H	Fidan, kök



Şekil 3.7. İki yaşındaki Sarılop; tüplü incir fidanı (a), fidanı kökleri (b) ve iki yaşındaki Bursa Siyahı incir fidanı kökleri (c)

Çalışmalar, ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bitki Virüs Hastalıkları iklim odalarında yürütülmüştür. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş, kontrol olarak da her test bitkisinden 3 tanesinde karborandum ile mekanik yaralar açılmış ve inokulum sürülmeden, çeşme suyunda yıkandıktan sonra kontrol olarak bekletilmiştir.

3.2.5. İncir Mozaik Hastalık Etmeninin *Aceria ficus* Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınma Çalışmaları

2010 yılı Eylül ayında, Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'ndan, mozaik belirtisi gösteren (İncir mozaik hastalık etmeni ile bulaşık olduğu düşünülen) ve *Aceria ficus*'un yoğun bulunduğu Sarılop ve Bursa Siyahı incir ağaçları ve fidanlarına ait yapraklar toplanmış ve ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji İklim odasına getirilmiştir. Daha sonra bu yapraklardan, yaprak delici ile küçük parçalar kesilmiştir. Üzerinde 6-8 adet *Aceria ficus* ergini bulunan bu yaprak parçaları, 4-5 yaprak dönemindeki Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*), hıyar (*Cucumis sativus*) ve tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri üzerine yerleştirilmiştir (Credi, 1998).

Aceria ficus bulunan bu yaprak parçalarının alt yüzeyi, test bitkilerinin alt yüzeyine gelecek şekilde bir ataç yardımıyla tutturulmuştur. Akarların test bitkileri üzerinde yaşayabilmeleri ve beslenmelerini sağlamak amacıyla birkaç gün süreyle akar taşınmış bitki yapraklarına su püskürtülmek suretiyle nemli koşullar sağlanmıştır. Bu bitkiler gündüz 25-27°C, gece 22-24° C sıcaklık ve 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyota ayarlı iklim odalarında 6 hafta boyunca düzenli olarak simptom gelişimi için gözlem altında tutulmuştur (Credi, 1998). Simptomlar değerlendirilirken kloroz, cüceleşme, lokal lezyonlar, mozaik ve nekroz oluşumları ve benzeri şekil bozuklukları (Serrano vd., 2004) alınmıştır.

3.2.6. İncir Mozaik Hastalığına Neden Olan Etmenlerin dsRNA Analizi

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenin dsRNA analizinde iki farklı yöntem denenmiştir (Elbeaino vd., 2009; Ding vd., 2007; Foissac vd., 2000). dsRNA analizi için mozaik belirtisi gösteren incir yaprakları, 2 yaşındaki belirti gösteren incir fidanlarının kökleri ve hastalık etmenini akar ile taşıdığımız Cezayir menekşesi, hıyar ve tohumdan yetiştirilmiş sağlıklı incir bitkileri kaynak olarak kullanılmıştır.

Ayrıca incir yapraklarındaki beyaz sütsü yapışkan maddelerden kaynaklanacak problemleri bertaraf ederek etmene ait dsRNA'ları en iyi şekilde izole etmek için incir yaprakları; dondurulmuş (-80° C), kurutulmuş (65° C'ye ayarlı inkübatörde 48 saat tutulduktan sonra toz haline getirilen örnekler +4° C'de saklanmıştır, Sipahioğlu vd., 2007), ve taze olmak üzere üç farklı şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

3.2.6.1. Fenol/Kloroform kullanılarak uygulanan CF-11 selüloz kolon yöntemi

Fenol/Kloroform kullanılarak uygulanan CF-11 selüloz kolon yöntemi farklı iki araştırmacıya (Elbeaino vd., 2009; Ding vd., 2007) göre gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki Ding vd. (2007) tarafından uygulanmış olan dsRNA analiz yöntemidir. Bu yöntemde; 4 g enfekteli yaprak örneği, 4 ml 1 x STE (0.1M NaCl, 0.05M tris, 0.001M EDTA pH: 6.8), 0.5 ml SDS (% 10), 0.5 ml PVP ve 1 ml 2 mercaptaetanol ile ezilmiştir. Ardından 10 ml fenol : kloroform (1:1) ilave edilerek 45 dakika buz üzerinde çalkalanmıştır. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjden sonra 6 ml'lik sıvı faz 50 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1.1 ml % 95 etanol ilave edilmiştir. Her tüpe 1 gram selüloz ilave edilmiş ve en az bir saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Çalkalama sonrası örnekler kolona dökülmüş ve % 16 etanol içeren 40 ml 1xSTE ile yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama sonrası dsRNA' lar 20 ml 1xSTE 50 ml'lik santrifüj tüpüne toplanmış ve % 1'lik agaroz jelde 55 V' da 3 saat elektroforez edilmiştir. Boyama ethidium bromide ile yapılmış ve ışık kaynağında fotoğrafı çekilmiştir.

Diğeri ise Elbeaino vd. (2009) tarafından uygulanmış olan CF-11 selüloz kolon yöntemi olup aşağıdaki üç aşama buyapılmıştır.

1. Toplam RNA ekstraksiyonu ve saflaştırma aşaması:

10 g enfekteli yaprak örneği, 30 ml 2x STE (0.1M NaCl, 0.05M tris, 0.001M EDTA pH: 6.8), 12 ml SDS (% 10), 0.6 ml bentonite ve 0.6 ml 2 mercaptaetanol içeren 50 ml falcon tüpe konulmuş ve 5 dakika buz üzerinde çalkalanmıştır. Ardından 15 ml fenol ve 15 ml kloroform: izoamilalkol (1:1) ilave edilerek 45 dakika buzda çalkalanmıştır. 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjden sonra sıvı faz 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 15 ml fenol ve 15 ml kloroform: izoamilalkol (1:1) ilave edilerek 10 dakika daha çalkalanmıştır.

10.000 rpm'de 15 dakika santrifüjden sonra sıvı faz 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve sıvı faz hacminin 0.2 katı kadar % 95 etanol ilave edilmiştir. Daha sonra her tüpe 1 gram selüloz ilave edilmiş ve en az bir saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Çalkalama sonrası örnekler kolona dökülmüş ve % 17 etanol içeren 60 ml 1 x STE ile yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama sonrası dsRNA'lar, 10 ml 1x TE ile 50 ml'lik santrifüj tüpüne toplanmış üzerine 25 ml % 95 etanol ve 1 ml sodyum asetat ilave edilerek -20° C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

2. DNaz, RNaz ve Proteaz K Enzimlerinin uygulanması;

-20° C'de bir gece bekletilmiş tüpler 11.000 rpm'de 25 dakika 4° C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası sıvı faz atılmış ve pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. 1 ml TE solusyonu ile resüspanse edilmiş ve ependorf tüpe alınmıştır. 8000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldıktan sonra bu süspansiyon iki ependorf tüpe 400 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Üzerlerine 1 ml % 95 etanol ve 40 µl sodyum asetat ilave edilmiş -70° C'de 2 saat bekletilmiştir. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra sıvı faz atılmış, pellet üzerine 0.5 ml % 70 soğuk etanol ilave edilmiştir. 10.000 rpm'de 7 dakika santrifüj sonrası etanol uzaklaştırılmış ve pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Etanol iyice uzaklaştıktan sonra pelet bulunan ependorf tüp içine; 98 µl steril distile su, 1µl MgCl₂ ve 1 µl DNase (1mg/ml) ilave edilmiş ve 37° C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 15 µl SSC 20X, 32 µl steril distile su, 3 µl RNase (25mg/ml) yine aynı ependorf tüpe ilave edilerek yine 37° C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 3µl proteaz K (5mg/ml) ilave edilmiş ve yine 37° C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 30 µl steril distile su, 20 µl % 10 SDS, 200 µl fenol:tris ilave edilmiş ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı faz yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 100 µl phenol tris, 100 µl kloroform ilave edilerek yine 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 500 µl % 95 etanol ve 20 µl sodyum asetat ilave edilerek -20° C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

3. dsRNA'nın elektroforez analizi;

13.000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilen ependorf tüplerden sıvı faz uzaklaştırılmış ve pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra 15 µl steril distile su ile pelet resüspanse edilmiş hemen -20° C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Ardından % 1' lik agaroz jelde 55 V'da 3 saat elektroforez edilmiş ve boyama ethidium bromide ile yapılmış ve ışık kaynağında fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.6.2. Silica partikül süspansiyon yönteminin modifiye edildiği CF-11 selüloz kolon yöntemi

Bu yöntem silica partikül süspansiyon yöntemine (Foissac vd., 2000), CF-11 selüloz kolon yönteminin modifiye edilmiş halidir (Açıkgöz vd., 2007).

10 g enfekteli yaprak örneği 20 ml ezme solüsyonu (4M guanidine thiocynate, 0.2 M NaOAc, 25 mM EDTA, 1 M KOAc, % 2.5 PVP-40,% 1 2-ME) ile steril bir havan içinde ezilmiş ve tüpler 70° C'ye ayarlı su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. 10000 rpm'de 15 dakika santrifüjün ardından 10 ml süpernatant içinde 5 ml etanol, 1 ml resüspanse edilmiş silica ve 8 ml 6M sodyum iyodid bulunan yeni bir tüpe aktarılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 10000 rpm'de 2 dakika santrifüjün ardından süpernatant boşaltılmış ve pellet yıkama solüsyonu ile yakanmış ve 3 ml RNaz içermeyen su ile resüspanse edildikten sonra 70° C'ye ayarlı su banyosunda 4 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 10.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz yeni tüpe alınmış ve % 95 alkol ilavesinden sonra 1 gece -20° C'ye ayarlı derin dondurucuda inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyon sonrası tüpler, 4° C'de, 10.000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı faz atılmış pellet 5 ml 1xSTE ile resüspanse edilmiş ve aynı tüplere 2.45 ml % 95 etanol ilave edildikten sonra CF-11 sellüloz kolona geçilmiştir. CF-11 selüloz kolon yönteminde ise öncelikle; örneklerin bulunduğu tüplere 0.5 gram CF-11 selüloz ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından 10 ml' lik kolonlara 0.5 gram CF-11 selüloz ilave edilmiş ve % 16 etanol içeren 1xSTE ile kolonlar yıkanmıştır. Daha sonra örnekler bu kolonlara dökülmüş ve süzölmeleri beklenmiştir.

Örnekler iyice kolondan süzildükten sonra % 16 etanol içeren 1xSTE ile kolonlar beyazlaşmaya kadar yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası 4 ml 1xSTE ile dsRNA'ların toplama işlemine geçilmiştir. Toplama işlemi sonrası 12 ml etanol, 400 µl 3 M sodyum asetat ilave edilmiş -20° C'ye ayarlı derin dondurucuda bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilen tüplerden sıvı faz uzaklaştırılmış, pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan pelet 0.3 ml TBE ile resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen örnekler % 1'lik agaroz jelde 55 V'da 3 saat elektroforez edilmiştir. Boyama ethidium bromide ile yapılmış ve ışık kaynağında fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.7. İncir Mozaik Hastalığına Neden Olan Etmenlerin Reverse transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Tanılanması

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerin tanılanması için kullanılacak olan RT-PCR yönteminde, kalıp olarak toplam RNA ve dsRNA ayrı ayrı kullanılmıştır. Toplam RNA ve dsRNA izolasyonlarından sonra tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezine ve ardından uygun primerler (Çizelge 3.2) ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Ancak FMaV-1 primerleri ile yapılacak PCR testi, literatürde verildiği şekliyle toplam RNA'dan direkt olarak RT-PCR testi (Walia vd., 2009) uygulaması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan yaprak örneklerinden Toplam RNA ekstraksiyonu

Toplam RNA ekstraksiyonu, mozaik belirtisi gösteren Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarından ve akar ile etmenin taşınması sağlanmış *Cataranthus roseus* (Cezayir menekşesi) bitkilerine ait yapraklardan yapılmıştır. İncir yapraklarından elde edilecek, RNA saflığını olumsuz etkileyen sütsü madde ve fenolik bileşiklere engel olabilmek için, bu yapraklar; taze, dondurulmuş (-80° C) ve kurutulmuş olmak üzere üç farklı şekilde hazırlanmıştır. Kurutma işlemi Sipahioğlu vd. (2007) göre yapılmış olup daha sonra RNA ekstraksiyonu Foissac vd. (2000)' ne göre gerçekleştirilmiştir.

Toplam RNA ekstraksiyonu için 100 mg enfekteli yaprak örneği 1 ml ezme solüsyonu (4 M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc, 25 mM EDTA, 1 M KOAc, % 2.5 PVP-40) ile homojenize edilmiş ve 500 µl sıvı kısım steril endorf tüplere alınmıştır. Daha sonra bu tüplere, 100 µl % 1'lük sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler 70° C'de 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra buz üzerine alınmış ve 5 dakika da burada inkübe edilmiştir. 14000 rpm 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra 300 µl' lik sıvı üst faz (supernatant), içinde 150 µl of etanol, 25 µl of resüspanse edilmiş silica ve 300 µl 6 M sodyum iyodid bulunan steril endorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 6000 rpm' de 1 dakika santrifüjün ardından tüp içindeki sıvı faz uzaklaştırılmış ve pellet yıkama solüsyonu ile iki kez yıkandıktan sonra 150 µl of RNase içermeyen su ile resüspanse edilmiştir. Resüspanسیون sonrası 4 dakika 70° C' de inkübe edilmiş tüpler 14000 rpm' de 3 dakika satrifüj edilmiş ve sıvı faz yeni endorf tüplere aktarılmış ve -20° C' deki derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.7.2. İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan örneklerden elde edilen dsRNA' ların denatürasyonu

İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan ve 3.2.5' de bahsedilen örneklerden elde edilen dsRNA' lar RT-PCR'de kalıp olarak kullanılmadan önce denatüre edilmiştir. Bunun için 7 µl dsRNA, 2 µl metil merkürük hidroksit (100 mM) ve 1 µl 3' primer ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Elbeaino vd., 2007). Bu aşamadan sonra cDNA sentezine geçilmiştir.

3.2.7.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA)' nın sentezi

cDNA sentezi SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase kiti kullanılarak, kit içinde verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpünün içine; 2 µl kalıp RNA, 1µl (100 mM/ µl) primer, 1 µl 10 mM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP, dTTP' nin her biri 10 mM olacak) ilave edilmiş ve steril distile su ile 12 µl' ye tamamlanmıştır. Daha sonra karışım, 65° C'de 5 dakika ısıtılmış ve sonrasında hemen buz üzerine konulmuştur. Ardından 4 µl 5X first strand buffer, 2 µl 0.1 M dithiothreitol (DDT), 1 µl RNaseOUT (40 units/µl) ilave edilmiş iyi bir şekilde karıştırılmıştır.

Karışım, 42° C’de 2 dakika inkübe edilmiş ardından 1 µl SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase ilave edilmiş ve 42° C’ de 50 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reverse transcriptase inaktivasyonu için karışım 70° C’ de 15 dakika ısıtılmıştır. cDNA’ ya karşılık tamamlayıcı RNA’ ları uzaklaştırmak için 1 µl *Escherichia coli* RNaseH ilave edilmiş ve 37° C’ de 20 dakika karışım inkübe edilmiştir. PCR amplifikasyonunda kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20° C’ de cDNA’ lar muhafaza edilmiştir.

3.2.7.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA)’ nın PCR ile çoğaltılması

Tamamlayıcı DNA (cDNA)’ nın PCR ile çoğaltılması işleminde 24 µl PCR karışımına 1 µl cDNA ilave edilerek PCR tüpünde son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR; 2.5 µl 10X reaksiyon solüsyonu (200 mM Tris-HCL pH: 8.4, 500 mM KCl) 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl dNTPs (10 mM), her bir primerden 0.5 µl (100 pmol/µl), 0.2 µl *Taq* DNA polimeraz ve 17.8 µl RNase içermeyen steril sudan oluşmaktadır. Her primer çifti için uygun PCR koşullarında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7). Amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürünü DNA’ların % 2’lik agaroz jelde ve 100 voltta 30 dakikada doğrusal hareketi sağlanmış ve etidyum bromide ile boyanarak gözlenmiştir.

3.2.7.5. İncir mozaik ilişkili virüs 1 (FMaV-1) için toplam RNA’dan direkt RT-PCR testi

Tek basamaklı RT-PCR protokolü uygulanarak yapılan bu işlemde, 2.5 µl 10X reaksiyon solüsyonu (200 mM Tris-HCL pH: 8.4, 500 mM KCl), 1.1 µl MgCl₂ (25 mM), 1.25 µl 0.1 M dithiothreitol, 0.5 µl dNTPs (10 mM), 1.25 µl primer seti (10 pmol/µl), 0.25 µl *Taq* DNA polimeraz ve 0.35 µl revers transkriptaz enzimi içeren 25 µl’ lik reaksiyon karışımı kullanılmıştır. FMaV-1 için uygun RT-PCR koşulunda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. FLMaV-1, FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 etmenlerinin PCR koşulları (sıcaklık dereceleri ve süreleri) ve döngü sayıları

Virüs	PCR koşulları	Döngü sayısı
FLMaV-1	94°C/3 dk	1
	94°C/35 sn 55°C/30 sn 72°C/35 sn	33
	72°C/5 dk	1
FLMaV-2	94°C/4dk	1
	94°C/30sn 58°C/30sn 72°C/40sn	35
	72°C/7dk	1
FMV	94°C/4dk	1
	94°C/30 sn 58°C/30 sn 72°C/30 sn	35
	72°C/7dk	1
FMaV-1	52°C/30 dk	1
	94°C/30 sn 54°C/45sn 72°C/1dk	35
	72°C/7dk	1

3.2.8. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)' nun da Sonuç Alınan İncir Viral Etmenlerinin Klonlama Çalışmaları

Klonlama çalışmaları, RT-PCR da mozaik belirtisi gösteren örneklerde pozitif sonuç veren FMV ve FMaV-1 için uygulanmıştır. Öncelikle, FMV ve FMaV-1 viral etmenlerine özgü, *EcoRI* ve *XbaI* enzim kesim noktalarını içerecek şekilde dizayn edilmiş primer çiftleri ile RT-PCR testleri yapılmıştır (Çizelge 3.8). RT-PCR testleri sonucunda elde edilen FMV ve FMaV-1 etmenlerini tanıma bölgelerini ve enzim kesim noktalarını içeren, çoğaltılmış DNA' lar ile klonlama vektörü olarak *Escherichia coli* DH10B bakterisinden izole edilmiş olan pUC19 plazmidi (klonlama vektörü) kullanılmıştır. Daha sonra restriksiyon enzimleri ile kesimleri yapıp presipitasyon ve ligasyon işlemlerini takiben oluşturulan rekombinant DNA (FMV/FMaV-1 çoğaltılmış DNA+pUC19 plazmid DNA), hazırlanan kompetan hücreye elektrotransformasyon yöntemiyle transferi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen klonlardan ekstrakte edilen rekombinant plazmitlerde insert genin (FMV ve FMaV-1 çoğaltılmış DNA) varlığı elektroforez, mavi beyaz koloni oluşumu ve PCR taraması ile ortaya konmuştur. Klonlama çalışmaları Bozdoğan vd. (2010)' ne göre yapılmıştır.

Çizelge 3.8. FMV ve FMaV-1 etmenlerinin, *EcoRI* ve *XbaI* kesim noktaları eklenen primer çiftlerine ait baz dizilimleri

Primer Adı	Eklenen Enzim Kesim Noktası	Primer Baz Dizilimi
FMV-RNA1r Eco	5'-AAAGAATTC	CGGTAGCAAATGGAATGAAA-3'
FMV-RNA1f Xba	5' TTTTCTAGA	AACACTGTTTTTTCGATTGG 3'
FMaV r Eco	5'-AAAGAATTC	CACGAGCAAGACAAAGAGAA-3'
FMaV r Xba	5'-TTTTCTAGA	CACACTTACACATCTTACATCATCT-3'

3.2.8.1. pUC 19 vektörü içeren *Escherichia coli* DH10B bakterisinden plazmid ekstraksiyonu

Escherichia coli DH10B vektörü pUC19 plazmid DNA'sı GeneMark Plasmid Miniprep kiti kullanılarak izole edilmiştir. Bunun için öncelikle, sıvı kültür (Tryptic Soy Broth; Fluka-22092) içinde, 37° C'de 1 gece inkübe edilen pUC19 içeren bakteri kültüründen 1.5 ml ependorf tüpe alınmış ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak pellet 200 µl resüspanسیون solusyonu ile homojen hale getirildikten sonra 200 µl liziz solusyonu eklenerek 4-5 kez alt üst edilmiştir. Daha sonra 200 µl nötralizasyon solusyonu eklenip yine 4-5 kez ependorf tüpler alt üst edilmiş ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Oluşan beyaz pellet bozulmadan sıvı kısım GeneMark Spin kolonuna aktarılmış ve 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Toplayıcı tüpteki sıvı boşaltılıp, kolona 600 µl yıkama solusyonu eklenerek 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve toplayıcı tüpteki sıvı atılmış ve kolon tekrar santrifüj edilmiştir.

