



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİMDALI

KAYISILARDA ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMASI HASTALIĞININ
("Candidatus Phytoplasma mali") AŞI VE KÖK KAYNAŞMASI YOLU İLE
TAŞINMA ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hacer GÜLTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

NİSAN-2011

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAYISILARDA ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMASI HASTALIĞININ
("Candidatus Phytoplasma mali") AŞI VE KÖK KAYNAŞMASI YOLU İLE
TAŞINMA ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hacer GÜLTEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 27/04/2011 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Başkan

Doç.Dr. Sedat SERÇE
Üye

Doç.Dr. Mona GAZEL
Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof.Dr. Necat AĞCA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 04YO106

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Yurt dışında Yapılan Çalışmalar.....	3
2.2. Ülkemizde Yapılan Çalışmalar.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	8
3.1.Materyal.....	8
3.1.1. Fitoplazma kaynağı.....	8
3.1.2. EÇSF fitoplazmasının aşıyla ve kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin araştırılması.....	8
3.2.Yöntem.....	9
3.2.1. EÇSF fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin saptanması.....	9
3.2.2. Kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin saptanması.....	10
3.2.3. Moleküler Testler.....	12
3.2.3.1. Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	12
3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Testleri.....	13
3.2.3.3. Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (RFUP) Analizi... ..	14
3.2.3.4. DNA Dizileme.....	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	14
4.1. Aşı gözü ile taşınma etkinliğinin saptanması.....	14
4.2. Kök kaynaşması yoluyla taşınma oranları.....	19
4.2.1.Simtolojik Gözlemler.....	19
4.2.3. Kök kaynaşmasının mikroskopik incelenmesi.....	20
4.2.2. PZR Analizleri.....	22
4.2.4. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Analizi.....	28
4.2.5. Sekans Analiz Sonuçları.....	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32

KAYNAKLAR.....	34
TEŞEKKÜR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	38
EKLER.....	39
EK.1.....	39
EK.2.....	40

ÖZET

KAYISILARDA ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMASI ("*Candidatus* Phytoplasma mali") HASTALIĞININ AŞI VE KÖK KAYNAŞMASI YOLU İLE TAŞINMA ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma ile Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF) ("*Candidatus* Phytoplasma mali")'nın arazi koşullarında enfekteli aşı gözü kullanımı ve kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece hastalığın doğal koşullarda vektörler dışında taşınma ve yayılma durumu hakkında elde edilecek verilerden yararlanılarak hastalığın kontrolüne yönelik önemli bulgular elde edilmesi hedeflenmiştir. EÇSF fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliklerinin belirlenmesi için ülkemizde kayısı için en yaygın kullanılan çöğür zerdali anacı üzerine enfekteli ağaçlardan alınan aşı gözleri 100 adet anaca Temmuz 2009'da durgun göz aşısı ile aşılanmıştır. Kök kaynaşma çalışmaları için ise ülkemizde yaygın yetişen çeşitlerden olan zerdali anacı üzerine aşılanmış Hacıhaliloğlu ve Sakıt kayısıları kullanılmıştır. Her bir çeşitten otuz bitki çiftler halinde aynı saksıya dikilmiş ve çiftlerden bir tanesi daha önceki çalışmalarla pozitif bulunan referans EÇSF izolatu ile inokule edilmiştir. Denemede her bir çeşit için 15 tekerrür kullanılmıştır. Her iki denemede de kullanılan tüm bitkiler periyodik aralıklarla Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFUP) yöntemi ile testlenmişlerdir. Testleme sonuçlarına göre EÇSF'nin aşı ile taşınma oranı %12,76 olarak bulunmuştur. Kök kaynaşması yolu ile taşınma sonuçlarından tutarlı bir sonuç alınamamıştır. Bunun nedeni deneme süresi boyunca bitki çiftleri arasında kök anastomosis olayının gerçekleşmemesi olarak değerlendirilmiştir.

2011, 41 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kayısı, Kök kaynaşması, aşı ile taşınma, *Candidatus* Phytoplasma prunorum, PZR-RFUP.