Yıkama işlemi 2 kere yapılmıştır. Kolon steril yeni bir ependorf tüpe alınarak yıkama solusyonu içinde bulunan etanolun uzaklaştırılması için 5 dakika 37° C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kolon üzerindeki filtreli membran kısma dokunmadan üzerine 50 µl yıkama solusyonu eklenip 2-3 dakika oda sıcaklığında beklenip 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş kolon uzaklaştırıldıktan sonra içinde plazmid bulunan ependorf tüp -20° C'de ki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.8.2. pUC 19 plazmid DNA'sının (klonlama vektörü) *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimleri ile kesimi

İzolasyonu yapılan pUC19 plazmid DNA'sı *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimi ile kesilerek düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. *EcoRI* endonükleazı genom üzerinde 5'-GAATTC-3' dizilerini tanıyan ve 1. pozisyondaki G ile 2. pozisyondaki A bazları arasından DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan bir enzimdir. Benzer şekilde *XbaI* endonükleazı genom üzerinde 5'-TCTAGA-3' dizilerini tanıyan ve 1. pozisyondaki T ile 2. pozisyondaki C bazları arasından DNA'yı keserek yapışkan uç oluşturan bir enzimdir.

pUC 19 içeren *Escherichia coli* DH10B bakterisinden elde edilen plazmid DNA, *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile yapışkan uç oluşturacak şekilde kesimi yapılmıştır. Bunun için sırasıyla 10 µl plazmid DNA, 2 µl restrüksiyon solüsyonu, 1 µl *XbaI* enzimi, 1 µl *EcoRI* enzimi, 1 µl CIAP (Alkale Fosfataz) ve 5 µl dH₂O steril bir ependorf içine konulmuş ve 37° C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5 µl'si alınarak DNA markörü ile %1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir.

3.2.8.3. İncir mozaik virüsü (FMV) primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA'nın *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimleri ile kesimi

RT-PCR testleri sonucunda elde edilen FMV etmenini tanıma bölgesini ve enzim kesim noktasını içeren 10 µl çoğaltılmış DNA, 2 µl restrüksiyon solüsyonu, 1 µl *XbaI* enzimi, 1 µl *EcoRI* enzimi ve 6 µl dH₂O steril bir ependorf içine konulmuş ve 37° C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5 µl'si alınarak DNA markörü ile % 1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan 15 µl ampikon DNA, kesimi yapılmış klonlama vektörü ile rekombinant DNA oluşturmak üzere sırasıyla presipitasyon ve ligasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.4. İncir mozaik ilişkili virüs 1 (FMaV-1) primerleri kullanılarak RT-PCR’de elde edilen DNA’nın *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimleri ile kesimi

RT-PCR testleri sonucunda elde edilen FMaV-1 etmenini tanıma bölgesini ve enzim kesim noktasını içeren 10 µl çoğaltılmış DNA, 2 µl restrüksiyon solüsyonu, 1 µl *XbaI* enzimi, 1 µl *EcoRI* enzimi ve 6 µl dH₂O steril bir ependorf içine konulmuş ve 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5 µl’si alınarak DNA markörü ile %1 w/v’lik agaroz jelde incelenmiştir. Geriye kalan 15 µl amplikon DNA, kesimi yapılmış klonlama vektörü ile rekombinant DNA oluşturmak üzere sırasıyla presipitasyon ve ligasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.5. *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimleri ile kesimleri yapılmış pUC19 plasmid DNA’sı ile FMV ve FMaV-1 primerleri kullanılarak RT-PCR’de elde edilen DNA’ların presipitasyonu

Kesimi yapılmış 15 µl vektör plazmid DNA ile 15 µl FMV primerleri kullanılarak RT-PCR’de elde edilen DNA’lar 85 µl distile su ile 100 µl’ye tamamlanmıştır. Daha sonra her iki tüpe de 100 µl Fenol : Kloroform : İzomilalkol eklenip karıştırılarak 10.000 rpm’ de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra vektör plazmid DNA ile FMV primerleri kullanılarak RT-PCR’ de elde edilen DNA’ lar bu aşamada tek bir ependorf tüp içinde birleştirilmiştir. 20 µl 3M NaOAc (pH: 5.2) eklenip karıştırıldıktan sonra 200 µl % 95 isopropanol ilave edilmiştir. Daha sonra 20 dk. -20° C’de inkübasyona bırakılmış ve sonra ependorf tüp 30 dk. 13.000 rpm’ de + 4° C’de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak pellet üzerine 300 µl % 70’ lik etanol eklenmiş ve 13.000 rpm’ de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Bu aşamada vektör plazmid DNA’ sı ile FMV primerleri kullanılarak RT-PCR’ de elde edilen DNA’ lar Na-asetat/etanol uygulaması ile çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası sıvı atılmış, pellet kuruduktan sonra 17 µl steril distile suda çözülmüş ve + 4° C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.8.6. Presipitasyonu yapılmış pUC19 plazmid DNA'sı ile FMV ve FMaV-1 primerleri kullanılarak RT-PCR'de elde edilen DNA' ların Ligasyonu

Presipitasyonu gerçekleştirilmiş FMV ve FMaV-1 RT-PCR cDNA' ları ile pUC19 plazmid DNA' sının ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Bu aşamada 17 µl plazmid + ampikon DNA karışımı, 2 µl ligaz tamponu ve 1 µl T4 ligaz enzimi 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra gece boyunca + 4° C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası presipitasyon işlemi tekrarlanmış ve pUC19 rekombinant vektör elde edilmiştir.

3.2.8.7. *Escherichia coli* DH10B bakteri hücrelerinin kompetent (alıcı) hale getirilmesi

Escherichia coli DH10B ekilmiş plaktan tek bir koloni alınarak 5 ml BHI (Brain Heart Infusion) sıvı besiyerine tek bir koloni inoküle edilerek 37° C' de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 50 ml BHI besiyeri içeren tüpe, 1 ml' lik gecelik kültürden inokulasyon yapılmıştır. 37° C' de 3 saat inkübasyon sonrası 5000 rpm' de 10 dakika + 4° C' de santirifüj gerçekleştirilmiştir. Üst sıvı atılmış ve pellete 10 ml soğuk steril distile su eklenerek homojenize edilmiş ve ardından 5 dakika da buz içinde inkübe edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Daha sonra üst sıvı uzaklaştırılmış bu defa 10 ml soğuk % 10 gliserol içeren steril distile su eklenerek homojenize edilmiş 5000 rpm' de 10 dakika + 4° C' de santirifüj yapılmış ve üst sıvı atılmıştır. Pellet üzerine % 10 gliserol içeren steril distile sudan 750 mikrolitre eklenerek 100 mikrolitrelik bölümlere ayrılmıştır. Elde edilen kompetan hücreler -80° C' deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.8.8. Rekombinant bakteri kolonilerini belirleyen Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyerinin hazırlanması

Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyeri hazırlamak için; 49 g BHIA (Brain Heart Infusion Agar) 1L distile suda eritilip otoklavlanmış ve 50-60 ° C' ye kadar soğutulmuştur. 1L besiyeri için 5000 µl IPTG (100 mM), 2500 µl % 2' lik Xgal ve 1000 µl 100 mg/ml'lik ampisilin solüsyonları eklenmiştir. Daha sonra steril petri kaplarına 20 ml gelecek şekilde Ampisilin-Xgal-IPTG seçici besiyerinden dökülmüştür. Oluşan hava kabarcıkları alev geçirilerek patlatılmıştır.

3.2.8.9. pUC19 rekombinant vektörünün *Escherichia coli* DH10B bakterisine elektrotransformasyonu ve rekombinant kolonilerin seçimi

Öncelikle daha önceden hazırlanmış olan ve -80°C ' de ki derin dondurucuda saklanan alıcı (kompetent) hücreler çıkarılmış ve buz içine alınmıştır. Daha sonra $10\ \mu\text{l}$ ' lik pUC19 rekombinant vektörü ve $100\ \mu\text{l}$ alıcı (kompetant) hücre pipet yardımıyla karıştırılmış ve 5 dk. buz içerisinde bekletilmiş ve ardından hücre küvetine aktarılmıştır. Elektroporatöre yerleştirilen hücre küvetine *Escherichia coli* programı kullanılarak elektrik şoku verilmiştir. Şoktan hemen sonra 1 ml BHI sıvı besiyeri eklenmiş ve ependorf tüp içerisinde 1 saat 37°C ' de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan hemen sonra Ampisilin-Xgal-IPTG içeren seçici besiyerlerine $200\ \mu\text{l}$ gelecek şekilde yayılmıştır. Plaklar 5-10 dakika kurutulduktan sonra ters çevrilerek 37°C ' ye ayarlanmış inkübatöre ertesi güne kadar üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün transformasyon plaklarında rekombinant (geni almış olan) ve non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmid DNA'lar ile transforme olmuş olan bakteriler üremiştir. Gelişen beyaz kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak klonlanan gen incelenecektir. Bunun için plazmid ekstraksiyonu için beyaz kolonilerden 5-10 koloni seçilmiş, $100\ \mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren 2 ml BHI tüplerine ekilmiş ve 37°C 'de bir gece inkübe edilmiştir. Tüpte gelişen hücrelerden plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmid *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiş, elektroforezi yapılarak plazmid ve insert incelenmiştir.

3.2.8.10. Beyaz kolonilerin (Rekombinant pUC19'a ilişkin) PCR analizleri

FMV ve FMaV-1 viral etmenlerine ait spesifik primerler kullanılarak rekombinant pUC19 bakteri plazmid DNA' sı içerisindeki virüse ait baz dizisi (insert) çoğaltılmaya çalışılmıştır. Böylece insertin FMV ve FMaV-1 viral etmenlerine ait olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bunun için $0.2\ \text{ml}$ ' lik PCR tüplerine, $30\ \mu\text{l}$ PCR karışımı dağıtılmıştır. Daha sonra her tüp içerisine beyaz kolonilerden bir tanesi petri üzerinde yeri numaralandırılarak alınmış, tüpte homojenize edilmiş ve uygun PCR koşullarında amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyondan sonra $\% 2$ ' lik jelde elektroforez yapılmış ve ampikonların büyüklüğü incelenmiştir.

3.2.9. Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

Klonlama sonrası yapılan PCR testleri sonucu FMV ve FMaV-1 için %2'lik jelde net bir bant oluşturan 2'şer adet örnek seçilmiş ve her birine bir kod verilerek dizi belirleme ve analiz çalışmalarında izolat olarak kullanılmıştır. Buna göre FMV için F-1 ve F-2, FMaV-1 için F-3 ve F-4 kodları verilmiştir. DNA dizi belirleme çalışmaları, Macrogen firmasından hizmet alınarak yapılmıştır. Gelen sonuçlar doğrultusunda izolatların çoğaltılan kısımları dünyada saptanmış olan diğer izolatlarla karşılaştırılmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. İzolatların dünyanın diğer izolatları ile benzerlik oranları belirlenmesi amacıyla, NCBI Blast programında yer alan, Kimura modeli ve Neighbour Joining (NJ) algoritması kullanılmıştır.

3.2.10. İncir Mozaik Hastalığı ile Enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin Sürgün Ucu Kültürü ve Termoterapi ile Arındırma Çalışmaları

Sürgün ucu kültürü ve termoterapi çalışmaları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü doku kültürü laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2.10.1. Başlangıç kültürünün hazırlanması

Bu aşamada eksplant olarak İncir mozaik hastalığı ile enfekteli, Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerine ait sürgünler kullanılmıştır. Tüm eksplantlar, Mayıs ayında, vegetasyon başlangıcında sürgünlerin uç kısımlarından alınan 4-5 cm uzunluğundaki yeşil çeliklerden hazırlanmıştır. Yeşil çeliklerden 1-1.5 cm uzunluğunda sürgün uçları çıkartıldıktan sonra, mikro çelikler elde edilmiştir. Yüzey sterilizasyonuna eksplantların akan su altında 30 dakika yıkanmasıyla başlanmıştır. Daha sonra % 70' lik etil alkolde (15 saniye) tutulan eksplantlar steril distile su ile çalkalanarak, Tween 20 ilave edilmiş % 5' lik sodyum hipoklorit (NaOCl, ticari) çözeltisine alınmıştır.

Sodyum hipoklorit uygulaması 10' ar dakikalık sürelerle, iki kez tekrarlanmış ve eksplantlar steril distile su ile çalkalanarak (3 kez) yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Sterilizasyondan sonra aseptik kabine alınan sürgün uçları dip kısmından, materyal 0.5-0.7 cm kalacak şekilde, kesilerek dikime hazırlanmıştır.

Başlangıç kültüründe dikim ortamı olarak, 0.5 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) ve 0.5 mg/L Benzil adenin (BA) içeren Woody Plant Medium (WPM; Lloyd ve McCown, 1981) besin ortamının katı (30 g sukroz ve 7 g agar ilavesi ile katılaştırılmış) formu kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, 5.8' e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar 25 x 150 mm'lik kültür tüplerine, yaklaşık 15 ml olacak şekilde doldurulmuştur. Kültür tüplerine doldurulan besin ortamları daha sonra 12° C' de, 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Kültür tüplerinde besin ortamlarına, her tüpte bir eksplant olacak şekilde dikim yapılmıştır. Dikim sonrası iklim dolabına yerleştirilen eksplantlar, 4 hafta süreyle 26±1' de 4000 lüks ışık şiddetinde 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmışlardır.

3.2.10.2. Sürgün çoğaltımı

Bu aşamada, başlangıç kültüründe tanımlanan sürgün ucu eksplantlarının 4 haftada bir besin ortamında altkültüre alınması ile çoklu sürgünler elde edilmiştir. Hazırlanan ortamlar, 150 ml'lik cam kültür kavanozlarına yaklaşık 30 ml olacak şekilde doldurulmuştur. Tüm kültürler, 26±1' de 4000 lüks ışık şiddetinde 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta bırakılmışlardır.

3.2.10.3. *In vitro* koşullarda elde edilen çoklu sürgünlere termoterapi uygulaması

Sürgün uçlarından elde edilen çoklu sürgünlere, 6 hafta boyunca bitki büyüme dolabında ısı uygulaması yapılmıştır. Termoterapi koşulları, 37° C' de 16 saat aydınlık (5000 lüks) ve 34° C' de 8 saat karanlık periyot şeklinde uygulanmıştır (Gella vd., 1998).

3.2.10.4. Termoterapi uygulanmış çoklu sürgünlerin köklendirilmesi

Termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçları, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı odunsu bitki ortamı, 20 g/L sukroz ve 7 g/L agar ilave edilmiş, yarı doz MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarılmıştır. Bu aşamada eksplant olarak 2-3 boğumlu sürgünler kullanılmıştır. Bu sürgünler, sürgün çoğaltım aşamasında tanımlanan sürgün ucu eksplantlarının altkültürler neticesinde elde edilmiştir. Kültür ortamı olarak 8 cm yükseklikte 300 ml'lik cam kavanozlar kullanılmış, her kavanoza yaklaşık 65 ml besin ortamı konulmuştur.

Besin ortamının pH ayarlaması ve sterilizasyonu daha önceki aşamalarda belirtildiği gibi yapılmıştır. Tüm kültürler, $26\pm 2^{\circ}$ C' de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık (4000 lüks) kültür koşullarında 5 hafta süreyle muhafaza edilmiştir.

3.2.10.5. *In vitro* elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkilerinin dış ortama alıştırmaları

Köklenen bitkicikler, torf: perlit (1:1) içeren strafor köpük bardaklara 23.08.2011 tarihinde aktarılarak, kontrollü koşullara sahip iklim odasında, *in vitro* elde edilen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon) gerçekleştirilmiştir. Aklimatizasyonu sağlanmış *ex vitro* bitkiler, toprak: torf: perlit (2:1:1) karışımı içeren plastik saksılara aktarılmış ve gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.10.6. *In vitro* koşullarda elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkilerinin RT-PCR testleri

In vitro koşullarda yetiştirilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir fidanları, dış ortama alıştırmalarından 2 ve 4 ay sonrasında FMV ve FMaV-1 etmenlerinin varlığı yönünden RT-PCR testi ile testlenmişlerdir. 20.10.2011 ve 21.12.2011 tarihlerinde, FMV ve FMaV-1 spesifik primer çiftleri (Elbeaino vd., 2009; Walia vd., 2009) kullanılarak RT-PCR testleri yapılmıştır. Belirlenen tanı yönteminin çalışıyor olduğunun doğrulanabilmesi için gerekli olan temiz materyal (negatif kontrol) tohumdan yetiştirilen incir bitkilerinden elde edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. İncir Mozaik Hastalığının Aydın İli' nin Bazı İlçelerindeki İncir Bahçelerindeki Yaygınlık Durumu ve Toplanan İncir Örneklerine İlişkin Bulgular

İncir mozaik hastalığının, Aydın İli' nin en fazla incir ağacı ve bahçe sayısının bulunduğu bazı ilçelerindeki yaygınlığını belirlemek amacıyla, 12–16 Ekim 2009, 26 Haziran–2 Temmuz 2010 ve 16–17 Eylül 2010 tarihlerinde, Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde sörveyler gerçekleştirilmiştir.

Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerine bağlı 27 köy ve toplam 321 incir bahçesindeki toplam 10.795 ağaç makroskobik olarak incelenmiş ve İncir mozaik hastalığı belirtisinin bulunmadığı ağaç tespit edilmemiştir. Bu nedenle, İncir mozaik hastalığı sörveyi yapılan bahçelerde İncir mozaik hastalığı % 100 yaygın olarak değerlendirilmiştir. Benzer bir bulguyu, Özalp ve Heper (1972) Ege bölgesinde İzmir, Aydın, Muğla, Manisa ve Denizli illerinde yapmış oldukları çalışmada da almışlardır. İncir ağaçlarının % 1'den fazlasını kapsayan çalışmalarında İncir mozaik hastalığının genel dağılımı ve çeşitlerin dayanıklılık reaksiyonlarını simptomatolojik gözlemlere dayalı olarak belirlemişler ve sonuçta 46.647 ağacın hepsinin virüslü olduğunu saptamışlardır. Ürdün'de de İMH'nin yaygınlık ve şiddetini saptamak için, ülke genelinde incir yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı 13 ilde, 11 incir çeşidini kapsayacak sörveyler gerçekleştirilmiş ve sörvey yapılan bütün illerde İMH'nin bulunduğu bildirilmiştir (Al-Mughrabi ve Anfoka, 2000). İspanya'da 2001 yılında yapılan sörveylerde, sörvey yapılan bütün alanlarda İncir mozaik hastalığı belirtileri görülmüş, değerlendirmeye alınan 102 incir çeşidinin % 92,2'sinin İMH belirtileri sergilediği bildirilmiştir (Serrano vd., 2004).

Yapılan sörveylerde, şiddetli mozaik belirtilerine sahip yaprakların genellikle genç sürgünlerde olduğu ve bu sürgünlerdeki dallarda gelişme geriliğinin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bununla birlikte, hastalık nedeniyle incir meyvelerinde mozaik belirtilerin de meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Sarılop incir çeşidine ait genç sürgünlerdeki şiddetli mozaik belirtisine sahip yapraklar



Şekil 4.2. Bursa Siyahı incir çeşidi meyvelerinde meydana gelen mozaik belirtileri

Sörveylerde toplanan 1085 adet yaprak örneği, 0-6 skalasına göre gruplara ayrıldıktan sonra, her bir grup için %10'u (Çizelge 4.1) temsil eden örnek laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır. Buna göre, 7 örneğin 0, 49 örneğin 1, 153 örneğin 2, 394 örneğin 3, 259 örneğin 4, 110 örneğin 5 ve 113 örneğin de 6 skala değerinde olduğu görülmektedir. Çalışmada, Nazilli ilçesinden 45, Germencik ilçesinden 40, İncirliova ilçesinden 15, Bozdoğan ilçesinden 10 olmak üzere toplam 110 yaprak örneği testlenmiştir.

4.2. Test Bitkilerine Mekanik İnokulasyon Uygulaması

Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan, hıyar (*Cucumis sativus*), hanım düğmesi (*Gomphrena globosa*), Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) ve sirken (*Chenopodium amaranticolor*) test bitkilerinden farklı belirtiler gözlenmiş, tütün (*Nicotiana tabacum* L. cv. "Samsun") bitkisinde ise herhangi bir belirti meydana gelmemiştir.

Çizelge 4.1. Sörvey yapılan ilçelerden 0-6 Skalasına göre toplanan ve çalışmada kullanılan Sarılop ve Bursa Siyahı incir yaprak örnek sayıları

İlçeler	0-6 Skalasına Göre Gruplara Ayrılmış Örnek Sayıları							Çalışmada Testlenen Örnek Sayıları (0-6 skalasına göre ayrılmış her bir grup için %10'u temsil eden örnek sayısı)							
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	
Nazilli	2	17	68	187	120	28	23	1	1	7	19	12	3	2	45
Germencik	0	10	43	132	89	56	68	0	1	4	13	9	6	7	40
İncirliova	1	13	28	43	29	23	8	1	1	3	4	3	2	1	15
Bozdoğan	4	9	14	32	21	3	14	1	1	1	3	2	1	1	10
TOPLAM	7	49	153	394	259	110	113	3	4	15	39	26	12	11	110

Orta şiddetli, şiddetli mozaik ve pas belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarının ve damar bandlaşması belirtisine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen inokulumların, *Cucumis sativus* L. “Beith alpha O.P.” çeşidi hıyar yapraklarına inokulasyonundan 8-10 gün sonra, benek şeklinde klorotik lokal lekeler, 14. günden sonra da yapraklarda şekil bozuklukları gözlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5). *C. sativus* yapraklarında gözlenen bu belirtiler, Özalp ve Heper (1972), Salomon vd. (2002) ve Salomon vd. (2005)’nin İncir mozaik virüsü için kaydetmiş oldukları belirtiler ile benzerlik içindedir. Özalp ve Heper (1972), hıyar test bitkisi üzerinde yapılan inokulasyonlardan, 8-10 gün içinde belirtilerin gözlenmeye başladığını ve meydana gelen semptomların, klorotik lokal lekeler, İncir mozaik virüsüne ait özel mozaik lekeleri ve yaprak şekil bozuklukları olduğunu bildirmişlerdir. Salomon vd. (2002) ise lokal lekelerin hıyar fidelerinin gerçek yapraklarında, inokulasyondan 8-10 gün sonra ise primer yapraklarında şekil bozukluğu ile nekrotik lokal lekelerin meydana geldiği bildirilmiştir (Salomon vd., 2005). Bizim elde ettiğimiz bulgularda hıyar bitkisinin gerçek yapraklarında meydana gelmiş olup İncir mozaik virüsü olabileceği kanısına varılmıştır.