ABSTRACT**STUDIES ON EFFICIENCY of TRANSMISSION of APPLE PROLIFERATION
PHYTOPLASMA ("*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA MALI") BY GRAFTING
AND ROOT BRIDGES APRICOT**

This study has been carried out to determine transmission efficiency of Apple proliferation (AP) phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma mali) by using field infected buds and also by formation of root bridges. It was aimed to obtain data on other dissemination ways of this phytoplasma rather than vectors. This data will be very useful in order to develop control strategies to AP. For the graft transmission efficiency experiments, 100 budwoods were collected from the field-infected trees and grafted on zerdali seedlings which are the most common rootstocks for apricots in Turkey, in July-2009. Two local apricot cultivars (cv. Sakit and cv. Hacıhaliloğlu) grafted on wild apricot seedlings were used for the experiment of transmission by rootbridges. Thirty plants as pairs for each cultivar were planted and one of the pairs was inoculated by using bark of AP reference isolate, which were detected in previous studies. The study was replicated 15 times for each cultivar. All plants used for both experiments were periodically tested by PCR-RFLP analyses. According to PCR analyses graft transmission rate of AP was found as 12,76 %. However no consistent results were obtained by root-bridge transmission. It might be due to obtaining no anastomosis between pairs during this study.

2011, 41 pages

Key words: Apricot, root bridges, bud grafting, *Candidatus* Phytoplasma prunorum, PCR-RFLP.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
AP	Apple proliferation
ASSF	Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması
AY	Armut yıkımı
bp	Baz çifti (base pair) mikoplazma
°C	Santigrat derece
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTB	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
d ₂ H ₂ O	Çift destile su
EÇSF	Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması
ESFY	European stone fruit yellows phytoplasması
EtBr	Etidyum bromid
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid
G	Gram
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorit
KOAc	Potasyum asetat
MBO	Mikoplazma benzeri organizma
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfid
µl	Mikrolitre
PD	Pear decline
pmol	Piko mol
PLN	Prunus leptonekroz

RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hacıhaliloğlu ve Sakıt çeşitlerinde Simptomolojik Gözlemler (0-3 Skalasına göre) 0: Simptom yok, 1: Yapraklarda hafif renk değişimi, 2: Yapraklarda şiddetli renk değişimi, yaprak dökümü ve çiçeklenme anormallikleri 3: bitkinin gücünün azalması ve geriye ölüm.

Çizelge 4.1. Direk ve Nested PZR analizlerinde kullanılan universal ve Elma Çoklu Sürgün

(EÇSF) grubu fitoplazmalara spesifik primer baz dizileri

Çizelge 4.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF)’ nın Farklı Kayısı Çeşitlerinde Kök Kaynaşması Yoluyla Taşınma Durumunun Aylık Nested-PCR Analiz Sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1 Mersin-Mut'ta Elma çoklu sürgün fitoplazma (EÇSF) hastalığı ile enfekteli kaynak bitkideki hastalık görünümü
- Şekil 3.2. Temmuz- 2009 döneminde EÇSF fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile zerdali anaçlarına yapılan aşılama çalışması.
- Şekil 3.3. Temmuz- 2009 döneminde EÇSF fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile aşılanan zerdali anaçlarının genel görünümü.
- Şekil 3.4. Şubat 2009 da Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemesi için saksıya alınan kayısı fidanlarından sağdaki (Sakit) soldaki ise (Hacıhaliloğlu) çeşitleri
- Şekil 3.5. Mart ve Mayıs 2009'da saksıdaki fidanlardan birine yapılan aşı ve kabuk inokulasyonundan genel bir görüntü
- Şekil 4.1. A: Zerdali anacı üzerine aşıli enfekteli kayısı sürgünlerinde görülen zayıf gelişme belirtileri. B: Sağlıklı kontrol (kayısı).
- Şekil 4.2. Aşı ile taşınma için (26 ve 27) alınan kayısı örneklerinin F01/R01 primerleri ile yapılan Nested PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)
- Şekil 4.3. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88)örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin SspI enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)
- Şekil 4.4. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin RsaI enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.5. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin BfmI enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.6. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin (Ppu21I) enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.7. Kök kaynaşması kontrolü amacıyla sökülen bitkilerin genel durumu

Şekil 4.8. Kök kaynaşma gözlemleri için sökülen Hacıhaliloğlu çeşidinin kök bölgesinin genel görünümü (solda). Mikroskopik inceleme için gönderilen ve kaynaşma olasılığı olan köklerin görünümü (sağda).

Şekil 4.9 Kök kaynaşması (Sakit 2A, 4A, 5A, 6A, 7A ve 13A) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen Ağustos ayı PZR sonuçları. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.10. Kök kaynaşması örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen Ekim ayı PZR sonuçları. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.11. Kök kaynaşması (3-A, 8-B, 9-B, 13-A, 13-B, 14-A ve 15-A) Hacıhaliloğlu örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin SspI enzimi (sol) ve RsaI enzimi (sağ) ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.12. Kök kaynaşması (3-A, 8-B, 9-B, 13-A, 13-B, 14-A ve 15-A) Hacıhaliloğlu örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin Bfml enzimi (sol) ve Ppu21I enzimi (sağ) ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Şekil 4.13. Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemesinden alınan 12 nolu sakıt kayısı izolatının baz eşleşme sonuçları.

Şekil 4.14. Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemesinden alınan 6 nolu sakıt kayısı izolatının baz eşleşme sonuçları.

1. GİRİŞ

Kayısı (*Prunus armeniaca*), Kuzeydoğu ve Çin kökenli bir meyvedir. Bu meyve coğrafik olarak dünyanın hemen hemen her yerine dağılmış olsa da daha çok Akdeniz'e yakın olan ülkelerde, Avrupa, Orta Asya, Amerika ve Afrika kıtalarına yayılmış ve burada yetiştirme alanı bulmuştur. Sahip olduğu değişik ekolojik koşullar nedeniyle pek çok meyve kültürünün merkezi olan Türkiye kayısı, elma, erik ve kiraz gibi farklı meyve ağaçlarının anavatanı ve meyvecilik kültürünün merkezidir.

Dünya yaş kayısı üretiminin % 10-15'inin yapıldığı Türkiye birinci sıradadır. Türkiye'yi İspanya, İtalya, Birleşik Devletler topluluğu, İran, Fransa, Yunanistan ve ABD izlemektedir. Türkiye dünya kuru kayısı üretiminin de % 85-90'unu karşılamaktadır.

Sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki hastalık ve zararlılar ekonomik olarak önemli kalite ve verim kayıplarına neden olmaktadır. Zararlı böcekler, fungal ve bakteriyel hastalıklar değişik kimyasallar kullanılarak etkili bir savaşım yöntemiyle başarılı bir şekilde önlenabilmektedir. Ancak, virüs, viroid ve fitoplazma gibi hastalıklarla aynı şekilde kimyasal mücadele yapılamamaktadır.

Daha önceleri mikoplazma benzeri organizma (MBO) olarak adlandırılan fitoplazmalar (Lee ve ark., 1992), ilk kez 1967 yılında Doi ve ark. tarafından elektron mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda o güne kadar bitkilerde virüsler tarafından neden olunan sarılık hastalıklarının sorumlusu olarak rapor edilmiştir. Fitoplazmalar iki tip nükleik asit içermekte (DNA ve RNA) ve virüsler ile bakteriler arasında bir ara form oluşturmaktadır. Bakterilerden farklı olarak sert hücre duvarına sahip değildir, bitkilerin floem iletim demetinde bulunurlar ve kültüre alınmazlar. Fitoplazmalar büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, polimorfik ve sadece canlı konukçu dokularında yaşayabilen obligat parazit canlılardır. Fitoplazmalar prokaryot canlıların *Mollicutes* sınıfında yer alırlar ve dünyada yaklaşık 1000 kadar bitki türünde hastalık yapmaktadır (Seemüller ve ark., 2002).

Meyve ağaçlarında ekonomik anlamda zarar yapan ve yaygın olan üç fitoplazma hastalığı bulunmaktadır. Bunlar: Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması (ASÇF) (European stone fruit yellows; ESFY), Armut Yıkımı (AY) (Pear decline=PD) ve Elma çoklu sürgün (EÇS) (Apple Proliferation=AP) fitoplazması'dır. Bu üç hastalık ile ilgili son yıllarda yapılan ve patojenlerin korunmuş genlerini içeren 16SrDNA'sının

baz dizilerinin tayini ve RFLP analizlerini içeren moleküler çalışmalara göre armutlarda PD, ESFY ve AP fitoplazmalarının “Apple proliferation (AP)” grubuna (16SrX) ait oldukları belirlenmiştir.