Şekil 4.3. Şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cucumis sativus* L. yapraklarında oluşturduğu, klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları

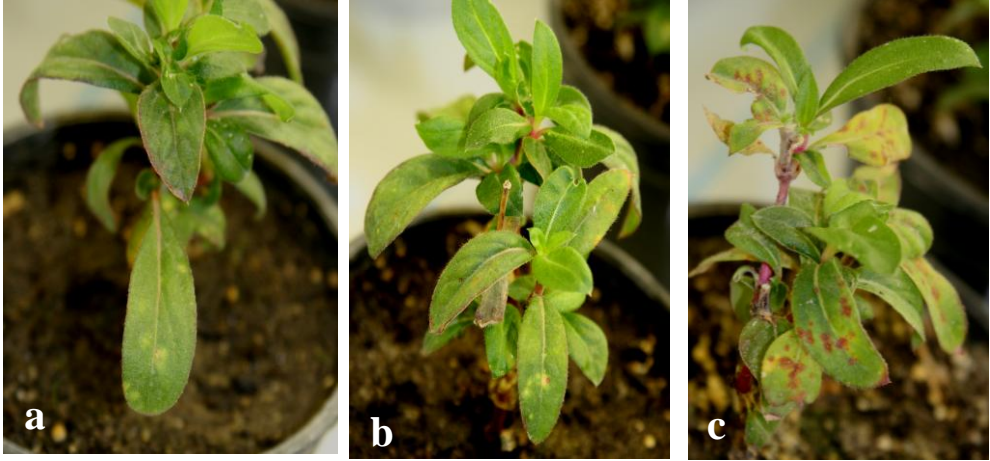


Şekil 4.4. Damar bandlaşması belirtisine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cucumis sativus* L. yapraklarında oluşturduğu klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları



Şekil 4.5. Pas belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cucumis sativus* L. yapraklarında oluşturduğu, klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları

Orta ve şiddetli mozaik belirtileri ile damar bandlaşması belirtileri gösteren Sarılop incir yapraklarından elde edilen inokulumun, *Gomphrena globosa* L.'ye yapılan inokulasyonlar sonucunda, 7-8 gün içinde klorotik lekeler şeklinde başlayan belirtilerin, inokulasyonun 14. gününden sonra bazılarında kırmızı lokal lekelere (Şekil 4.6) bazılarının da ise kırmızımsı kahverengi lokal lekelere (Şekil 4.7) dönüştüğü saptanmıştır. Ayrıca, bazı bitkilerde belirgin nekrotik lekeler meydana gelmiştir (Şekil 4.8). Tüm bu saydığımız belirtileri gösteren *G. globosa* L. bitkilerin İMH neden olan virüs veya virüsler ile enfekteli olduğu düşünülmüştür. Nitekim Salomon vd. (2004), *G. globosa* L.'nin İMH'ye neden olan etmene karşı lokal lekeler ve bu belirtileri takiben klorotik görünüm belirtmişlerdir.

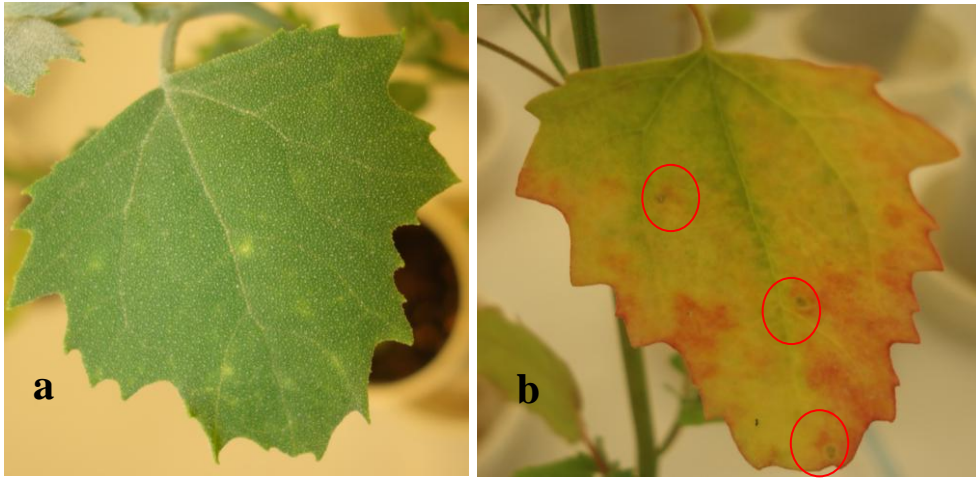


Şekil 4.6. Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun, *Gomphrena globosa* L.'ya inokulasyonundan sonra meydana gelen klorotik lokal (a,b) ve kırmızı lekeler (c)



Şekil 4.7. Damar bandlaşması belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun, *Gomphrena globosa* L.'ya inokulasyonundan sonra meydana gelen; a) kırmızımsı kahverengi lokal lekeler b) nekrotik lekeler c) sağlıklı bitki

Damar bandlaşması belirtilerine sahip Sarılop incir yaprakları ile pas belirtisine sahip Bursa Siyahı incir köklerinden elde edilen inokulumun, *Chenopodium amaranticolor* L. yapraklarında inokulasyondan 8-10 gün sonra benek şeklinde klorotik lokal lekeler gözlenmiş (Şekil 4.8a), daha sonra bu lekelerin nekrotikleştiği saptanmıştır (Şekil 4.8b). Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından elde edilen inokulumun da bazı *C. amaranticolor* yapraklarında inokulasyondan 21 gün sonra mozaik belirtilerin meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu belirtiler Serrano vd. (2004)'nin İncir mozaik virüsü için kaydetmiş oldukları belirtiler ile benzerdir.



Şekil 4.8. Damar bandlaşması belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Chenopodium amaranticolor* L. yapraklarına mekanik inokulasyonundan sonra meydana gelen klorotik lokal (a) ve nekrotik lekeler (b)



Şekil 4.9. Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Chenopodium amaranticolor* L. yapraklarına mekanik inokulasyonundan sonra meydana gelen mozaik belirtileri

Pas belirtisine sahip Bursa Siyahı incir köklerinden elde edilen inokulumun, *Cataranthus roseus* L. yapraklarında inokulasyondan 8-10 gün sonra klorotik lokal lekeler (Şekil 4.10), orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen inokulumların ise yapraklara inokulasyonlarından yaklaşık üç hafta sonra mozaik belirtileri ile yaprak şekil bozukluğu (Şekil 4.11) meydana getirdiği gözlenmiştir. *Cataranthus roseus* L. test bitkisi ilk kez test bitkisi olarak bu çalışmada kullanıldığı için herhangi bir literatür ile tartışılmamıştır.



Şekil 4.10. Pas belirtilerine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Cataranthus roseus* L. yapraklarına, inokulasyonundan 8-10 gün sonra meydana gelen klorotik lekeler



Şekil 4.11. Orta ve şiddetli mozaik belirtilerine sahip Sarılop incir yapraklarından hazırlanan inokulumun *Catarranthus roseus* L. yapraklarına inokulasyonundan 3 hafta sonra yapraklarda meydana gelen mozaik ve şekil bozukluğu belirtileri

Küçük yapraklar üzerinde şiddetli mozaik belirtilerine sahip Bursa Siyahı incir yapraklarının inokulum olarak kullanıldığı mekanik inokulasyon testinde ise *Nicotiana tabacum* L.cv.“Samsun” bitkilerinde herhangi bir belirti meydana gelmemiştir. İncir mozaik hastalığına neden olan etmen veya etmenlere ait literatürde yer alan mekanik inokulasyon test sonuçları ve bizim elde ettiğimiz bulgular ile Çizelge 4.2’de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2. İncir mozaik hastalığı etmeni veya etmenlerine ait mekanik inokulasyon testlerine ait bulgular

İncir çeşidi	Test bitkisi	Belirti süresi	Belirti şekli	Literatür
Sarılop	<i>Cucumis sativus</i> (Hıyar)	30 gün	M, D	Özalp ve Heper, 1972
-	<i>Cucumis sativus</i> (Hıyar)	8-10 gün	LL	Salomon vd., 2002 Salomon vd., 2005
Albatera Antonio Antonio Antonio Albatera Albatera	<i>Chenopodium album</i> , <i>C. amaranticolor</i> , <i>Cucumis sativus</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Gomphrena globosa</i> <i>N. tabacum</i> “Samsun”	-	LL C, LL - LL, N LL, K M	Serrano vd., 2004
N17, F3-Cezayir, Keten köyneği Sarılop Gökalp Bardakçı	<i>C. amaranticolor</i> , <i>C. quinoa</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>N. cavicola</i> , <i>N. occidentalis</i> , <i>Gomphrena globosa</i> <i>Cucumis sativus</i>	-	-	Elbeaino vd., 2006 Elbeaino vd., 2007 Cağlar vd., 2010
Sarılop/ Bursa Siyahı Sarılop Sarılop/ Bursa Siyahı Bursa Siyahı	<i>Cucumis sativus</i> “Beith alpha” <i>Gomphrena globosa</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>N. tabacum</i> L.cv.“Samsun”	8-10 gün 14 gün 21 gün 10-12gün	LL, D KKL, LL, K M, D / LL, M LL	Doktora çalışması

M: Mozaik
N: ekroz

D: şekil bozukluğu
K: Kloroz

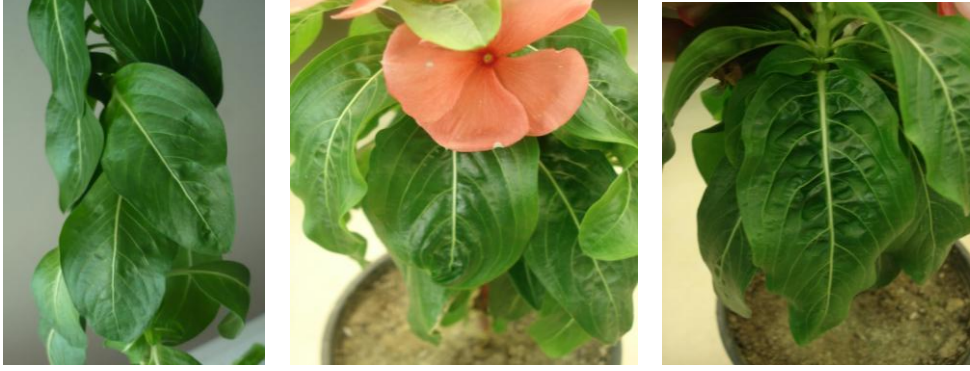
LL: Lokal lezyon C:Cücelik
KKL: Kırmızı kahverengi leke

4.3. İncir Mozaik Hastalık Etmeninin *Aceria ficus* Cotte. ile Test Bitkilerine Taşınmasına İlişkin Bulgular

Üzerinde *Aceria ficus* ergini bulunan Sarılop incir yapraklarının, *Catharanthus roseus* (Cezayir menekşesi) yapraklarına yerleştirildikten yaklaşık 3 hafta sonra, yapraklarda şekil bozukluğu ve kloroz meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca *A. ficus* ile bulaşık Bursa Siyahı incir yapraklarının *C. roseus* yapraklarına yerleştirildikten yaklaşık 4 hafta sonra yaprak şekil bozukluğu ve klorozun yanı sıra dikkat çekici biçimde yaprak ayasında çukurlaşma meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca akar ile taşımadan yaklaşık dört hafta sonra *C. roseus* yapraklarında mozaik belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.14). Credi (1998), hastalık etmenini, *Aceria ficus* ile *C. roseus* bitkisine taşınmasından yaklaşık 40 gün sonra yapraklarda klorotik lekelerin, mozaiklerin ve çiçeklerde sarımsı lekelerin meydana geldiğini bildirmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, bizim elde ettiğimiz bulguların Credi (1998)'nin elde ettiği bulgular ile uyumlu olduğu görülmektedir.



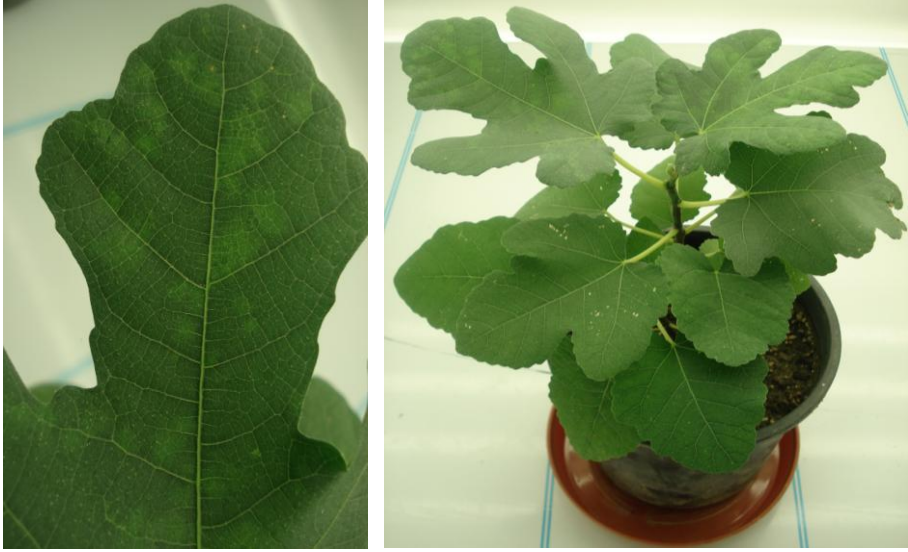
Şekil 4.12. Mozaik belirtileri gösteren Sarılop incir yapraklarında bulunan *Aceria ficus* erginlerinin, *Catharanthus roseus* L. yapraklarında meydana getirdiği şekil bozukluğu ve kloroz



Şekil 4.13. Mozaik belirtileri gösteren Bursa Siyahı incir yapraklarında bulunan *Aceria ficus* erginlerinin *Chataranthus roseus* L. yaprak ayasında meydana getirdiği çukurlaşma belirtisi



Şekil 4.14. Mozaik belirtileri gösteren Sarılop incir yapraklarında bulunan *Aceria ficus* erginlerinin *Chataranthus roseus* L. yapraklarında meydana getirdiği mozaik belirtileri



Şekil 4.15. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçaları ile taşıma çalışmaları sonrası Bursa Siyahı incir bitkilerinde meydana gelen mozaik belirtileri



Şekil 4.16. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçalarının sağlıklı Sarılop incir bitkilerine aktarıldıktan sonra meydana gelen mozaik belirtileri

Üzerinde 6-8 adet *A. ficus* ergini bulunan ve mozaik simtomları gösteren Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarına ait parçalar, tohumdan yetiştirilmiş, sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri üzerine, yerleştirildikten yaklaşık 3 hafta sonra belirtiler gözlenmeye başlamıştır. Öncelikle Sarılop ve Bursa Siyahı incir yaprakları üzerinde mozaik belirtileri (Şekil 4.15, Şekil 4.16) daha sonrada mozaik lekelerin etrafında kahverengi sınırların meydana geldiği pas belirtisi meydana gelmiştir (Şekil 4.17). İMH' ye neden olan etmenin taşınmasında *A. ficus*' un rol oynadığı ve bitkilerdeki akar sayısının artmasıyla hastalık belirtisi gösteren bitki sayısının arttığı ve vektörün 10 günden daha kısa sürede İMH'yi taşıdığı Flock ve Wallace (1955) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca, Proeseler (1972), tek bir akarın dahi hastalık etmenini taşıdığını bildirmiştir. Elde ettiğimiz bulgular bir kez daha göstermiştir ki İncir mozaik hastalığı *A. ficus* ile taşınmaktadır. Ancak, *A. ficus* ergini bulunan ve mozaik simtomları gösteren Sarılop ve Bursa Siyahı incir yaprakları, hıyar bitkilerinde hiçbir belirti meydana getirmemiştir.



Şekil 4.17. *Aceria ficus* ile bulaşık yaprak parçalarının sağlıklı Bursa Siyahı incir bitkilerine aktarıldıktan sonra meydana gelen pas belirtileri

4.4. İncir Mozaik Hastalığına İlişkin dsRNA İzolasyonuna ait Bulgular

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerin dsRNA izolasyon çalışmalarında, iki farklı yöntem (Elbeaino vd., 2009; Ding vd., 2007; Foissac vd., 2000) uygulanmış ve Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinden temin edilen örnekler için en iyi izolasyon Elbeaino vd. (2009)' nin fenol/kloroform kullanarak uyguladıkları CF-11 selüloz kolon yöntemi ve -80°C ' de dondurulmuş örneklerden ve 2 yıllık incir fidanlarına ait taze yaprak ve köklerden elde edilmiştir.

dsRNA izolasyonlarından, 20 tanesi Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu'na ait fidanlıktan alınan Sarılop (10) ve Bursa Siyahı (10) fidanlarına ait olup, 110 örnek ise Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerini temsil etmektedir. Bunların yanı sıra 2 tane, akarla bulaşık Sarılop incir yaprakları ile taşıma yapılmış, Sarılop incir bitkilerine ait yapraklardan, 2 tane akarla bulaşık Bursa Siyahı incir yaprakları ile taşıma yapılmış Bursa Siyahı incir bitkilerine ait yapraklardan, 1 tane, akarla bulaşık Sarılop incir yaprakları ile taşıma yapılmış *Chataranthus roseus* L. bitkisine ait yapraklardan ve 1 tane de akarla bulaşık Bursa Siyahı incir yaprakları ile taşıma yapılmış *C. roseus* bitkisine ait yapraklardan dsRNA izolasyonu yapılmıştır. Toplam 136 örnek dsRNA izolasyonuna tabi tutulmuş ve bu örneklerden 107 tanesinde farklı sayılarda dsRNA bandlarına ait profiller elde edilmiştir. dsRNA izolasyonuna tabi tutulan 136 örneğin, çeşit ismi, belirti şekli, inokulum kaynağı, dsRNA profiline ait band sayıları ve örneğin alındığı ilçe Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. dsRNA izolasyonuna tabi tutulan örneklerle ait çeşit ismi, belirti şekli, inokulum kaynağı ve dsRNA profiline ait band sayıları

Örnek No	Çeşit İsmi	Belirti Şekli	İnokulum Kaynağı	dsRNA Profiline ait Band Sayısı
1	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
2	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
3	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
4	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
5	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
6	Bur. Siy.	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
7	Bur. Siy.	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
8	Bur. Siy.	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
9	Bur. Siy.	Pas	Ağaç-Yaprak	-
10	Bur. Siy.	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
11	Sarılop	Orta Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
12	Sarılop	Orta Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
13	Sarılop	Orta Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
14	Sarılop	Orta Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
15	Sarılop	Orta Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
16	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
17	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
18	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
19	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
20	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
21	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
22	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
23	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
24	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
25	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
26	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
27	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
28	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
29	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
30	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
31	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
32	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
33	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
34	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
35	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
36	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	-
37	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
38	Sarılop	Küç.yap.üze.Şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)

Çizelge 4.3. dsRNA izolasyonuna tabi tutulan örnelele ait çeşit ismi, belirti şekli, inokulum kaynağı ve dsRNA profiline ait band sayıları (devam)

Örnek No	Çeşit İsmi	Belirti Şekli	Inokulum Kaynağı	dsRNA Profiline ait Band Sayısı
73	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
74	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
75	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
76	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	-
77	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
78	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
79	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
80	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
81	Sarılop	Damar bantlaşması	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
82	Sarılop	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
83	Sarılop	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
84	Sarılop	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
85	Sarılop	Pas	Ağaç-Yaprak	+ (4 band)
86	Bur. Siy.	Orta şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
87	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
88	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
89	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
90	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
91	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
92	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
93	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
94	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
95	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
96	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
97	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
98	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
99	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
100	Sarılop	Küç.yap.üze.şid.moz.*	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
101	Bur. Siy.	Orta şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
102	Bur. Siy.	Küç.yap.üze.şid.moz.	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
103	Sarılop	Orta şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
104	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
105	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	-
106	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (1 band)
107	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
108	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)
109	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (3 band)
110	Sarılop	Şiddetli mozaik	Ağaç-Yaprak	+ (2 band)