Kuzey Amerika’daki sert çekirdekli meyve ağaçlarını enfekte eden fitoplazmalar genetik olarak farklı Batı X-hastalıkları grubu (Western X-diseases group) üyesidirler (Lee ve ark., 1998). Lee ve ark. (1998) tarafından yapılan fitoplazma sınıflandırmasına göre elmalarda EÇS, armutlarda AY ve sert çekirdeklielerde ASÇ fitoplazmalarının Elma aşırı sürgün oluşumu (Apple Proliferation=AP) grubuna (16SrX) ait oldukları belirlenmiştir. Son yıllarda fitoplazma grubu patojenlerin sınıflandırılması ve bilimsel isimlendirilmesi konusunda yapılan çalışmalar sonucunda EÇS hastalığının etmeni *Candidatus Phytoplasma mali* olarak adlandırılmıştır (Seemüller ve Schneider, 2004).

Hastalığın bazı çeşitlerdeki en önemli belirtileri bodurlaşma, verimsizleşme, gövdede kırmızı-kahverengi kabukların oluşması ve ağaç üzerindeki bu renkli bölgelerin zamanla nekrotik bir görünüm alarak bazı dalların solmasıdır. Genç ağaçlar yaşlı ağaçlara göre daha çok etkilenir. Orta şiddette hasta olan ağaçlar birkaç yıl normal şekilde meyve verirken çok şiddetli enfeksiyonlarda ölüm görülebilir. Sürgünlerde rozet yaprak oluşumu çok tipiktir ve aşırı yan dallanma sonucu "cadı süpürgesi" tabir edilen belirtiler oluşur. Yapraklarda yan kulakçıklardaki anormal büyüklük dikkati çeker. Baharda hafif kloroz ve yaz sonuna doğru erken yaprak kızarması görülür. Enfekteli ağaçların yaprakları erken, küçük ve düzensiz çıkarlar. Meyvelerde küçülme, boyuna uzunluk yerine genişleme görülür. Meyve çiçek sapı normalden uzun olur ve meyve dökümü görülür. Meyve belirtileri en fazla Jonathan çeşidinde görülür. Hastalık nedeniyle çok sayıda zayıf kök oluşumu meydana gelebilir (Blumer ve Bovey, 1957; Schuch, 1962; Bovey, 1963, 1972).

Fitoplazma hastalıkları ile yapılan araştırmalar esnasında bazı araştırmacılar enfekteli ağaçların genellikle aynı sırada olduğunu veya bahçe içinde gruplar halinde gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu gözlemler fitoplazma hastalıklarının yayılmasında kök kaynaşmasının önemli olabileceğini (Bliefernicht ve Krczal, 1995) özellikle de EÇS Fitoplazmasının orta yaşlı ve yaşlı elma bahçelerinde bu şekilde yayılmasının önemli olduğunu göstermiştir (Cicotti ve ark. 2008). Son yıllarda yapılan bir çalışmada EÇS fitoplazması sert çekirdekli meyve ağaçlarından erik, kayısı ve kirazlarda da saptanmıştır (Mehle ve ark. 2007). Bu fitoplazmanın kaysılarda gövde nekrozlarına ve

solgunluk belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir. Ancak yumuşak çekirdekli meyvelerde kök kaynaşması yoluyla taşındığı saptanan EÇS fitoplazmasının sert çekirdekli meyvelerde de aynı yolla taşındığına dair bir kayıt bulunmamaktadır. Ayrıca aşı yoluyla elmadan elmaya taşındığı bilinen bu fitoplazma etmeninin sert çekirdekli meyvelerden elde edilen izolatinin aşı ile taşınma etkinliği konusunda da hiçbir araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışma ile ülkemizde kayıslardan elde edilen bir EÇS fitoplazma izolatinin aşı ve kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece hastalığın doğal koşullarda vektörler dışında taşınma ve yayılma durumu hakkında elde edilecek verilerden yararlanılarak hastalığın kontrolüne yönelik önemli bulgular elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Geçtiğimiz son 25 yıla kadar fitoplazmaların sınıflandırılması ve birbirinden ayırt edilmesi, enfekteli bitkilerde oluşturdukları semptomlara, bitki ve böcek konukçularının spesifikliğı gibi biyolojik özelliklerine dayanılarak yapılyordu. Biyolojik özelliklerinin belirlenmesi uzun zaman almakta ve iş gücü gerektirmekte bazen de güvenilir olmamaktaydı (Lee ve ark. 1998). Moleküler yöntemlere dayalı analizler son yıllarda giderek artarak fitoplazmaların teşhisinde ve sınıflandırılmasında daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlamıştır.

Elma ağaçları EÇSF'nin ana konukçusudur, elma çeşitlerinin hastalığa reaksiyonları farklı olmakla birlikte fidanlar daha hassastır. EÇSF şimdiye kadar sadece Avrupa'da son zamanlarda da Türkiye'de tespit edilmiştir. Hindistan ve Güney Afrika'dan onaylanmamış kayıtlar mevcuttur.

EÇSF'nin kök kaynaşmaları ile yayıldığı bilinmektedir, ancak diğer doğal yayılma yolları tam olarak aydınlanmamıştır. Yaprak pireleri bu hastalığın vektörü olarak bildirilmiştir (Seemüller, 1990). Polen ve tohumla taşınmazlar. Hastalık etmeni kök bölgesinde yoğunlaşabildiğı gibi Nisan-Mayıs aylarında gövdeye yayılmakta, yaz sonu sonbahar başında gövdede en yüksek seviyeye ulaşmaktadır (Seemüller ve ark., 1984). Hastalanan ağaçlar küllemeye karşı hassastır. Etkilenen ağaçlar zayıf düşmekte, sürgünler zayıf olmakta ve kabukta bazen uzunlamasına kırmızımsı kahve yivler

oluşmaktadır. Hastalanan ağaçlar ölebilir, ancak zayıf enfeksiyonlarda enfeksiyonu takiben 2-3 yılda şok belirtiler geliştikten sonra iyileşebilir, iyi budandığı takdirde normal meyve verebilir.

Hastalık etmeni *Candidatus Phytoplasma mali* doğada vektörlerle aktif olarak yayılmaktadır. Hastalığın bilinen etkin vektörleri *Cacopsylla picta* ve *C. melanoneura*'dır (Jaraush ve ark. 2003). Bununla birlikte bu vektörlerin yayılışları, doğal enfeksiyon oranları ve etmeni taşıma kapasiteleri coğrafik bölgelere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda birçok bölgede her iki türün de bulunduğu ve en etkin vektörün *C. picta* olduğu bildirilmektedir (Jaraush ve ark. 2007b).

EÇSF'nin mevsimsel dağılımı Golden delicious elma çeşidinde DAPI boyama yöntemiyle araştırılmış ve en uygun saptama zamanı sonbahar ayları olarak belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1984). EÇSF'nin mevsimsel dağılım çalışmaları Trentino (İtalya'nın kuzeyi)'da da yapılmış ve fitoplazmanın bitkideki en yüksek yoğunluğu yazdan kışa kadar olan periyotta Ekim sonu Kasım başı gibi gözlemlenmiştir. En düşük yoğunluk ise ilkbahar boyunca 15 Nisan-15 Mayıs ayları arasında saptanmıştır (Bianchedi ve ark., 2005).

Balan ve ark., (1999) 1990-95 yılları arasında Romanya'da yürüttükleri bir çalışmada 67 kayısı çeşidi ve 48 familyaya ait 1831 kayısı hibridinin fitoplazma enfeksiyonuna karşı reaksiyonlarını incelemişlerdir. Fitoplazma belirtilerini 0-5 skalasına göre değerlendirmişler, örneklemeyi Mayıs-Haziran aylarında yapmışlar ve "0" değeri alan çeşitleri (hiçbir fitoplazma belirtisi göstermeyen) Kanada 600023, Harleyne, Dacia, Comandor, Litoral, Earlyril olarak bildirmişlerdir.

Bu fitoplazma floemde düşük konsantrasyonlarda bulunmuş ve bitkideki dağılımının düzensiz olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2000). Fitoplazmanın ağaçtaki dağılımı sıcaklıkla ilişkili bulunmuştur. Fransa'da yapılan bir çalışmada 21-25 °C deki ağaçların hepsinde fitoplazma belirtisi gözlenirken, 29-32 °C de belirtiler yok olduğu ve fitoplazmaların sadece köklerde bulunduğu bildirilmiştir (Ducrocquet ve ark., 1986). Hastalık yapay olarak inokule edildiğinde hastalık belirtileri ilk olarak inoküle edilmiş dallarda kendini göstermekte ve belirgin belirtiler ikinci yıldan sonra ortaya çıkmaktadır (Morvan ve Castelain, 1975). EÇSF'nin elmadan armuda aşısı ile taşınmasına yönelik bir tek kayıt bulunmaktadır ancak bu durum ardı ardına yapılan