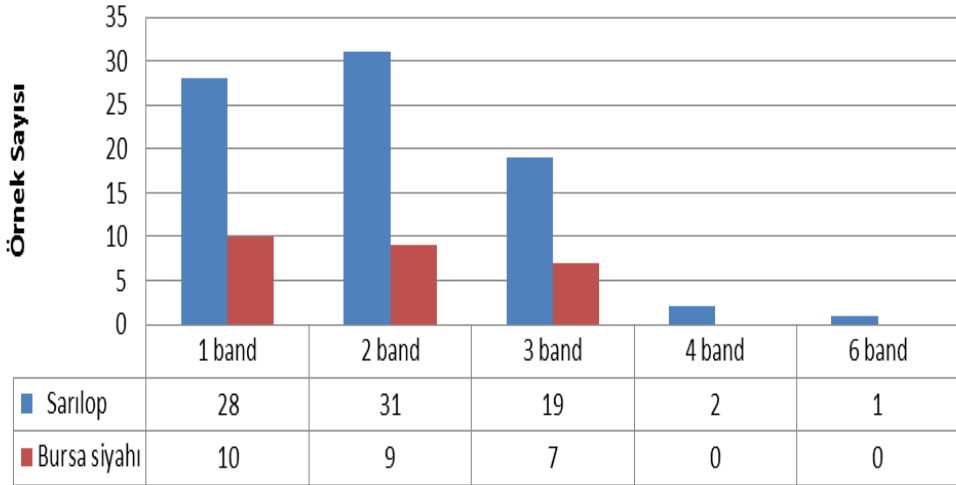
Çizelge 4.3. dsRNA izolasyonuna tabi tutulan örnelelere ait çeşit ismi, belirti şekli, inokulum kaynağı ve dsRNA profiline ait band sayıları (devam)

Örnek No	Çeşit İsmi	Belirti Şekli	İnokulum Kaynağı	dsRNA Profiline ait Band Sayısı
111	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (2 band)
112	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	-
113	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (3 band)
114	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	-
115	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (1 band)
116	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (2 band)
117	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (3 band)
118	Bur. Siy.	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (3 band)
119	Bur. Siy.	Küç.yap.üze.şid.moz.	Fidan-Yaprak	+ (1 band)
120	Bur. Siy.	Küç.yap.üze.şid.moz.	Fidan-Yaprak	+ (1 band)
121	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (3 band)
122	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (4 band)
123	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (3 band)
124	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (1 band)
125	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (2 band)
126	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Kök	+ (2 band)
127	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (2 band)
128	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (1 band)
129	Sarılop	Şiddetli mozaik	Fidan-Yaprak	+ (2 band)
130	Sarılop	Küç.yap.üze.şid.moz.	Fidan-Kök	+ (3 band)
131	Sarılop	Şiddetli mozaik	<i>A. ficus</i> aktarılmış yaprak (Sarılop)	+ (1 band)
132	Sarılop	Pas	<i>A.ficus</i> aktarılmış yaprak (Sarılop)	+ (1 band)
133	Bursa Siyahı	Şiddetli mozaik	<i>A. ficus</i> aktarılmış yaprak (Bur. Siy.)	+ (1 band)
134	Bursa Siyahı	Pas	<i>A. ficus</i> aktarılmış yaprak (Bur. Siy.)	+ (2 band)
135	<i>Catharanthus roseus</i>	Yaprak şekil bozukluğu	<i>Aceria ficus</i> aktarılmış yaprak (Sarılop)	+ (1 band)
136	<i>Catharanthus roseus</i>	Kloroz	<i>A.ficus</i> aktarılmış yaprak (Bursa Siyahı)	-

*Küç.yap.üze.şid.moz.: Küçük yaprak üzerinde şiddetli mozaik

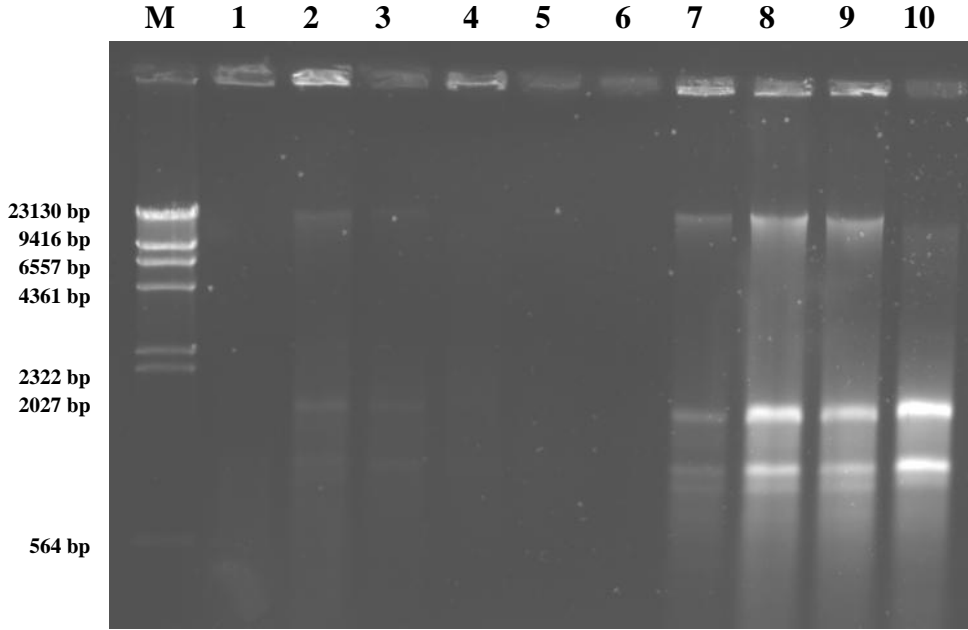
dsRNA izolasyonu sonucunda pozitif sonuç alınan 107 örneğin çeşitlere göre dağılımı, 81 adet Sarılop, 26 adet Bursa Siyahı şeklindedir. Bu bulgu sörvey

yapılan alanlarda İMH etmeninin Sarılop incir çeşidinde daha sıklıkla bulunduğu göstergesidir. Nitekim Sarılop İMH etmenine daha hassas olduğu Özar vd. (1986) tarafından ifade edilmiştir. Sarılop ve Bursa siyahı incir örneklerinin dsRNA band profil sayıları Şekil 4.18’ de verilmiştir.

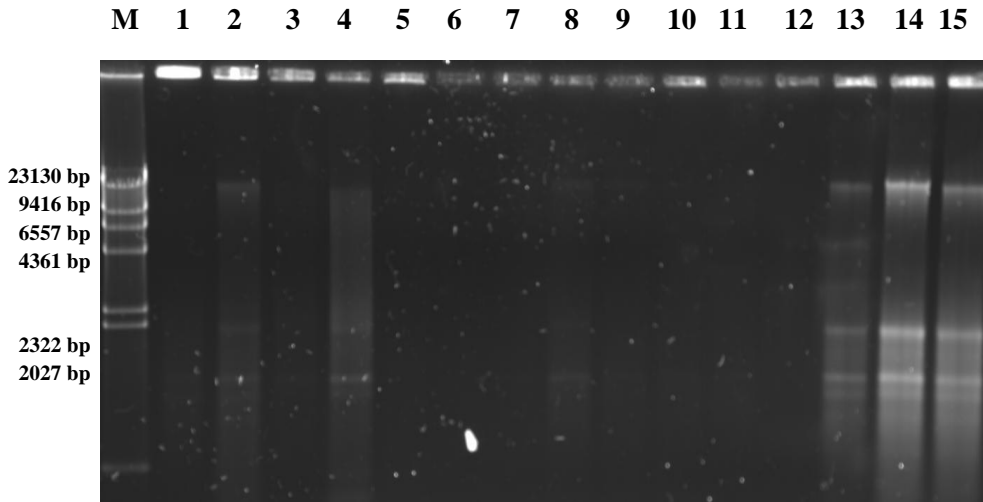


Şekil 4.18. Sarılop ve Bursa Siyahı incir örneklerinin dsRNA izolasyonu sonucunda elde edilen band profil sayıları

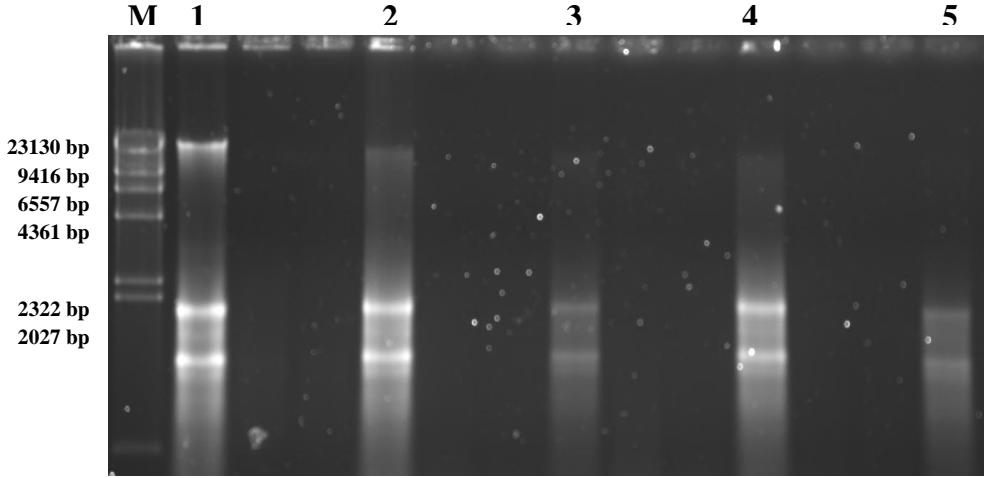
Elde edilen dsRNA profillerinin 1 ile 6 band arasında değiştiği ve büyüklüklerinin 23.130 bp ile 564 bp arasında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara ilişkin farklı dsRNA bandlarının yer aldığı profiller Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22’ de verilmiştir.



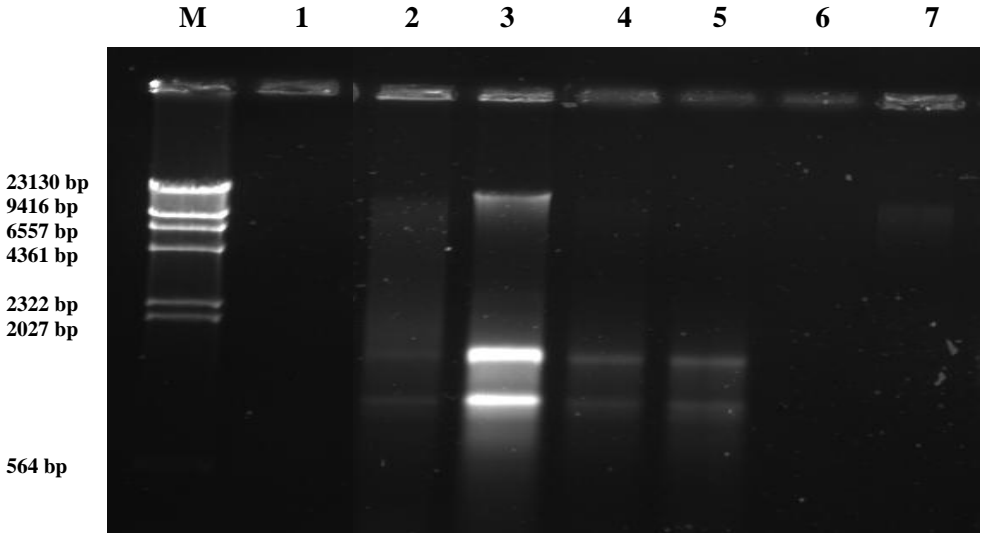
Şekil 4. 19. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2; 3 banda sahip dsRNA profili, 7,8,9 ve 10; 4 banda sahip dsRNA profili



Şekil 4.20. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2; 3 banda sahip dsRNA profili, 3 ve 8; 1 banda sahip dsRNA profili, 4; 2 banda sahip dsRNA profili, 13; 6 banda sahip dsRNA profili, 14 ve 15; 4 banda sahip dsRNA profili



Şekil 4.21. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; 3 banda sahip dsRNA profili, 2, 3, 4 ve 5; 2 banda sahip dsRNA profili



Şekil 4.22. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından izole edilen dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1; Negatif kontrol, 2,4 ve 5; 2 banda sahip dsRNA profili, 3; 3 banda sahip dsRNA profili, 7; 1 banda sahip dsRNA profili

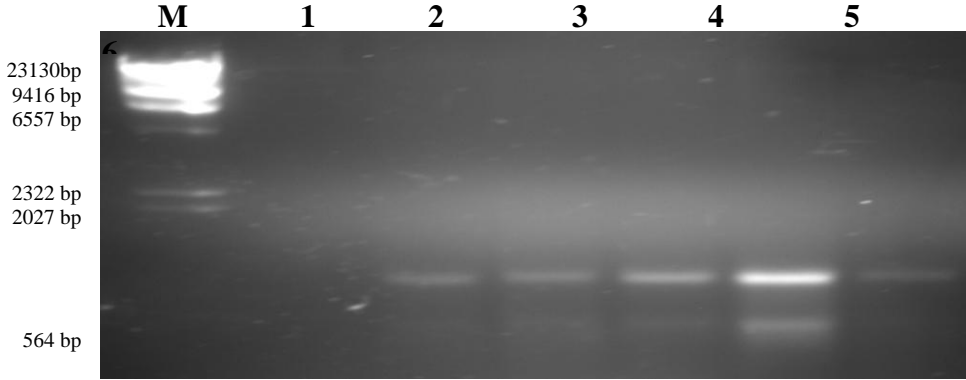
Açıkgöz ve Döken (2001), İncir mozaik hastalığı etmenini tanılamak için yaptıkları dsRNA analizlerinde etmene ait 6.6 kbp üzerinde bir bant, 2.0 ile 0.6 kbp arasında da iki bandın yer aldığını belirtirken, Salomon vd. (2005)'da etmenin 3 banda sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Falk ve Salem (2006) ise İncir mozaik hastalığına neden olan etmen veya etmenlerin tanılanmasına yönelik yapılan dsRNA izolasyon çalışmalarında 1 ile 3 arasında değişen band profilleri elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Elbeaino vd. (2009), İncir mozaik hastalığına neden olan etmenin, tek sarmallı ve negatif polariteli, 4 RNA'ya sahip İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV) olduğunu bildirmişler ve ayrıca hastalıkla enfekteli incir fidanlarının köklerinden yapmış oldukları dsRNA izolasyonlarında etmenin 7-0.6 kbp arasında değişen büyüklüklerde birçok bandın olduğunu, bunlardan 4 büyük bandın FMV ait olduğunu diğer bantların ise FMV'nin alt genomlarına veya latent durumda mevcut olan diğer viral etmen veya etmenlere ait olabileceğini bildirmişlerdir. Çağlayan vd. (2010) ise deneysel enfekteli bitkilerden yaptıkları dsRNA analiz sonucunda 1.30 kbp ve 1.96 kbp büyüklüğünde iki band elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerin tanılanmasına yönelik yaptığımız dsRNA izolasyon testlerinden aldığımız bulgulara göre bu hastalığa neden olan birden fazla viral etmenin olduğu kanısındır. Çünkü farklı sayılarda band içeren dsRNA profilleri elde edilmiştir. Bunlar içinde 19 kbp ile 2027 bp ve 564 bp arasında yer alan bandların FMV'ye ait olduğu düşünülmektedir. Yukarıda bahsedilen büyüklükler dışındaki dsRNA bandlarının başka viral etmenlere ait olduğu tahmin edilmektedir. Çünkü İMH' de karışım enfeksiyonları söz konusudur.

dsRNA izolasyonunda, incir yapraklarındaki sütsü yapı ve fenolik bileşiklerin CF-11 selüloz kolonda oluşturduğu problemler, fenol:kloroform izolasyon yöntemine silika partiküllerinin ilave edilmesi ile giderilmiştir. Ayrıca inokulum olarak kullanılan kök ve yapraklar da çok farklı sonuçlar elde edilmemiştir. Ancak, incir köklerinden dsRNA izolasyonu, fenolik bileşiklerin ve sütsü yapının olmaması nedeniyle daha kolay yapılmıştır.

dsRNA izolasyonu ayrıca *A. ficus* taşınmış, Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri ile *C. roseus* bitkilerine ait yapraklardan yapılmış, 1 ve 2 banda sahip dsRNA profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *Aceria ficus* aktarılmış bitkilere ait dsRNA profilleri. M; Markör (λ DNA-HindIII), 1) *Aceria ficus* taşınmış ve kloroz belirtisi göstermiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 2) *Aceria ficus* taşınmış ve yaprak şekil bozukluğu belirtisi göstermiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 3) *Aceria ficus* taşınmış ve pas belirtisi göstermiş Sarılop incir çöğürü, 4) *Aceria ficus* taşınmış ve şiddetli mozaik belirtisi göstermiş Sarılop incir bitkisi, 5) *Aceria ficus* taşınmış ve pas belirtisi göstermiş Bursa Siyahı incir bitkisi, 6) *Aceria ficus* taşınmış ve şiddetli mozaik belirtisi göstermiş Bursa Siyahı incir bitkisi

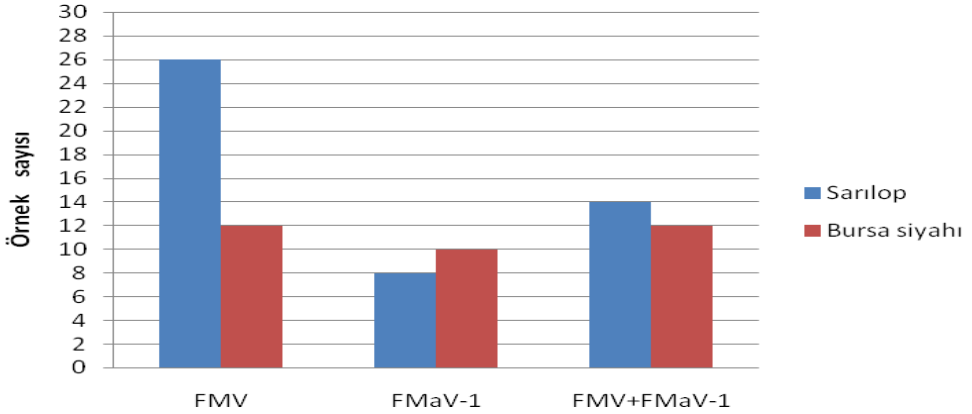
A. ficus ile taşınmış, şiddetli mozaik ve pas belirtisi oluşmuş Sarılop incir bitkisi yaprakları ile yine aynı şekilde akar ile taşınmış ve şiddetli mozaik belirtisi meydana gelmiş Bursa Siyahı incir bitkisinden ve akar ile taşınmış, yaprak şekil bozukluğu belirtisi göstermiş *C. roseus* yapraklarından yapılan dsRNA izolasyonu sonucunda, 2027 ile 564 bp arasında bir dsRNA bandı belirlenmiştir. *A. ficus* ile aktarılmış ve pas belirtisi oluşmuş Bursa Siyahı incir bitkilerinde ise 2027 ile 564 bp arasında 2 dsRNA bandı elde edilmiştir. Şekil 4.23’ de verilen tüm bu profiller, Elbeaino vd. (2009)’ nın izole ettiği FMV’ ye ait dsRNA profiline benzerlik göstermektedir. Bu dsRNA profilleri *A. ficus*’ un FMV’ yi Sarılop, Bursa Siyahı ve *C. roseus* bitkilerine taşıdığına bir göstergesidir. Ancak akar ile taşınmış ve kloroz belirtisi göstermiş *C. roseus* yapraklarından yapılan dsRNA izolasyonu sonucunda ise herhangi bir dsRNA profiline saptanmamıştır.

4.5. İncir Mozaik Hastalık Etmenlerine İlişkin RT-PCR Bulguları

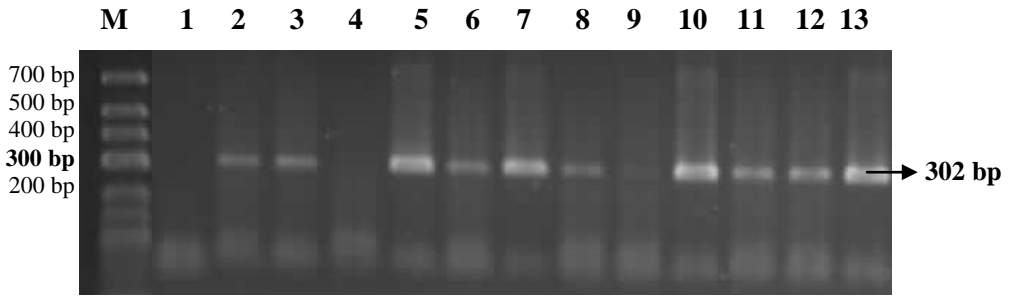
İncir mozaik hastalığı belirtileri bulunan Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarından izole edilmiş toplam RNA ve dsRNA'lar ile *A. ficus* ile etmenin taşınması sağlanmış incir bitkileri ve *C. roseus* bitkilerine ait yapraklardan izole edilmiş toplam RNA'lar, RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, İncir yaprak benek ilişkili virüs 1 (Fig leaf mottle-associated virus-1, FLMaV-1) (Elbeanio vd., 2006), İncir yaprak benek ilişkili virüs-2 (Fig leaf mottle-associated virus-2, FLMaV-2) (Elbeanio vd., 2007), İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV) (Elbeanio vd., 2009) ve İncir mozaik ilişkili virüs 1 (Fig mottle associated virus-1, FMaV-1) etmenlerine ait primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR çalışmaları, dsRNA izolasyon çalışmalarında olduğu gibi toplam 136 örnek ile gerçekleştirilmiş ve bu örneklerden 82 tanesinde pozitif sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar, PCR'de kullanılan 4 primer çiftinden sadece FMV ve FMaV-1 primerlerine aittir. FLMaV-1 ve FLMaV-2 primerleri ile herhangi bir pozitif sonuç alınmamıştır.