deneylerle kanıtlanamamıştır. Ayrıca hastalık etmeni *Cuscuta* spp. kullanılarak enfekteli elma ağaçlarından *Catharantus roseus* test bitkisine taşınabilmiştir. Hastalık aşısı gözü dışında tohumla ya da polenle taşınmamaktadır. (Marwitz ve ark., 1974; Heintz, 1986). EÇSF hastalığının kök kaynaşması yolu ile de yayılabildiği bildirilmiştir (Ciccotti ve ark., 2008). *Cacopsylla melanoneura* ve *C. picta* EÇSF'nin İtalya ve Almanyadaki vektörleri olarak saptanmıştır (Tedeschi ve ark., 2002; Jarausch ve ark., 2003).

EÇSF önemli meyve yetiştiricilik bölgesi olan Trentino (Kuzey İtalya)'da 1990'lardan sonra şiddetli epidemi yapmıştır. Son zamanlarda böcek vektörleri de bulunan bu hastalığın yayılmasını kontrol etmek oldukça zordur (Frisinghelli ve ark., 2000; Tedeschi ve ark., 2002; Jarausch ve ark., 2003).

EÇSF'nin yabancı konukçusu olan alıç, hastalığın yayılmasında önemli bir rol oynar (Tedeschi ve ark., 2002). Alıç bitkilerinin EÇSF vektörlerinin hem konukçusu hem de inokulum kaynağı olduğu ispatlanmıştır.

EÇSF elmalar dışında fındık, armut ve Japon eriklerinde de saptanmıştır (Marccone ve ark., 1996). Bu konukçuların yanı sıra son yıllarda kayısı, kiraz ve diğer erik çeşitlerinde de bu fitoplazmanın önemli zararlara neden olduğu bildirilmiştir (Mehle ve ark., 2007).

2.2. Ülkemizde yapılan çalışmalar

Günümüze kadar ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazmaların saptanması konusundaki çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmış ve ilk simptomolojik bulgular Çağlayan ve Gazel (1999) tarafından bildirilmiştir.

Çağlayan ve ark. (2004), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2003-2004 yıllarında yaptıkları sörvey çalışmaları sonucunda toplam 174 sert çekirdekli meyve ağacından dört kayısının ESFY fitoplazması ile enfekteli olduğunu PCR-RFLP ile saptamışlardır. Bu çalışmada enfekteli bitkilerin üç adedi Doğu Akdeniz bölgesinde son yıllarda turfanda çeşit olarak yoğun olarak yetiştirilen Precoce de Tyrinthe çeşidinde, bir adedi ise ülkemizin en önemli sofralık çeşidi olan Sakıt çeşidinde saptanmıştır. Diğer taraftan, Adana, Hatay ve İçel illerinden toplanan toplam 21 kayısı, badem, şeftali ve erik ağacından dört tanesinin ESFY fitoplazması ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Sertkaya ve ark., 2005). Bu çalışmalarla ESFY fitoplazmasının ülkemizdeki bölgesel olarak varlığı ortaya konulmuştur.

Ülkemizde tüm bu tespit çalışmalarının dışında yapılan çalışmalar Doğu Akdeniz Bölgesinde yoğunlaşmıştır. Survey yapılan bölgelerde ESFY hastalığının vektörleri ve etmeni yayma potansiyelleri/dönemleri konusunda bir TÜBİTAK projesi yürütülmüş ve *Circulifer haematoceps*, *Empoasca* spp., *Exitianus capicola*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Phlepsius* sp, *Psammotettix procincialis*, *P. striatus*, *Orosius orientalis* ve *Zyginidia pullula* (Cicadellidae: Homoptera) türleri ile yapılan taşıma denemelerinde sadece *Empoasca* spp. (1/6), *Macrosteles quadripunctulatus* (1/8) ve *Psammotettix procincialis* (1/12) kullanılmış, PCR ve RFLP testlerinde bu örneklerde ESFY tespit edilmiştir (Sertkaya, 2005). Ancak dünyada bu hastalığın en etkili vektörü olarak bildirilen *Cacopsylla pruni*'nin ülkemizde hastalığı taşıdığına dair bir bulgunun olmaması hastalığın epidemiyolojisi ile ilgili soru işaretlerini yanıtsız bırakmaktadır.