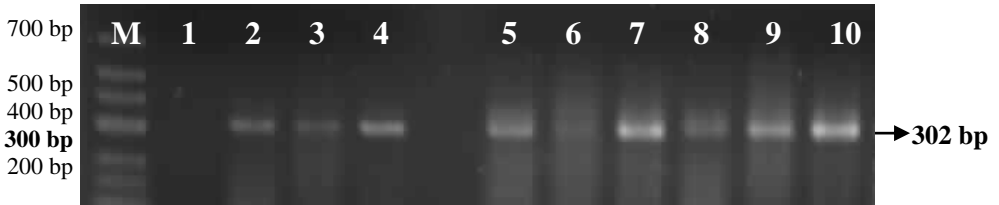
Sonuç alınan bu 82 örnekten 38 tanesinde yalnızca FMV, 18 tanesinde yalnızca FMaV-1 ve 26 tanesinde hem FMV hem de FMaV-1 etmenleri karışık enfeksiyonları saptanmıştır. 26 Sarılop ve 12 Bursa Siyahı incir örneği sadece FMV, 8 Sarılop ve 10 Bursa Siyahı incir örneği sadece FMaV-1, 14 Sarılop ve 12 Bursa Siyahı incir yaprak örneği hem FMV hemde FMaV-1 etmenleriyle enfekteli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.24). Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31' de FMV ve FMaV-1 primerlerine pozitif sonuç vermiş örneklere ait DNA profilleri görülmektedir.



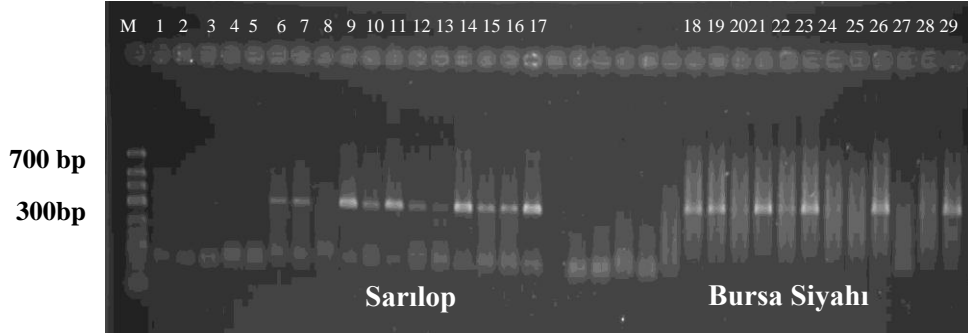
Şekil 4.24. RT-PCR analizi sonucunda İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik ilişkili virüs-1 viral etmenleri ile enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı incirlerine ait örnek sayıları



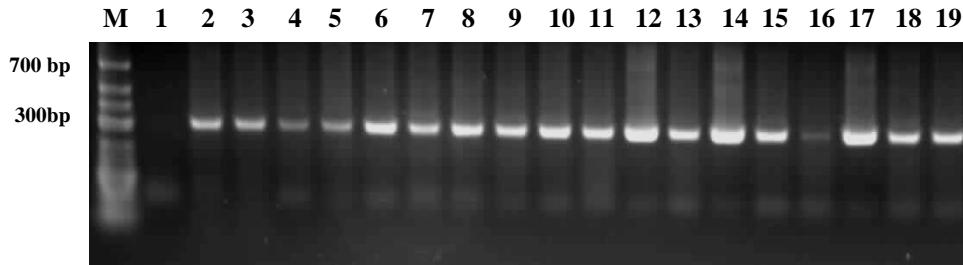
Şekil 4.25. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen total RNA'ların, İncir mozaik virüsü primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri



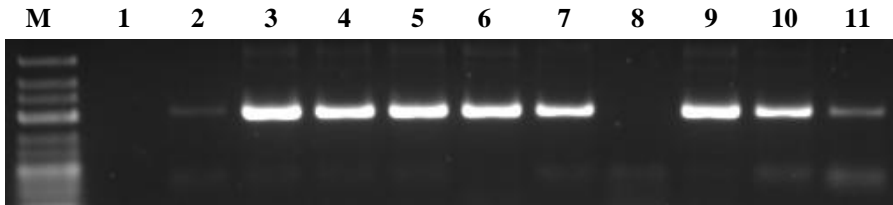
Şekil 4.26. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen toplam RNA'ların, İncir mozaik virüsü primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri



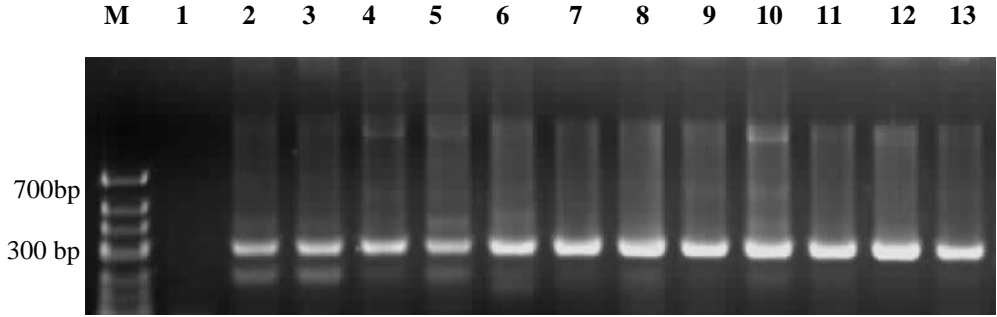
Şekil 4.27. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop ve Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen total RNA'ların, İncir mozaik ilişkili virüs-1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17; Sarılop incir örneklerine ait DNA profilleri, 18, 19, 21, 22, 23, 26, 29; Bursa Siyahı incir örneklerine ait pozitif sonuç alınmış DNA profilleri



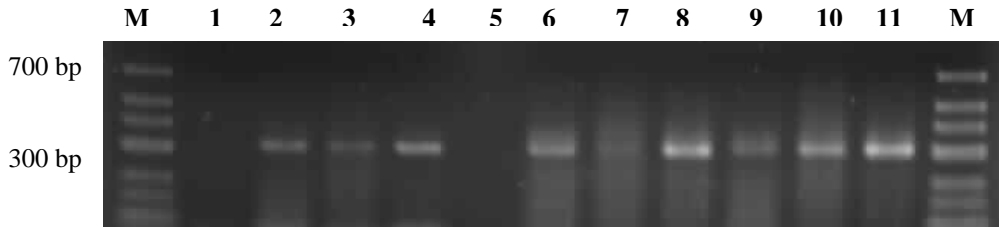
Şekil 4.28. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik virüsü primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2-19; İncir mozaik virüsü



Şekil 4.29. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik virüsü primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11; pozitif sonuç alınmış örneklerle ait DNA profilleri

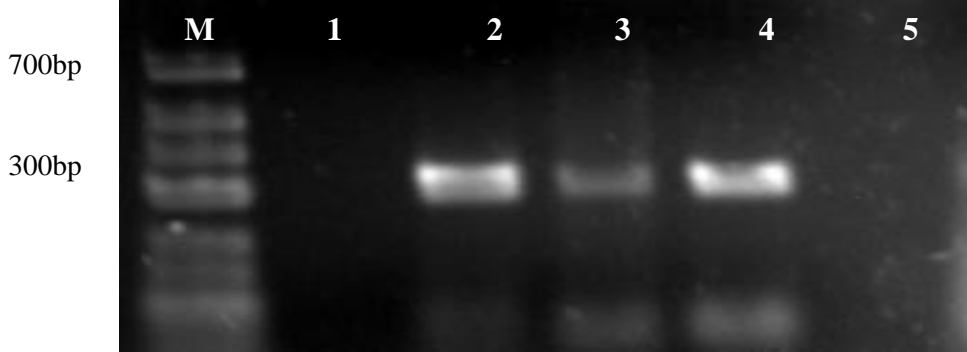


Şekil 4.30. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir yapraklarından elde edilen dsRNA'lar ve İncir mozaik ilişkili virüs-1 primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2-13; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri



Şekil 4.31. İncir mozaik hastalığı ile enfekteli Sarılop incir yapraklarından elde edilen dsRNA'ların, İncir mozaik ilişkili virüs-1 primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR testi sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11; pozitif sonuç alınmış örneklere ait DNA profilleri

A. ficus ile İncir mozaik hastalık etmeninin taşınması sağlanmış incir bitkileri ve *C. roseus* bitkilerine ait yapraklardan izole edilmiş toplam RNA'lar, RT-PCR çalışmalarında kullanılmış ve FMV primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR testinde pozitif sonuçlar alınmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. *Aceria ficus* ile İncir mozaik hastalık etmeni taşınmış bitkilerin RT-PCR test sonucunda elde edilen DNA profilleri, M; Markör, 1; Negatif kontrol, 2; Sarılop inciri bitkisi, 3; Bursa Siyahı incir bitkisi, 4; Yaprak şekil bozukluğu belirtisi meydana gelmiş *Catharanthus roseus* bitkisi, 5; Kloroz belirtisi meydana gelmiş *Catharanthus roseus* bitkisi

Yapılan RT-PCR testleri sonucunda, Elbeaino vd. (2009)'nın belirttiği gibi FMV için 302 bp'de, FMaV-1 için de 298 bp'de DNA bantları elde edilmiştir. Çağlayan vd. (2010)'da İMH'nin moleküler tanılanmasına yönelik Bursa Siyahı ve deneysel enfekteli incir yapraklarından yaptıkları RT-PCR testlerinde FMaV-NP (FMaV-1) bölgesi için spesifik 298 bp büyüklüğünde ampliconlar belirlemişlerdir.

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerin tanılanmasına yönelik yaptığımız RT-PCR testlerinde İncir yaprak benek virüsü ile ilişkili virüs-1 (Fig leaf mottle-associated virüs-1, FLMaV-1) primerleri ile pozitif sonuç alınmamıştır. Ancak Çağlayan vd. (2009), Sarılop, Sarızeybek ve Yediveren incir çeşitleri ile yapmış oldukları RT-PCR testlerinde sadece bir örnekte FLMaV-1 için pozitif sonuç almışlardır. Ayrıca 21 örneğin FMaV-1 olarak yeniden isimlendirilen EMARAV-NP, beş örneğin de FMaV-2 olarak yeniden isimlendirilen EMARAV-GP için pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çağlar vd. (2009), Adana, Hatay, Urfa ve Mersin illerini kapsayan bölgede Keten Köyneği, Sarılop, Göklop ve Bardakçı incir çeşitlerinde oluşan 132 örnekte RT-PCR testleri sonucunda 6 örneğin FLMaV-2, 10 örneğin de FMV ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

A. ficus taşınmış, şiddetli mozaik ve pas belirtisi oluşmuş Sarılop incir bitkisi yapraklarından ve şiddetli mozaik belirtisi meydana gelmiş Bursa Siyahı bitkisi yapraklarından yapılan RT-PCR test sonucunda FMV primerleri ile yapılan RT-PCR testinde 302 bp’de 1 band elde edilmiştir. Buda bize İncir mozaik hastalığı ile enfekleti incir yapraklarından alınan akarın, tohumdan yetiştirilen incir bitkilerine İncir mozaik hastalığı taşıdığını göstermektedir. Benzer şekilde akar ile taşınmış ve yaprak şekil bozukluğu belirtisi göstermiş *C. roseus* yapraklarından yapılan RT-PCR testinde pozitif sonuç alınmıştır. Ancak akar taşınmış ve kloroz belirtisi göstermiş *C. roseus* yapraklarından yapılan RT-PCR testinde sonuç alınmamıştır. Bunlara ek olarak FMaV-1 primerleri ile yapılan RT-PCR testlerinde ise *A. ficus* ile taşınmış ve belirti göstermiş hiçbir bitkide pozitif sonuç elde edilmemiştir.

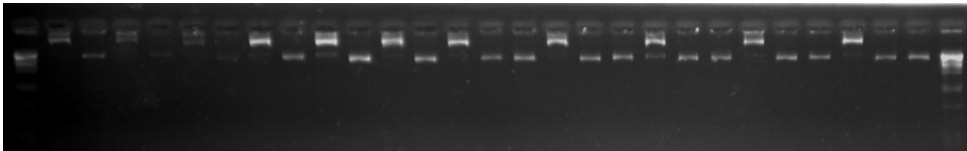
4.6. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik Virüsü ile İlişkili Virüs-1’in Klonlanması

Klonlama çalışmaları, RT-PCR da mozayik belirtisi gösteren örneklerde pozitif sonuç veren İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV) ve İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1 (Fig mosaic associated virus-1, FMaV-1) için uygulanmıştır.

4.6.1. pUC 19 Vektörü İçeren *Escherichia coli* DH10B Bakterisinden İzole Edilen Plazmidin *EcoRI* ve *XbaI* Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine ait Bulgular

İzolasyonu yapılan pUC19 plazmid DNA’sı *EcoRI* ve *XbaI* endonükleaz enzimleri ile yapışkan uç oluşturacak şekilde kesilmiş ve düz zincir (doğrusal) haline getirilmiştir. Kesimin başarısı % 1 w/v’lik agaroz jelde incelenmiştir (Şekil 4.33).

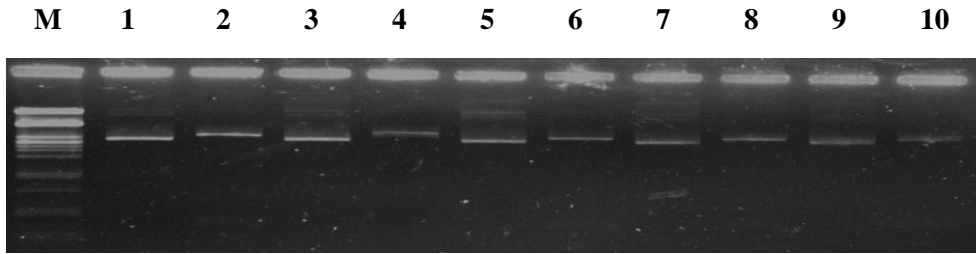
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 M



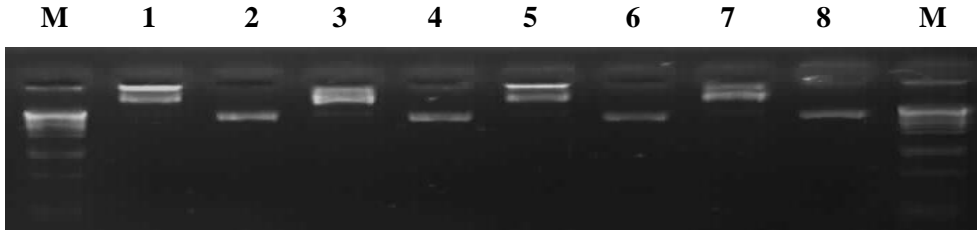
Şekil 4.33. *Escherichia coli* DH10B bakterisinden izole edilen plazmidin *EcoRI* ve *XbaI* endonükleazlar ile kesimi, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 23, 26 numaralı bandlar kesim öncesi, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27 numaralı bandlar kesim sonrası

4.6.2. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik Virüsü ile İlişkili Virüs-1 Amplikon DNA'ların *EcoRI* ve *XbaI* Endonükleaz Enzimleri ile Kesimine ait Bulgular

RT-PCR testleri sonucunda elde edilen İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1 amplikon DNA'ları *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi yapılmış ve % 1 w/v'lik agaroz jelde incelenmiştir (Şekil 4.34, Şekil 35).



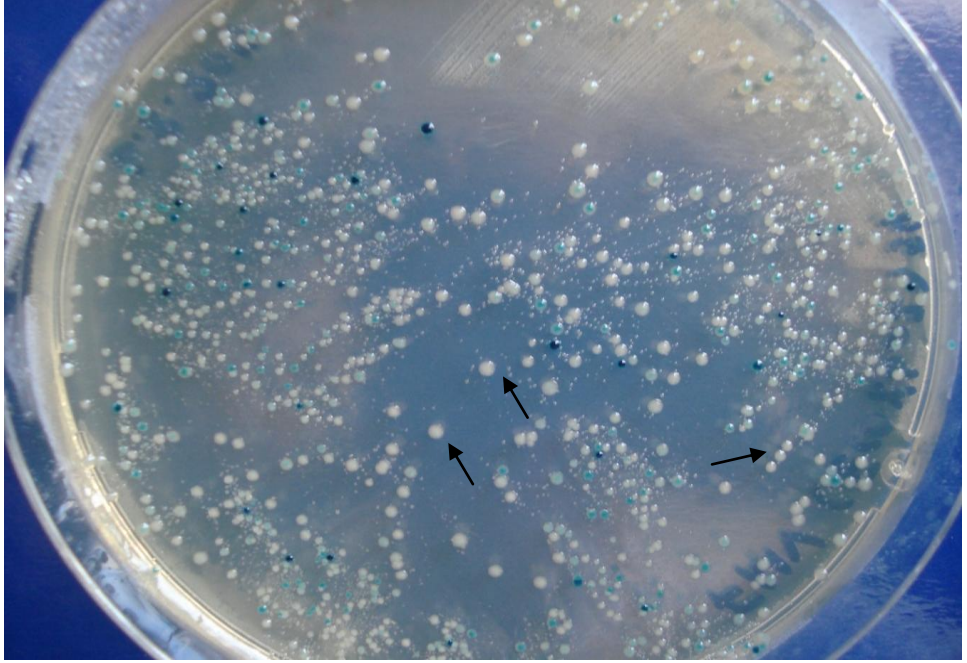
Şekil 4.34. *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi yapılmış İncir mozaik virüsüne ait amplikon DNA, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 1, 3, 5, 7, 9; kesim öncesi, 2, 4, 6, 8, 10; kesim sonrası DNA profili



Şekil 4.35. *XbaI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi yapılmış İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1'e ait amplikon DNA, M; Markör (Lambda DNA/*Pst* I), 1, 3, 5, 7; kesim öncesi, 2, 4, 6, 8; kesim sonrası DNA profili

4.6.3. Rekombinant pUC19 Vektörünü Taşıyan *Escherichia coli* Kolonilerinin Tespiti

İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1'ait amplikon DNA'lara ait geni içeren pUC19 vektörünün *Escherichia coli*'ye transferi sonucunda Ampisilin-Xgal-IPTG içeren plaklarda rekombinant (beyaz) ve rekombinant olmayan (mavi) kolonilerin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.36).

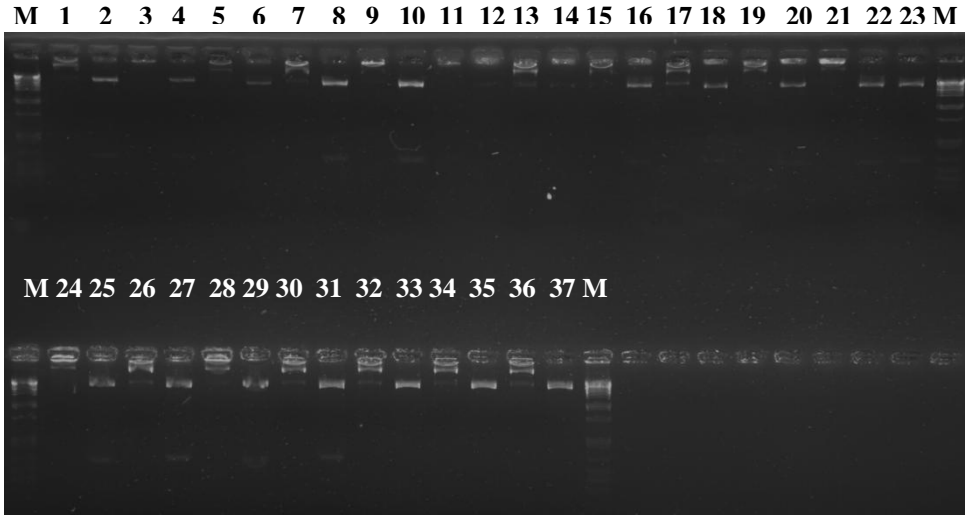


Şekil 4.36. Ampisilin-Xgal-IPTG' li besi yerinde rekombinant *Escherichia coli* bakteri kolonilerinin seçimi

Burada rekombinant olmayan bakteriler, pUC19 plazmid DNA'sının üzerinde bulunan *LacZ* geninden dolayı ortamdaki X-gal'i parçalayarak mavi renkte koloni oluşturmuşlardır. Rekombinant bakteriler ise, içerisine İncir mozaik virüsü veya İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1'ait amplikon DNA'lara ait geninin girmesinden dolayı *LacZ* geni inaktif hale geçmiş ve ortamdaki X-gal'i parçalayamayarak beyaz renkli koloni oluşturmuşlardır.