Ülkemizde yaygın yetiştiriciliği yapılan kayısı çeşitlerinden Hacıhaliloğlu, Kabaası, Tokaloğlu, Şekerpare, Alkayısı ve Karacabey'e ESFY fitoplazması sera koşullarında yama aşısı ile inokule edilmiş ve yapılan gözlemler ve testler sonucunda Kabaası dışında tüm çeşitlerde inokulasyon gerçekleşmiş ve inokule olan bitkiler bir yıl sonra ölmüştür (Ulubaş Serçe ve ark., 2007). Küçük bir kapsamda yapılan bu ön çalışmanın dışında ülkemizde yoğun olarak yetiştirilen kayısı çeşitlerinin ESFY fitoplazmasına karşı hassasiyetleri konusunda bilgiler bulunmamaktadır.

Sert çekirdekli meyve ağaçlarında tüm Avrupa'da önemli bir sorun olan Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması (*Candidatus* Phytoplasma prunorum; *European stone fruit yellows*; ESFY) ülkemizin bir çok bölgesindeki gen kaynaklarında % 54.8, ticari bahçelerde ise %3.2 oranında saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 1999, 2004; Sertkaya ve ark., 2005; Ulubaş ve ark., 2006).

Antalya, Gaziantep, Isparta, İçel ve Yalova illerindeki gen kaynaklarından alınan Çağrıbey, Şekerpare, Sakıt, Canino, Kecskemet Rosa, Levent ve Aprikoz kayısı örnekleri ile Obilnaja, October Sun, Globe Sun, Original Sun, TC Sun, Queen Rosa, Autumn Giant erik örneklerinde ESFY fitoplazması tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2006). Son yıllarda Malatya ili Battalgazi ilçesindeki kayısılarda kuruma şikayetlerinin gelmesi nedeniyle buradaki kayısı ağaçları fitoplazma açısından PCR ile test edilmiş ve bir kayısı örneğinde ve Elazığ / Baskil'de de iki örnekte de ESFY saptanmıştır (Ulubaş Serçe ve ark. yayınlanmamış veri, 2008).

Mersin’de 2007-2009 yılları arasında yürütülen bu çalışmada Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) Müdürlüğü’ nün damızlık kayısı parselinde bulunan çeşitler ile Mut yöresinde yetiştirilen bazı kayısı çeşitlerinin Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması (ASSF) *Candidatus* Phytoplasma prunorum ile bulaşma oranlarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFUP) yöntemi ile 112 örnekte yapılan testlemelerde gerek simptomlu gerekse simptomsuz bitkilerde ASSF ile bulaşıklık oranı % 8.035 olarak belirlenmiştir. Arazi çalışmaları ASSF’nin tipik belirtileri olan yapraklardaki kıvrılmalar sadece Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü’nde bulunan 1 örnekte gözlenmiştir (Altan, 2009).

Ülkemizde elma yetiştiriciliği son derece önemli olmasına karşın elmaların virüs ve aşı ile taşınabilen diğer hastalıklar açısından durumu son yıllarda araştırılmaya başlanmış ve fitoplazma hastalıkları konusunda da son derece sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır. Bu konuda yoğunlukla simptomoloji ve indekslemeye dayanan bazı çalışmalar yapılmıştır.

Özkan ve Kurçman (1976), Orta Anadolu Bölgesi’nde elma bahçelerinde yaptığı gözlemlerde Green crinkle, Star crack ve Dapple apple virüs hastalıklarının ve EÇSF hastalığının belirtilerini bulmuştur.

Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yürütülen bir çalışmada damızlık bloklar ve bazı ticari bahçeler önemli elma virüslerine karşı RT-PZR yöntemiyle testlenmiş ve Elma mozaik virüsü yanında latent virüslerden Elma klorotik yaprak leke, Elma gövde yivlenme ve Elma gövde çukurlaşma virüsü açısından önemli ölçüde bulaşıklık tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2005).

Son yıllarda ise Isparta, Ankara ve Yalova’dan toplanan simptom gösteren ve göstermeyen 201 örneğin sekiz tanesinde gerek DAPI boyama gerekse PZR-RFUP yöntemleriyle EÇSF hastalığı saptanmıştır (Canik ve Ertunç, 2007).