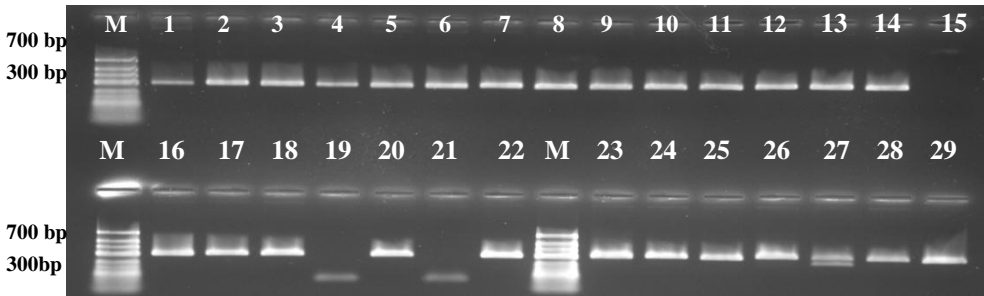
4.6.4. *Escherichia coli* Bakteri Kolonilerinden Rekombinant Plazmidin İzolasyonu, İnsört ve PCR Analizi

Transformasyon plağında gelişen beyaz renkli rekombinant kolonilerden plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen rekombinant (amplikon DNA+pUC19 plazmid DNA) plazmid *EcoRI* ve *XbaI* enzimleriyle kesilmesi sonucunda agaroz jelde beklenildiği gibi bantlar oluşmuştur (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiş rekombinant plazmidde ait band profilleri. M, Markör (Lambda DNA/*Pst* I), İncir mozaik virüsü; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 numaralı bandlar kesim öncesi, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23 numaralı bandlar kesim sonrası. İncir mozaik ilişkili virüs-1; 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 numaralı bandlar kesim öncesi, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 numaralı bandlar kesim sonrası.

FMV ve FMaV-1 viral etmenlerine ait spesifik primerler kullanılarak rekombinant pUC19 bakteri plazmid DNA'sı içerisindeki virüse ait baz dizisi çoğaltılmıştır. Böylece insörtün FMV ve FMaV-1 viral etmenlerine ait olup olmadığı uygun PCR koşullarında kontrol edilmiştir. Amplifikasyondan sonra % 2'lik agaroz jelde FMV için 302 bp, FMaV-1 için 298 bp' de bandlar oluşmuştur (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Klonlama sonrası İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik ilişkili virüs-1 örneklerine ait band profilleri. M; 700bp, İncir mozaik virüsü; 1-14 arası ile 16,17,18,20,22 numaralar klonlanmış örnekler, 15 numaralı örnek negatif kontrol, 19,21 numaralar klonlanamamış örnekler, İncir mozaik ilişkili virüs-1; 23-29 arası klonlanmış örnekler

4.7. İncir Mozaik Virüsü ve İncir Mozaik İlişkili Virüs-1'e ait Dizi Belirleme ve Filogenetik Sınıflandırma Çalışmaları

PCR çalışmalarında elde edilen PCR ürünlerine ait nükleotid dizileri, Macrogen (www.macrogen.com) firması tarafından ticari olarak belirlenmiş ve bu çalışmada kullanılan virüs izolatlarına ait sekans bilgileri Dünyada kayıtlı diğer izolatlarla nükleotid düzeyinde karşılaştırılarak filogenetik analizleri yapılmıştır. FMV-1 izolatı için FN666274.1, FMV-2 izolatı için CAQ03479.7, FMV-3 ve FMV-4 izolatları için de FJ211073.1 erişim numaraları ile gelen sonuçlar NCBI Blast programında yer alan, Kimura modeli, filogenetik analizlerde denenmiş ve Neighbour Joining (NJ) algoritması ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. FMaV-1 için gönderilen izolatlar (FMV-3 ve FMV-4) için aynı gen bölgesini klonlandığından aynı erişim numarası gönderilmiştir.

FMV-1 izolatının 294 bp büyüklüğünde RNA-Polimeraz geni, Japonya izolatları AB697832.1, AB697833.1, AB697834.1 ve AB697836.1 ile % 94, Kanada izolatı HQ703343.1 ile %93, İran izolatı HQ732254 ile %89, İtalya izolatı AM941711.6 ile % 88, Türk izolatı FN 666273 ile % 86 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.39). FMV' ye ait filogenetik soy ağacında FMV-1 izolatı en çok benzerlik göstermiş olduğu Japon ve Kanada izolatları ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.40).

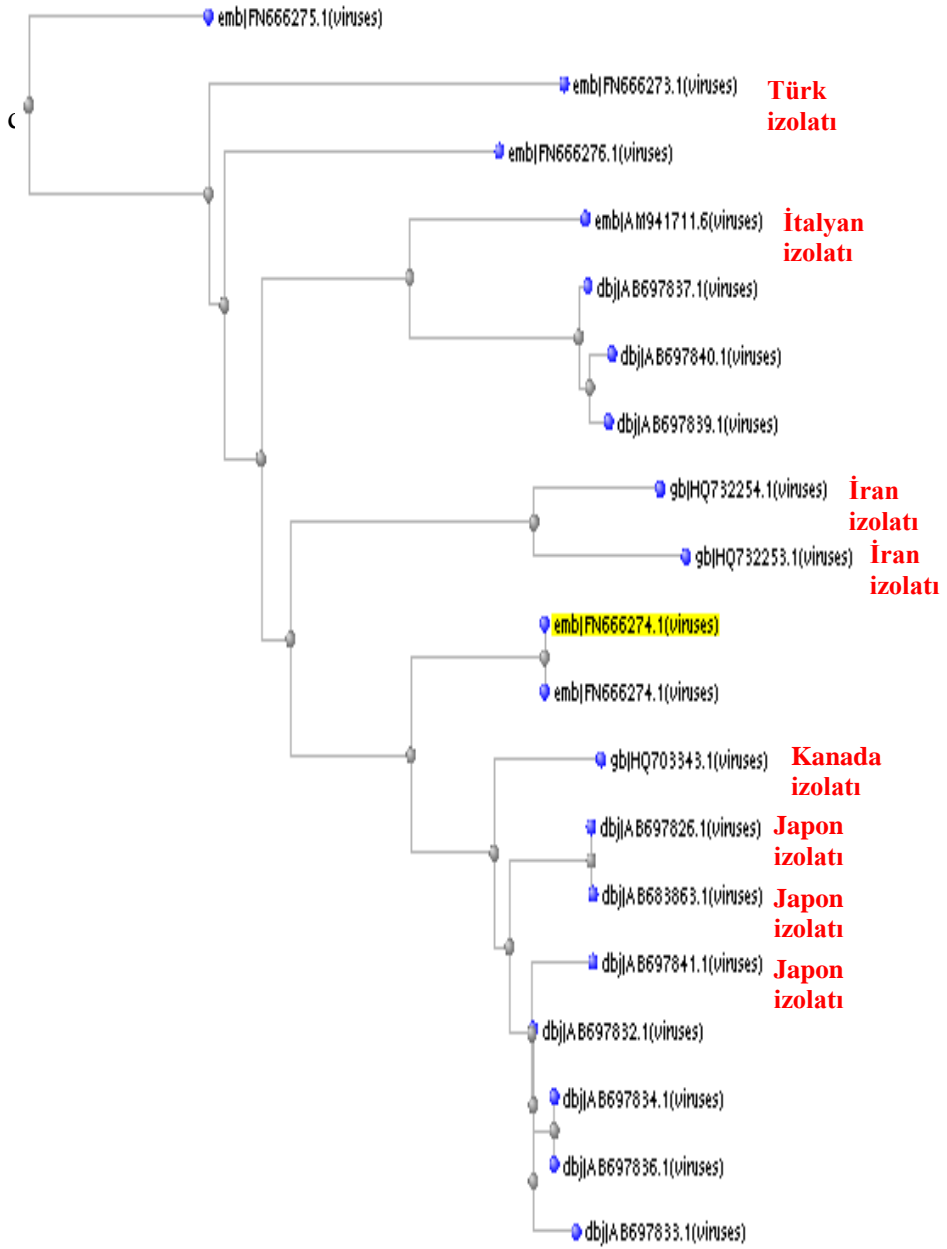
FMV-2 izolatının 2297 bp büyüklüğünde RNA-Polimeraz geni, Japonya izolatları BAM13796.1 ve BAM13786.1 sırası ile % 98 ve % 97, Amerika izolatı ACW84413.1 ile % 98, Kanada izolatı AE198676.1 ile % 96, İtalya izolatı CBJ34322.1 ile % 94 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.41). FMV' ye ait filogenetik soyağacında FMV-2 izolatı en çok benzerlik göstermiş olduğu Japon, Amerika ve Kanada izolatları ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.42).

FMV-3 ve FMV-4 izolatları, 808 bp büyüklüğünde FMaV nükleokapsid protein geni, Japonya izolatları AB697846, AB697843 ile sırasıyla % 99 ve % 96, Kanada izolatı HQ703345.1 ile % 98, Türk izolatı GU227421.1 ile % 96 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.43). FmaV-1' ye ait filogenetik soyağacında FMV-3 ve FMV-4 izolatları en çok benzerlik göstermiş olduğu Japon ve Kanada izolatları ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.44).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN666274.1	Fig mosaic virus partial mRNA for RNA dependent RNA polym	544	544	100%	2e-151	100%
AB697832.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	387	387	85%	3e-104	94%
AB697834.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	381	381	85%	2e-102	94%
AB697833.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	372	372	83%	1e-99	94%
AB697836.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	377	377	85%	2e-101	94%
AB697841.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	370	370	85%	3e-99	93%
HQ703343.1	Fig mosaic virus isolate CAND1 segment RNA1 RNA-depende	427	427	99%	2e-116	93%
AB683863.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	359	359	85%	7e-96	92%
AB697826.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	416	416	99%	4e-113	92%
HQ732254.1	Fig mosaic virus isolate E5a RNA-dependent RNA polymerası	313	313	86%	6e-82	89%
FN666276.1	Fig mosaic virus partial mRNA for RNA dependent RNA polym	363	363	100%	6e-97	89%
HQ732253.1	Fig mosaic virus isolate E5a-1 RNA-dependent RNA polymer	298	298	85%	2e-77	88%
AM941711.6	Fig mosaic virus mRNA for RNA-dependent RNA polymerase	340	340	100%	3e-90	88%
FN666273.1	Fig mosaic virus partial mRNA for RNA dependent RNA polym	327	327	100%	2e-86	87%
FN666275.1	Fig mosaic virus partial mRNA for RNA dependent RNA polym	318	318	100%	1e-83	86%
AB697840.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	265	265	85%	2e-67	86%
AB697839.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	265	265	85%	2e-67	86%
AB697837.1	Fig mosaic virus RdRp gene for RNA-dependent RNA polymer	265	265	85%	2e-67	86%

Şekil 4.39. FN666274.1 erişim numaralı FMV-1 kodlu izolatının Dünya’ da kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması

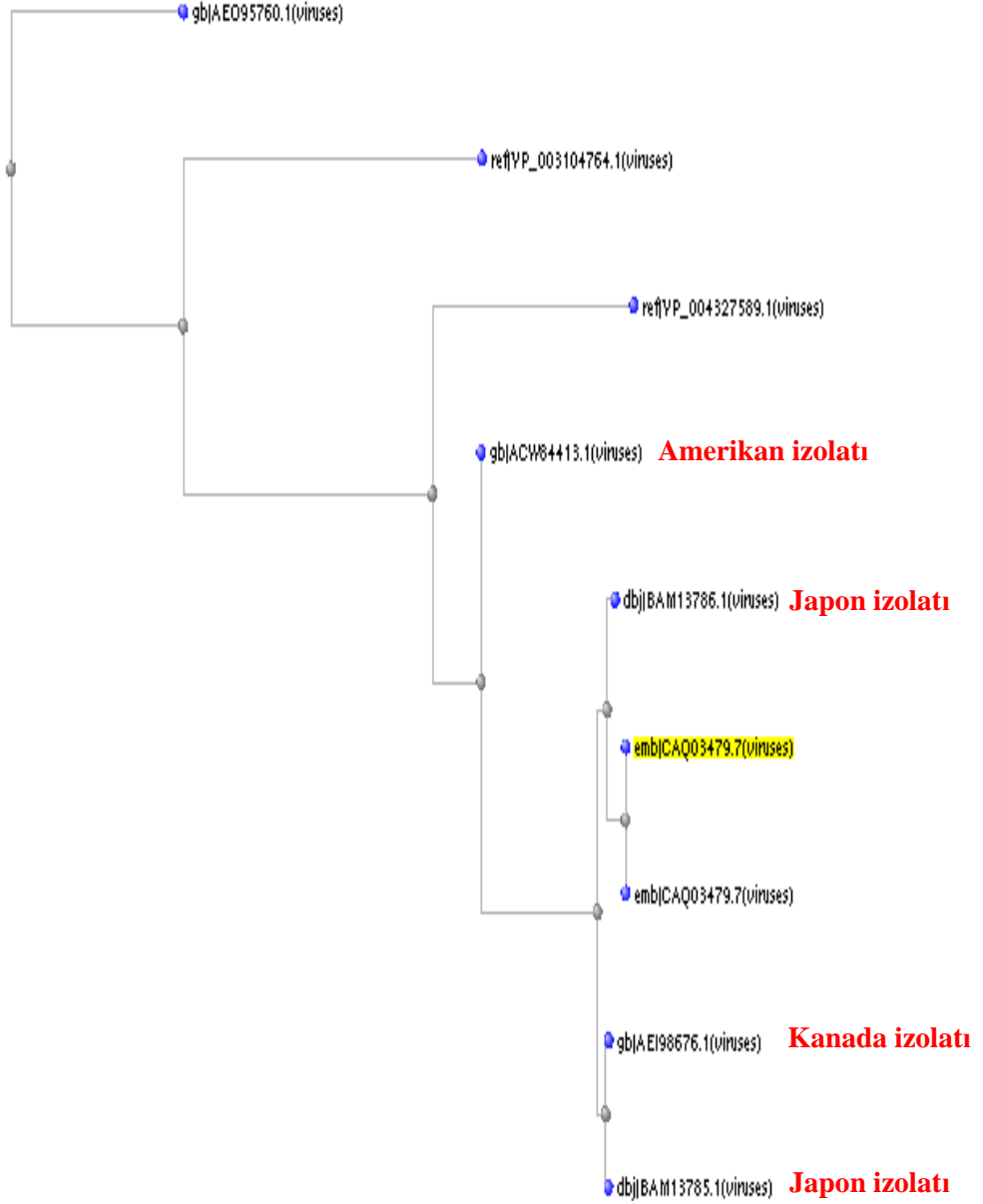


Şekil 4.40. FN666274.1 erişim numaralı FMV-1 kodlu izolatının, 'İncir mozaik virüsü' ne ait filogenetik soy ağaçtaki yeri

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CAQ03479.7	RNA-dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	4688	4688	100%	0.0	100%
BAM13796.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus] >dbj BAM:	170	170	3%	2e-45	98%
ACW84413.1	polymerase [Fig mosaic virus]	707	707	15%	0.0	98%
BAM13786.1	RNA-dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	4536	4536	100%	0.0	97%
BAM13784.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus] >dbj BAM:	169	169	3%	4e-45	97%
BAM13799.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	168	168	3%	9e-45	97%
BAM13789.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus] >dbj BAM:	168	168	3%	9e-45	97%
BAM13785.1	RNA-dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	4506	4506	100%	0.0	96%
AEI98676.1	RNA-dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	4499	4499	100%	0.0	96%
AFJ06419.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	152	152	3%	2e-39	96%
BAM13793.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	167	167	3%	2e-44	95%
BAM13800.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	167	167	3%	2e-44	95%
BAM13792.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	167	167	3%	2e-44	95%
BAM13794.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus] >dbj BAM:	166	166	3%	8e-44	94%
CBJ34322.1	RNA dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	157	157	3%	7e-41	94%
AFJ06418.1	RNA-dependent RNA polymerase, partial [Fig mosaic virus]	149	149	3%	3e-38	94%
CBJ34326.1	RNA dependent RNA polymerase [Fig mosaic virus]	183	183	4%	8e-50	92%

Şekil 4.41. CAQ03479.7 erişim numaralı FMV-2 kodlu izolatının Dünya’ da kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması

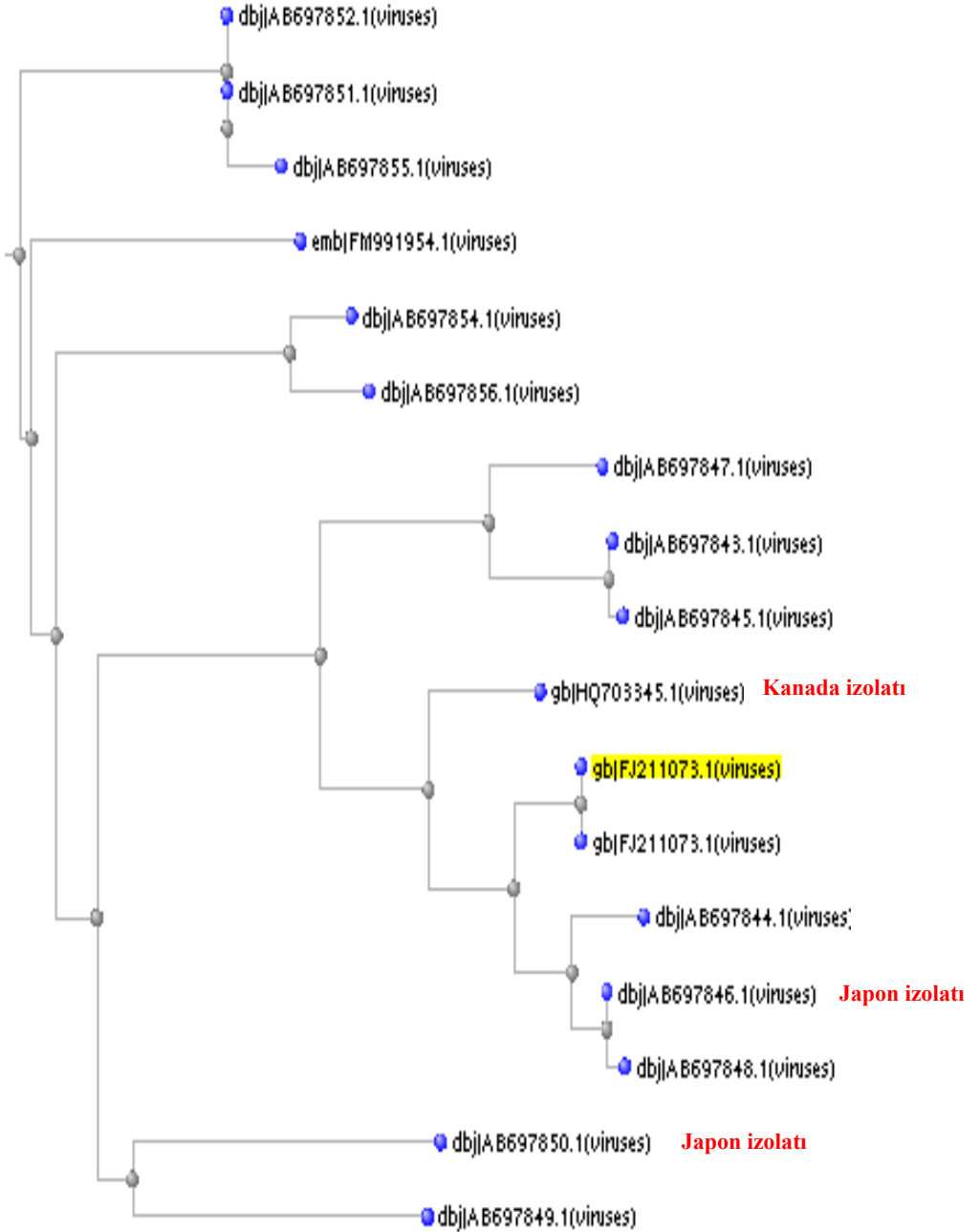


Şekil 4.42. CAQ03479.7 erişim numaralı FMV-2 kodlu izolatının, İncir mozaik virüsü'ne ait filogenetik soy ağaçtaki yeri

sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ211073.1	Fig mosaic associated virus JJW-2008 nucleocapsid protein-	1493	1493	100%	0.0	100%
AB697846.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1426	1426	99%	0.0	99%
AB697848.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1424	1424	99%	0.0	99%
AB697844.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1419	1419	99%	0.0	99%
HQ703345.1	Fig mosaic virus isolate CAN01 segment RNA3 putative nucl	1397	1397	99%	0.0	98%
GU227421.1	Fig mosaic virus isolate EI-BS-15 nucleocapsid protein gene	414	414	30%	5e-112	97%
GU227420.1	Fig mosaic virus isolate EI-D1-9 nucleocapsid protein gene,	414	414	30%	5e-112	97%
AB697843.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1308	1308	99%	0.0	96%
AB697847.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1306	1306	99%	0.0	96%
AB697845.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1303	1303	99%	0.0	96%
AB697852.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1258	1258	99%	0.0	95%
AB697851.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1258	1258	99%	0.0	95%
HQ377217.1	Fig mosaic virus isolate F1 nucleocapsid protein gene, parti	388	388	31%	3e-104	94%
AB697855.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1242	1242	99%	0.0	94%
AB697850.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1230	1230	99%	0.0	94%
FM991954.1	Fig mosaic virus mRNA for putative nucleocapsid protein (N	1236	1236	99%	0.0	94%
AB697854.1	Fig mosaic virus NP gene for nucleocapsid protein, complete	1219	1219	99%	0.0	94%

Şekil 4.43. FJ211073.1 erişim numaralı FMV-3/FMV-4 kodlu izolatların Dünya’da kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılması



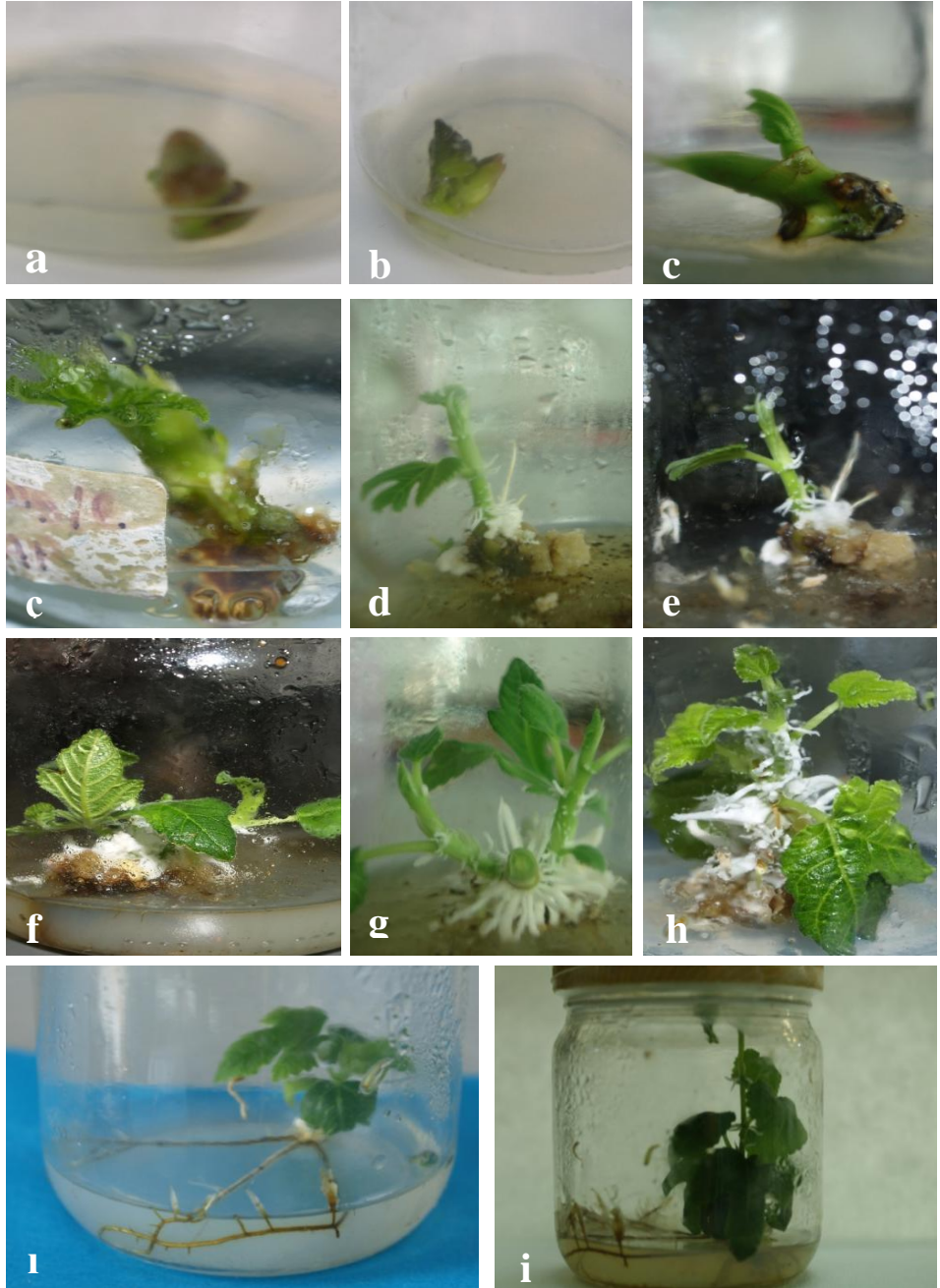
Şekil 4.44. FJ211073.1 erişim numaralı FMV-3/FMV-4 kodlu izolatlarının, İncir mozaik ilişkili virüs-1' e ait filogenetik soy ağaçtaki yeri

4.8. Sürgün Ucu Kültürü ve Termoterapi İle Sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Fidanı Elde Edilmesi

4.8.1. Başlangıç Kültürü, Çoklu Sürgün ve Küçük Bitkilerin Elde Edilmesi

İncir mozaik hastalığı ile enfekteli, 10 adet Sarılop, 10 adet de Bursa Siyahı incirler sürgünlerine ait 4-5 cm uzunluğundaki yeşil çeliklerden, 1-1.5 cm uzunluğunda mikro çelikler elde edilmiştir. Daha sonra sterilizasyonu gerçekleştirilmiş mikro çelikler, 0.5-0.7 cm kalacak şekilde kesilmiş ve içinde besin ortamı bulunan kültür tüplerine yerleştirilmiştir. Böylece başlangıç kültürü hazırlanmıştır (Şekil 4.44). Benzer şekilde, Pontikis ve Melas (1986), *Ficus carica* L.'ye ait sürgünlerden 0.5–1.0 mm uzunluğundaki meristemleri, IBA, NAA, BA ve GA ile zenginleştirilmiş Murashige Skoog (1962) (MS) ortamında kültüre almışlar ve sürgün gelişimleri gerçekleştirmişlerdir.

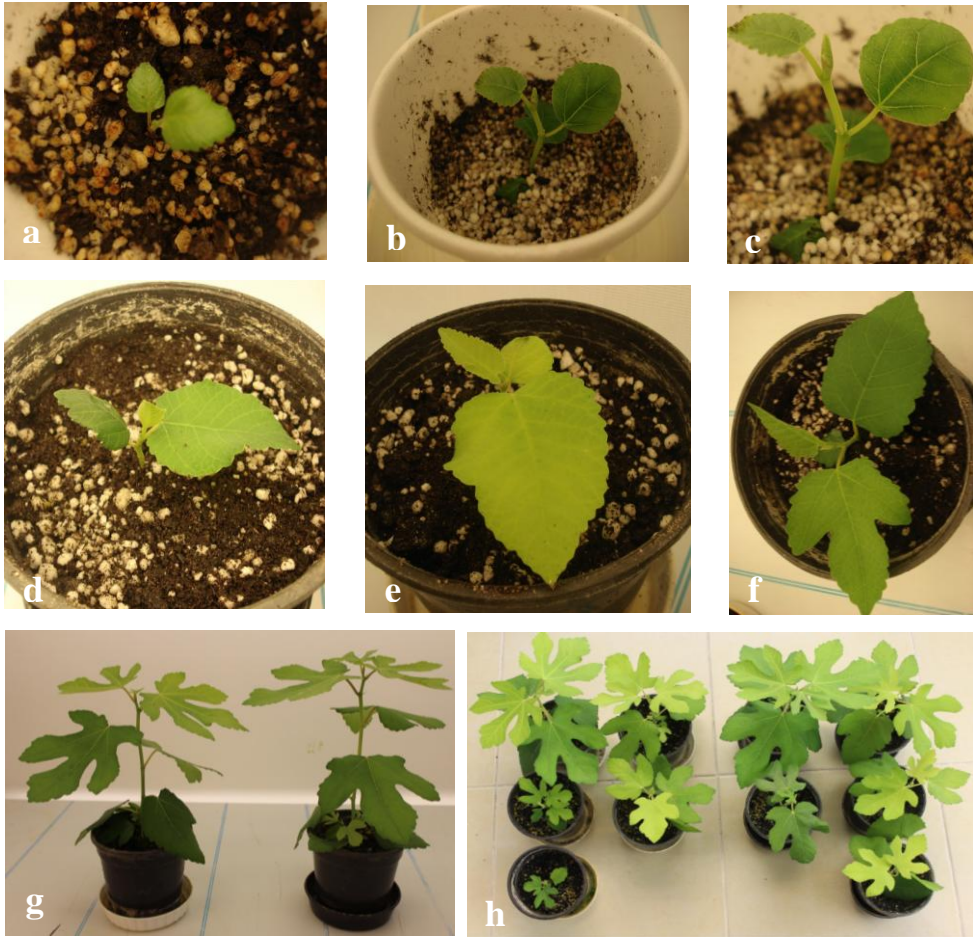
Yeşil çeliklerden kesilerek alınan ve eksplant olarak adlandırılan bu sürgün ucu parçalarının etrafında, düzensiz gelişen, ince çeperli ve kallus olarak isimlendirilen parankimatik hücre toplulukları meydana gelmiştir (Şekil 4.43). Kallus oluşumu sonrası, 4 haftada bir besin ortamında alt kültüre alınarak çoklu sürgünler elde edilmiştir (Şekil 4.43). Daha sonra sürgün uçlarından elde edilen çoklu sürgünlere, 6 hafta boyunca bitki büyüme dolabında ısı uygulaması yapılmıştır. Termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı WPM ve ½ doz MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Şekil 4.43). Kök gelişiminin ardından küçük bitkiler gelişmiştir (Şekil 4.43). Köklendireme ortamı olarak Pontikis ve Melas (1986)'da IBA, NAA, BA ve GA ile zenginleştirilmiş MS ortamını kullanmışlardır. Ancak sürgünlerin, 0,1 ve 0,2 mg/l IBA içeren köklendirme ortamına transfer edildiğinde, %75 oranında sağlıklı bitkiler elde edildiği Demiralay (1997) tarafından bildirilmiştir.



Şekil 4.45. Sürgün ucu kültürü ile küçük incir bitkiciği elde edilmesi; a,b) Sürgün ucu, c) Kallus başlangıcı, ç,d,e,f) Kallus oluşumu, g,h) Çoklu sürgün oluşumu, ı,i) Kök gelişimi sağlanmış incir bitkiciği

4.8.2. *In vitro* Elde Edilen İncir Bitkilerinin Dış Ortama Alıştırılmaları (Aklimatizasyon)

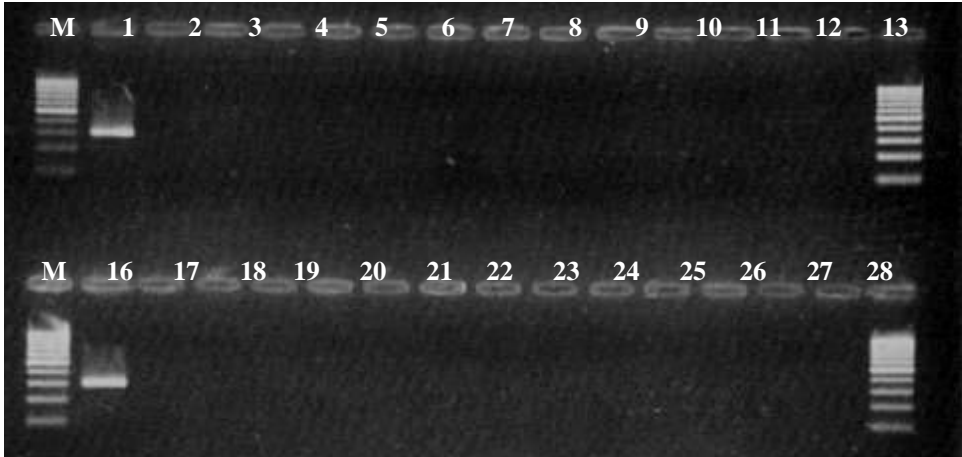
Köklenen 5 Sarılop, 5 de Bursa Siyahı olmak üzere toplam 10 bitkicik, torf ve perlit (1:1) içeren strafor köpük bardaklara aktarılmış ve kontrollü koşullara sahip iklim odasında, *in vitro* elde edilen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.46). Daha sonra aklimatizasyonu sağlanmış *ex vitro* bitkiler, toprak, torf ve perlit (2:1:1) karışımı içeren plastik saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. *In vitro* elde edilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri; a,b,c) dış ortama alıştırma, d,e,f) toprak: torf: perlit (2:1:1) karışımı içeren plastik saksılara aktarılmış bitkiler, g,h) sürgün ucu kültürü ve termoterapi uygulanarak elde edilmiş sağlıklı Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri

4.8.3. *In vitro* Elde Edilen Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Bitkilerinin RT-PCR Testleri

In vitro koşullarda yetiştirilen Sarılop ve Bursa Siyahı incir bitkileri, İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV) ve İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1 (Fig mosaic associated virus-1, FMaV-1) spesifik primer çiftleri kullanılarak RT-PCR testleri yapılmıştır. Test sonucunda *in vitro* elde edilen incir bitkilerinin FMV ve FMaV-1 viral etmenleri yönünden temiz oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.47)



Şekil 4.47. *In vitro* elde edilmiş incir bitkilerinin FMV ve FMaV-1 primerleri ile yapılmış RT-PCR sonrası jel elektroforezindeki görüntüsü. M; Markör, 1; FMV pozitif kontrol, 2-6 arası FMV'den temiz *in vitro* Sarılop incirleri, 7-11 arası FMV'den temiz *in vitro* Bursa Siyahı incirleri, 16; FMaV-1 pozitif kontrol, 17-21 arası FMaV-1'den temiz *in vitro* Sarılop incirleri, 22-26 arası FMaV-1'den temiz *in vitro* Bursa Siyahı incirleri

5. SONUÇ

Türkiye’de ve Dünya’da incir üretiminde üst sıralarda yer alan Aydın İli’nde, incir yetiştiriciliğinin yapıldığı bahçelerde İncir mozaik hastalığının bulunduğu bilinmektedir. Ancak hastalığın yaygınlığının ne çapta olduğu hakkında fazla bir bilgi bulunmamaktadır. Bu sebeble, İncir mozaik hastalığının yaygınlığını saptamak amacıyla Aydın İli’ nin Nazilli, Germencik, İncirliova ve Bozdoğan ilçelerinde sörveyler gerçekleştirilmiştir. Sörveyler sonunda Nazilli ilçesinde 4415, Germencik ilçesinde 3980, İncirliova ilçesinde 1445 ve Bozdoğan ilçesinde 955 incir ağacı incelenmiş ve ağaçların hepsinde farklı şiddetlerde olmak üzere mozaik belirtileri gözlenmiştir. Özellikle incir ağaçlarının genç sürgünlerinde enfeksiyonun etkili olduğu ve dallarda gelişme geriliğine sebep olduğu saptanmış, ayrıca incir meyveleri üzerinde mozaik belirtileri de gözlenmiştir.

İncir mozaik hastalığına neden olan etmenlerin bitki özsuğu ile taşınması ve bazı konukçularını belirlemek amacıyla incir bahçelerinden toplanan taze yaprak örnekleri derin dondurucuda bekletilmiş ve elde edilen bitki özsuğuları ile Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*), sirken (*Chenopodium amaranticolor*), hıyar (*Cucumis sativus*), hanım düğmesi (*Gomphrena globosa*) ve tütün (*Nicotiana tabacum* L. cv ‘Samsun’) bitkilerine mekanik inokulasyon yapılmış, tütün bitkileri hariç diğer test bitkilerinde çeşitli belirtiler görülmüştür. Hıyar (*Cucumis sativus*) yapraklarında, benek şeklinde klorotik lokal lekeler ve şekil bozuklukları, hanım düğmesi (*Gomphrena globosa* L.) yapraklarında klorotik lekeler ile kırmızımsı kahverengi lokal lekeler ve belirgin nekrotik lekeler meydana gelmiştir. Sirken (*Chenopodium amaranticolor* L.) yapraklarında ise benek şeklinde klorotik lokal lekeler ve mozaik belirtileri, Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus* L.) yapraklarında da klorotik lekeler, mozaik ve şekil bozukluğu belirtileri gözlenmiştir.

İncir mozaik hastalık etmeninin *Aceria ficus* Cotte. ergini ile taşınma çalışmaları sonucunda *Catharanthus roseus* L. yapraklarında şekil bozukluğu, kloroz ve yaprak ayasında çukurlaşma ile mozaik belirtileri elde edilmiştir. Ayrıca, Sarılop ve Bursa Siyahı incir yaprakları üzerinde mozaik ve pas belirtisi meydana gelmiştir. Ancak *A. ficus* ergini bulunan hıyar bitkilerinde hiçbir belirti görülmemiştir.

dsRNA izolasyonuna tabi tutulan toplam 136 örnekten 107 tanesinde farklı sayılarda dsRNA bandlarına ait profiller elde edilmiştir. Elde edilen dsRNA profillerinin, 1 ile 6 band arasında değiştiği ve büyüklüklerinin 23.130bp ile 564bp arasında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, Aydın yöresinde İncir mozaik hastalığına neden olan birden fazla viral etmenin olduğu söylenebilir. dsRNA izolasyonu ayrıca *A. ficus* ile taşınmış; Sarılop, Bursa Siyahı incir bitkileri ve *C. roseus* bitkilerine ait yapraklardan yapılmış olup 1 ve 2 banda sahip dsRNA profilleri elde edilmiştir. Bu dsRNA profilleri, FMV' nin akar ile *C. roseus* bitkisine taşıdığıının göstergesidir.

RT-PCR çalışmaları da toplam 136 örnek ile gerçekleştirilmiş ve bu örneklerden 82 tanesinde pozitif sonuçlar alınmıştır. Sonuç alınan bu 82 örnekten 38 tanesinde yalnızca FMV, 18 tanesinde yalnızca FMaV-1, 26 tanesinde hem FMV hem de FMaV-1 etmenleri saptanmıştır. 26 Sarılop ve 12 Bursa Siyahı incir örneği sadece FMV, 8 Sarılop ve 10 Bursa Siyahı incir örneği sadece FMaV-1, 14 Sarılop ve 12 Bursa Siyahı incir yaprak örneği hem FMV hemde FMaV-1 etmenleriyle enfekteli olduğu saptanmıştır. Yapılan RT-PCR testleri sonucunda, İncir mozaik virüsü (Fig mosaic virus, FMV) için 302 bp'de, İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1 (Fig mosaic associated virus-1, FMaV-1) için de 298 bp'de DNA bantları elde edilmiştir. İncir yaprak benek virüsü ile ilişkili-1 (Fig leaf mottle associated virus-1, FLMaV-1) ve İncir yaprak benek virüsü ile ilişkili-2 (Fig leaf mottle associated virus-2, FLMaV-2) primerleri ile herhangi bir pozitif sonuç alınmamıştır. Sonuç olarak, Aydın yöresinde İMH belirtisi gösteren incir bitkilerinde, RT-PCR yöntemi kullanılarak FMV ve FMaV-1 viral etmenlerin var olduğu saptanmıştır.

Aydın yöresinde olduğu belirlenen iki incir viral etmeni İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik ilişkili virüs-1'in klonlanması sonucu yapılan PCR testlerini takiben FMV ve FMaV-1 için dizi belirleme ve filogenetik çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada elde edilen İncir mozaik virüsüne ait Türk izolatların, Japonya izolatları ile % 98, % 97 ve % 94, Kanada izolatları ile % 96, % 93, İran izolatı ile % 93, İtalya izolatları ile % 94, % 88, Amerika izolatı ile % 98 benzerlik oranları belirlenmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde çalışmada elde edilen Türk izolatlar en çok benzerlik göstermiş oldukları Japon ve Kanada izolatları ile aynı grupta yer almışlardır.

Bu proje kapsamında İMH'ye neden olan etmen veya etmenlerin tanılanmasına yönelik yapılan çalışmaların yanı sıra önem arz eden bir diğer husus da üretimde kullanılacak üretim materyalinin nasıl temiz elde edileceği konusudur. Bu çalışmada sürgün ucu kültürü ve termoterapi uygulaması yapılmış İncir mozaik virüsü ve İncir mozaik virüsü ile ilişkili virüs-1'den temiz 5 adet Sarılop, 5 adet de Bursa Siyahı incir bitkileri elde edilmiştir.

İncir mozaik hastalığı üzerine daha önce ülkemizde yapılan çalışmalar ve bu araştırma sonucunda Türkiye'deki incir yetiştirilen alanların İMH etmenlerinin bazıları ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki yapılacak çalışmalar tüm incir viral etmenlerini kapsayacak şekilde yürütülmelidir.

İMH etmenleri aşı ve vektör ile taşıyor olması hastalık etmenleri ile mücadelede zorlukları da beraberinde getirmiştir. Bu nedenle ülkemizde önemli bir dış satım ürünü olan incirin sağlıklı üretim materyalinin elde edilmesi ve bu üretim materyali ile kapama incir bahçelerinin tesis edilmesi önemlidir. Bu araştırma ile Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde virüsten temiz üretim materyalinin nasıl elde edileceği belirlenmiştir. Bu yöntemler diğer incir çeşitlerinde de kullanılarak, sağlıklı incir baz materyalleri elde edilmeli ve çelikler bu anaçlardan alınarak yeni tesis edilecek bahçelerde bu üretim materyalleri kullanılmalıdır. Ancak böylece hastalığın aşı ile taşınma riski ortadan kaldırılabilir. Kurulacak olan bu temiz incir bahçelerinin hastalıktan korunması *A. ficus*' a karşı ruhsatlı bir akarisit geliştirilmesi ile önlenir. Ayrıca *A. ficus* ile hangi incir viral etmen veya etmenlerinin taşındığı ve bununla birlikte taşınma etkinlikleri de çalışılmalıdır. İMH vektörü *A. ficus* dışında diğer incir zararlılarında vektör olabilme olasılıkları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Açıköz, S., Döken M.T., 2001. İncir mozaik hastalığı etmeninin tanılanmasında dsRNA analiz yönteminin kullanılması, **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül 2001, 145s, Tekirdağ.
- Açıköz, S., Döken, M.T., 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 Horticulture**. 605, ISHS 2003. 307-310.
- Açıköz, S., Döken, M. T., Değirmenci, N. F., Coutts, R.H.A., Kozlakidis, Z., 2007. A modified procedure for isolating double-stranded rna: application to diagnosis of amasya cherry disease. **J. Phytopathology**, 97 (4): 1-3.
- Aksoy, U., 2010. Kuru İncir Üretiminde Verim ve Kaliteyi Artırmaya Yönelik Uygulamalar. [<http://www.tarimsalbilgi.org/forums/incir-yetistiriciligi/kuru-incir-uretiminde-verim-ve-kaliteyi-artirmaya-yonelik-uygulamalar/>], Erişim Tarihi: 15.01.2013
- Alfieri S. A., 1967. Fig mosaic. **Plant Pathology** 64: 24-28.
- Al-Mughrabi K. I., Ghandi, H., Anfoka, M., 2000. Distribution of fig mosaic in Jordan. **Phytopathologia Mediterranea**, 39(2): 262-270.
- Anonim, 2009. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 2009 yılı Çiftçi Kayıt Sistemi.
- Anonim, 2010a. Türkiye İstatistik Kurumu Bitkisel Üretim Verileri. [<http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>]. Erişim Tarihi: 15.01.2013
- Anonim, 2010b. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 2010 yılı Çiftçi Kayıt Sistem Verileri.
- Anonim, 2011. İncir Tarihi. [<http://www.erbeyliincir.gov.tr/node/4>], Erişim Tarihi: 14.01.2013
- Anonim, 1967. Bitki Hastalıkları Raporu. 51:1.
- Appiano, A., Conti, M., Zini, N., 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**, 1 July 1995, Roma-Italy.
- Ashihara W., Kondo, A., Shibao, M., Tanaka,H., Hiehata, K., Izumi K., 2004. Ecology and control of Eriophyid mites injurious to fruit trees in Japan. **JARQ** 38 (1): 31– 41.
- Barbosa, W., Campo Dall Orto, F. A., Ojima M., Martines, F. P., Bovi, V., Castro, J. L., 1992. Produção de mudas da figueira „Roxo de Valinhos, através de cultura in vitro. **Agrônômico, Campinas**, 44 (1): 6-10.

- Barnet, O. W. 1986. Surveying for plant viruses: design and consideration In: Plant Virus Epidemics: Monitoring, Modeling and Predicting Out Breaks. (McLean, G.D., Garrett, R.G. and Ruesink, W.G. Eds.) Academic Press, pp. 147-166, Sydney, Orlando.
- Blodgett, E.C., Gömeç, B., 1967. FAO-UNSF Proje No:142 Ürün Araştırma ve Geliştirme Merkezi, İzmir.
- Bozdoğan B., Otlu, B., Çoban, A.Y., Demirpek, U., Oryaşın, E., 2010. Klonlama Kursu Teorik ve Uygulama Kitapçığı. Editör: Bülent Bozdoğan, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi.
- Bradfute, O. E., Whitmoyer, R. E., Nault, R. L., 1970. Ultrastructure of plant leaf tissue infected with mite-born viral-like pathogens. **Proc. Electron Microsc. Soc. Amer.**, 28: 178-179.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., 1996. Viruses of Plants. CAB International, Wallingford, UK, pp.1504.
- Castellano, M.A., Gattoni, G., Minafra, A., Conti, M., Martelli, G.P., 2007. Fig mosaic in Mexico and South Africa. **J. Plant Pathol**, 89: 441-443.
- Clark, M. F., Bar Joseph, M., 1984. Enzyme immunosorbent assays in plant virology. In: Methods in Virology (Maramorsch, K. and Koprowski Eds.) Academic Press, pp. 51-85, New York.
- Condit, I. J., Horne, W. T., 1933. A Mosaic of The Fig in California. **Phytopathology**, 23: 887-896.
- Credi, R., 1998. Mite transmission of the fig mosaic disease agent to periwinkle. Abstracts **7th International Congress of Plant Pathology**, 9-16 August 1998, Edinburgh, Scotland.
- Çağlar, B.K, Fidan, H., Güldür, M.E., Elbeaino T., 2009. The prevalence of three viruses infecting fig in Southern Turkey. **Journal of Phytopathology**, 30: 1-3.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Serçe, Ç., Soylu, S., Yalçın, S., 2007. Is a phytoplasma responsible for fig mosaic disease? **Bulletin of Insectology** 60 (2): 149-150.
- Çağlayan, K., Barutçu, E., Serçe, Ç., Gazel, M., Medina, V., Soylu, S., Yiğit, A., Kaya, K., Çalışkan, O., 2009. İncir mozaik hastalığının ultrastrüktürel ve moleküler tanısı. **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi**, 15-18 Temmuz 2009, Van, 132s.
- Çağlayan, K., Serçe, Ç.U., Barutçu, E., Kaya, K., Medina, V., Gazel, M., Soylu S., Çalışkan, O., 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 (12): 1448-1452.

- Çömlekcioglu, S., Küden, A. B., Aka Kacar, Y., Kamberoğlu, M. A., 2007. Meristem culture of two fig cultivars in Turkey. **Fruits**, 62 (2):125-131.
- Dalkılıç, G. G., Ertan, E., 1998. A study on the propagation of figs by the tissue culture techniques. Proc. First International Fig Symposium. **Acta Horticulturae**, 480: 124-126.
- Demiralay, A., 1997. Bursa Siyahı İncir Çeşidinin Meristem Kültürü Yöntemiyle Çoğaltılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Ding P., Liu, F., Xu, C., Wang, K., 2007. Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. **Biological Control**, 40 (9): 78-82.
- 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 Pathol.**, 88: 187-192.
- Elbeaino, T., Digiario, M., De Stradis, A., Martelli, G.P., 2007. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. **J. Plant Pathol.**, 89: 119-124.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M.A., Martelli, G. P., 2009a. 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., Martelli, G.P., 2009b. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. **Arch Virol.**, 154:1719–1727.
- Elbeaino, T., Kubaa, R.A., Digiario, M., Minafra, A., Martelli, G.P., 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. *Virus Genes*, 42 (3): 415-421. DOI 10.1007/s11262-011-0581-0 *Virus Genes* (Epub ahead of print).
- 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 Pathol.** doi:10.4454/JPP. FA.2012.027. [<http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/2570>], Erişim Tarihi: 18.01.2013
- Falk, B.W., Salem, N., 2006. Fig Mosaic *Fruits and Nuts*. [ucdavis.edu/crops/2006figday_falk.pdf], Erişim Tarihi: 18.01.2013.
- Flock, R. A., Wallace, J. M., 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., 2000. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capilo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (DOP RT-PCR). **Acta Horticulture**, 550: 37-43.
- Fraguas, C.B, Pasqual, M., Dutra, L. F., Cazetta, J. O., 2004. Micropropagation of Fig (*Ficus carica* L.) 'Roxo De Valinhos' plants *in vitro*. **Cellular & Developmental Biology. Plant**. 40 (5): 471-474.
- Gattoni G., Minafra, A., Castellano, M.A., De Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P., 2009. Some properties of fig latent virus 1, a new member of the family flexiviridae. **Journal of Plant Pathology**, 91 (3): 555-564.
- Gattoni, G., Minafra, A., Castellano, M.A., De Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P., 2010. Worldwide diffusion of Fig latent virus 1 in fig accessions and its detection by serological and molecular tools 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. **Julius-Kühn-Archiv**, 427: 83-86.
- Gella, R., Lopez C. M., Toribio, F., Marin, J.A., 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. I. International Symposium on Fig. **Acta Horticulturae**. 480: 173-177.
- Hafez E., El-Morsi, A. A., Abdelkhalek, A. A., 2012. Biological and molecular characterization of the fig mosaic disease. **An International Journal for Pathogen Research**, [Electronic Journal], 20138: 1-25 [<http://bio.sophiapublisher.com/abstract-174-mp>], Erişim Tarihi: 17.01.2013.
- 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.
- Khalid, A., 2012. Incidence of fig leaf mottle-associated virus and fig mosaic virus in eastern province of Saudi Arabia. **International Journal of Virology**, 8: 128-132.
- Kumar, P., Jones, A. T., Reddy, D. V. R., 2003. A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeon-pea sterility mosaic disease. **Phytopathology**, 93:71-81.
- Laney, A., Hassan, M., Tzanetakis, I., 2012. An integrated banda virus is prevalent in fig germplasm. **Phytopathology**. 19: 58-62.
- Lloyd, G.B., McCown, B.H., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel-Kalmia latifolia by use of shoot-tip culture. **Proc. Int. Plant Prop. Soc.** 30: 421-427.

- Lopez Corrales, M., Cella, R., Mann, J.A., Torihio, F., 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. I. International Symposium on Fig. **Acta Horticulturae**, 480:173-177.
- Martelli, G. P., Castelleano, M. A., Laforteza, R., 1993. An ultrastructural study of fig mosaic. **Phytopath**, 32: 33-43.
- Martelli, G.P., De Stradis, A., Digiario, M., Elbeaino, T., 2006. Partial characterization of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. **Journal of Plant Pathology**, 88 (2): 187-192.
- Minafra, A., Chiumenti, M., Elbeaino, T., Digiario, M., Bottalico, G., Pantaleo, V., Martelli, G.P., 2012. Occurrence of fig badnavirus 1 in fig trees from different countries and in symptomless seedlings. **Journal of Plant Pathology**, doi: 10.4454/JPP.DN.2012.024.
- Morteza, S., Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H. R., Elbeaino, T., 2012. Current status of fig mosaic disease in Iran. **Journal of Pathology**, 4:324–330.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 56: 473-497.
- Muriithi, L.M., Rangan,T.S., Waite, B.H., 1982. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. **HortScience**, 17:86-87
- Nakasone, W., Kusakari, S., 1991. Occurrence and control of fig mosaic disease caused by mites. **Plant Prot.**, 33: 116-119.
- Nemoto, H., Kobayashi, M., Osawa, T., Yamashita, S., Doi, Y., 1980. Studies on eriophyid mites. Two Eriophyid mites injurious to fig and chrysanthemum. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, 24 (2): 49-53.
- Nolasco, C., Amaro de Sequeira O., 1991. Double-stranded RNA (dsRNA) associated with fig mosaic disease. **Potuguese-Spanich Biochemistry Congress**. 74 pp.
- Özalp, O., Heper, E., 1972. Ege Bölgesinde İncir mozaik virüsü ve bu virüse dayanıklı incir ağaçları üzerinde araştırmalar, Bit. Kor. Bül., 12 (4): 228-262.
- Özar, A. İ., Önder, P., Özkut, S., Gündoğdu, M., Sarıbay, A., Genç, H., Azeri, T., 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 s.
- Özçiçekçi, F., Açıkgöz, S., 2009. İncir mozaik hastalığı'nın Aydın ilinde yaygınlığı ve şiddeti ile hastalık etmeninin konukçu çevresi ve serolojik ilişkilerinin belirlenmesi. **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, (15-18 Temmuz, 2009), pp. 224, Van.

- Özden, Ç., 2008. Kuru incir. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracaatı Geliştirme Etüd Mekezi.
- Plavsic, B., Milicic, D., 1980. Intracellular changes in trees infected with fig mosaic. **Acta Hort.**, 110: 281-286.
- Pontikis, C.A., Melas, P., 1986. Micropropagation of *Ficus carica* L. **HortScience**, 21:153-155.
- 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.
- Routh, G., Zhang, Y., Saldarelli, P., Rowhani, A., 1998. Use of primers for partial sequencing and RT-PCR based assays of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 3. **Virology**, 88: 11-16.
- Salomon, R., Voronov, N., Flishman, M., 2002. Characterization of The Fig Mosaic Virus: A Widely Speared But Little Known Virus, Fruit Trees. ARO. The Volcani Center, Isreal.
- Salomon, R. 2004. Stress-related expression of virus symptoms in fig (*Ficus carica* L.). **Israel Journal of Plant Sciences**, 52: 103-107.
- Salomon, R., Mawassi, M., Flaishman, M., 2005. Isolation and Characterization of A Virus From Fig Leaves Exhibiting Mosaic Symptoms and Development of A Sensitive Detection Procedure For This Virus. Fruit Trees, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel.
- Serrano, L., Ramon, J., Segarra, J., Medina, V., Achon, M. A., Lopez, M., 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.** 30 September 2004, Valencia-SPAIN.
- Sipahioğlu, H.M., Ocak, M., Usta, M., 2007. Comparison of three conventinal extraction methods fort the detection of plant virus/viroid RNAs from heat dried high phenolic host leaves. **Asian Journal of Plant Sciences** ,6 (1): 102-107.
- Şahitiyancı, Ş. 1972. Bitki Virüs Hastalıkları (Prof.Dr. Maximillian Klinkowski) Özel Kısım Bölge Zirai Araştırma Enstitüsü Erenköy, İstanbul.
- Tzanetakakis, I.E, Laney, A.G., 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: 79-82.
- Valverde, R.A., Nameth, S.T., Jordan, R.L., 1990. Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**. 74: 255-258.
- Vashist, K.S., Nagaich, B.B., 1968. *Aceria ficus* (Cotte.) as a vector of fig mosaic in India. **Indian Journal Entomology**, 30:322.

- Walia, J.J., Salem, N.M., Falk, B.W., 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. **Plant Disease**, 93 (10): 4-10.
- Yakoubi S., Elleuch, A., Besaies, N., Marrakchi, M., Fakhkakh, H., 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. 3.1. Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar

1. Ezme Tampon Çözeltilisi (Ekstraksiyon buffer) (100 mM Tris-HCl)

pH.8.0, 50mM EDTA pH. 7.0, 500 NaCl, 10mM 2-mercapto-ethanol (1/1000))

Tris-HCl 2.4228 g

EDTA 3.7224 g

NaCl 5.844 g

Yukardaki miktarlar 150 ml distile su içerisinde sırasıyla çözülmüş pH ayarlaması yapılmış ve toplam hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 oranında 2-Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

2. Sodyum dodesul sülfat (%20) (Sodium Dodecyl Sülfate, SDS)

20 g sodium dodecyl sülfate 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3. Potasyum Asetat (Potassium acetate CH₃COOK) (5M)

49.075 g potassium acetate 60 ml su içerisinde çözülmüş ve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

4. Sodyum asetat (Sodium acetate CH₃COONa) (3M)

40.824 g sodium acetate 60 ml su içerisinde çözülmüş ve hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

5. Etanol (%70'lik) (Ethanol)

70 ml %99' luk etanol ile 29 ml su karıştırılarak % 70'lik etanol hazırlanmıştır.

Ek.3.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) (pH: 8,3)

1X TBE buffer hazırlamak için 10.777 gr Tris-Base, 5.502 gr borik asit ve 0.744 gr EDTA 900 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH'sı 8,3 olarak ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

2. Etidyum bromid

10 mg etidyum bromid 1 ml saf su içerisinde ependorf tüpünde eritilmiştir.

Daha sonra bu ana stoktan 30 µl alınarak 100 ml saf su içerisine ilave edilmiştir.

3. Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol (25:24:1)

Stok fenolden bir pipet yardımıyla dikkatlice 25 ml çekilir. Üzerine 24 ml kloroform ve 1 ml izoamil alkol ilave edilerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlanır.

4. Kloroform/İzoamil Alkol (24:1)

24 birim kloroform, 1 birim izoamil alkol ile karıştırılarak hazırlanır. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve + 4 °C'de saklanmalıdır.

5. M Na-asetat (pH 4.8 ve 5.2)

Hazırlanmak istenen hacimde, 3 M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve manyetik karıştırıcı üzerinde bir miktar saf suda çözülür. Glasiyal asetik asit ile pH'sı ayarlanır ve saf su ile istenen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir.

6. Agaroz Jel

Belirlenen hacim için gerekli miktarda agaroz tartılarak bir erlen içerisine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (Ek 1.11.) konarak alev üzerinde eriyinceye kadar tutulur. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50 °C) soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde EtBr solüsyonu (Ek 1.12.) ilave edilir. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel tarağı yerleştirilir ve donması için yaklaşık 40 dk beklenir. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği yerleştirilir.

7. 0.1 M MgCl₂

İstenen hacim için gerekli MgCl₂ hesaplanarak tartılır ve istenilen hacimde saf su ile çözülür. Otoklavlanarak +4 °C'de muhafaza edilir. Kontamine etmeden kullanılır.

8. X-gal (20 mg/ml)

İstenen hacim için gerekli miktarda X-gal tartılarak N,N-Dimetilformamid içerisinde çözülür. Koyu renkli bir şişeye alınarak veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C'de muhafaza edilir. Hazırlanan besi yeri 45-50 °C'ye kadar soğuduktan sonra son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde stoktan ilave edilir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nazlı Funda EDREMİT

Doğum Yeri ve Tarihi : Burdur 26.10.1978

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce, Almanca

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

Açıkgöz, S., M.T.Döken, **N.F.Değirmenci**, R.H.A. Coutts and Z.Kozlakidis, 2007. A Modified Procedure for Isolating Double-stranded RNA: Application to Diagnosis of Amasya Cherry Disease. J. Phytopathology, 97 (4): 1-3p.

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslar arası

Açıkgöz, S. M.T. Döken,R.H.A.Coutts and **N.F. Değirmenci**, 2006. A Procedure for Extracting Viral RNA From Cheery Leaves Exhibiting Amasya Cherry Disease Symptoms, XXth International Symposium on Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops and XIth International symposium on Small Fruit Virus Diseases Antalya /TURKEY May 22-26, 89p

Açıkgöz, S., M. Timur Döken, Ö. Erincik Z.Özdemir ve **N. F. Değirmenci**, 2007. Determination of Mating Types of Chestnut Blight Causal Agent *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr, by Multiplex PCR in Aydın, International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries: Problems and Prospects, 23-25 October, 2007, Bursa –Turkey 22s

- Açıkğöz, S., M.T. Döken, Ö. Erincik, Z. Özdemir, **N.F. Değirmenci**, 2009. Determination of mating types of chestnutblight causal agent *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr by multiplex PCR in Aydın Province/ Turkey. IV. International chestnut symposium. 25-28 September, Miyun. Beijing, China. Acta Horticulture 844: 367-372.
- Açıkğöz, S., M.T. Döken, Ö. Erincik, Z. Özdemir, **N.F. Değirmenci**, 2009. Determination of Hypovirulent Isolates of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr by dsRNA Analysis in Aydın-Turkey . Castanea 2009. I.st European Congress on chestnut. 13-16 October, Cuneo, Italy. Acta Horticulture 866: 379-384.
- Edremit, N.F, S. Açıkğöz, A. Gurel ve Ş. Hayta, 2012. Production of virus-free sarilop fig plantlets by shoot tip culture and thermoterapy and virus detection of *in vitro* plantlets through RT-PCR. Uluslararası tarım ve gıda kongresi 2012 Belek, Antalya, Türkiye, Şubat, 15-19, 2012. 92p.

-Ulusal

- Açıkğöz, S., M.T.Döken Ö. Erincik, **N.F. Değirmenci** 2004, Aydın Yöresinde *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr'ın Hipovirulent İzolatların dsRNA Analiz Yöntemi ile Saptanması Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi (8-10 Eylül Samsun)
- Değirmenci, N. F** ve S. Açıkğöz, 2004. Aydın Yöresinde Yetiştirilen Sofralık ve Sanayi Domates Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Bazı Tohum Kaynaklı Viral Etmenlerin DAS-ELISA Yöntemi ile Saptanması. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 8-10 Eylül, 2004, Samsun, 213 s.
- Değirmenci, N. F** ve S. Açıkğöz, 2005. Aydın İli' nde Yaygın Olarak Kullanılan Sertifikalı Domates Tohumlarındaki Bazı Viral Etmenlerin Saptanmasında Biyolojik Ve Serolojik Yöntemlerin Kullanılması. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi Bildiri Özetleri, 9-11 Kasım, 2005. Adana, 82 s.
- Açıkğöz, S., M. Timur Döken, Ö. Erincik Z. Özdemir ve **N. F. Değirmenci**, 2007. Aydın Yöresindeki Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr'ın Mating Tiplerinin Multiplex PCR ile Belirlenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-29 Ağustos, 2007, Isparta, 96s.

Edremit, N.F. ve S.Açıkğöz, 2011. Aydın Yöresinde İncir Mozaik Virüsünün Moleküler Tanılanması ile İlgili İlk Rapor Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş, 73s.

Edremit, N.F., S. Açıkğöz ve B. Bozdoğan, 2012. RT-PCR ve Dot-blot Analiz Yöntemlerinin İncir Mozaik Virüsünün Tanısı için Kullanılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir.

c) Katıldığı Projeler

Aydın İli ve İlçelerinde Yaygın Olarak Kullanılan Domates Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar (ADÜ BAP 200-2003)

Aydın Yöresindeki Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr' nın Mating Tiplerinin Multiplex PCR ile Belirlenmesi (TÜBİTAK 2006-2007)

Aydın İli' nin Bazı İlçelerinde İncir Mozaik Hastalığının Yaygınlığının Belirlenmesi, Etmenin Tanılanması ve Üretim Materyalinin İncir Sürgün Ucu Kültürü - Termoterapi İle Etmenden Arındırılması (ADÜ BAP 2009-2012)

Aydın Yöresinde Görülen İncir Mozaik Hastalığının Moleküler Karakterizasyonu (ADÜ BAP 2011-2012)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

ADÜ Ziraat Fakültesi 2001-2005

Manisa Gıda Tarım Hayvancılık İl Müdürlüğü 2006-2011

Akhisar Gıda Tarım Hayvancılık İlçe Müdürlüğü 2012-

İLETİŞİM

E-posta Adresi : nazlifunda@yahoo.com

Tarih : 15.01.2013