Ülkemizde sert çekirdekli meyve türlerinde EÇSF ile ilgili yapılmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Fitoplazma kaynağı

Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümünün Araştırma Tel Serasında, tüm testlemeler ise aynı bölümün Viroloji laboratuvarında yapılmıştır. *Candidatus Phytoplasma mali* inokulumu olarak Mersin'in Mut ilçesindeki Precoce de Tyrinthe çeşidine ait bir bitki kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu bitki önceki çalışmalarla (Ulubaş Serçe ve ark. 2006) ASÇF ile enfekteli olarak saptanmış olmakla birlikte bu çalışma kapsamında da Haziran-Temmuz döneminde Nested-PZR ile testlenmiş ve EÇSF açısından pozitif bulunmuştur.



Şekil 3.1. Mersin-Mut'ta hem Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı (ASÇ) hem de Elma Çoklu Sürgün (EÇS) fitoplazmaları ile enfekteli kaynak bitkideki hastalık görünümü

3.1.2. EÇS fitoplazmasının aşıyla ve kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin araştırılması

EÇS fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi için ülkemizde kayısı için en yaygın kullanılan çöğür zerdali anaçları özel fidan üretim firmalarından

sağlanmıştır. Kök kaynaşması yoluyla taşıma denemelerinde ise ülkemizde yaygın yetişen çeşitlerden olan Hacıhaliloğlu ve Sakıt kayısı çeşitleri kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. EÇS fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin saptanması

Şekil 3.1’de görülen enfekteli ağaçtan alınan inokulumlar Temmuz 2009’da 50 zerdali anacı üzerine durgun göz aşısı yöntemi ile (Şekil 3.2), Mart 2010 döneminde ise yine 50 anaca sürgün göz aşısı yöntemi ile aşılanmıştır. Ayrıca kontrol olarak EÇSF içermediği moleküler testlerle saptanan sağlıklı ağaçtan alınan gözler, 10’ar anaca aşılanmış ve aşılanan tüm bitkiler böcek girişlerinin engellendiği tel seralara taşınmıştır (Şekil 3.3). Bu bitkilerde periyodik olarak simptomolojik gözlemler yapılmış ve modifiye edilmiş 0-3 skalasına göre değerlendirilmiştir: 0: Simptom yok, 1: Yapraklarda hafif renk değişimi, 2: Yapraklarda şiddetli renk değişimi, yaprak dökümü ve çiçeklenme anormallikleri 3: bitkinin gücünün azalması ve geriye ölüm (Seemüller ve ark., 2008, Jarausch ve ark., 2000). Ayrıca inokulasyondan sonra aşılanan tüm bitkiler 6 aylık dönemler halinde Nested-PZR tekniği ile testlenmiştir.



Şekil 3.2. Temmuz- 2009 döneminde EÇS fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile zerdali anaçlarına yapılan aşılama çalışması.



Şekil 3.3. Temmuz- 2009 döneminde EÇS fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile aşılanan zerdali anaçlarının genel görünümü.

3.2.2. Kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğinin saptanması

Ülkemizde yaygın yetişen çeşitlerden olan Hacıhaliloğlu ve Sakıt fidanlarına kök budaması yapıldıktan sonra her bir çeşide ait fidanlar ikiye bölünmüş gruplar şeklinde 15 litrelik saksılara kök teması sağlanacak şekilde yan yana dikilmiştir (Şekil 3.4). Aynı saksıya dikilmiş olan bu fidanlardan bir tanesine Mart ve Mayıs 2009’da iki kez aşı ve kabuk inokulasyonu yapılmış (Şekil 3.5), diğer fidana ise hiçbir işlem uygulanmamıştır. Her bir bitki çiftinin inokule edilmiş olanı “A”, edilmemiş olanı ise “B” olarak işaretlenmiştir. Her bir çeşitten iki bitki kontrol olarak ayrılmıştır. Bu bitkilerde yukarıda verilen skalaya göre simptom gelişmesi gözlenmiş ve periyodik olarak her ay Nested-PZR tekniği ile testlenmiştir. Testlemede mevsime uygun olarak yaprak, sürgün, çiçek ve kök parçaları kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Şubat 2009 da saksıya alınan kayısı fidanlarından sağdaki (Sakıt) soldaki ise (Hacıhaliloğlu) çeşitleri



Şekil 3.5. Mart ve Mayıs 2009'da saksıdaki fidanlardan birine yapılan aşı ve kabuk inokulasyonundan genel bir görüntü

3.2.3.Moleküler Testler

3.2.3.1 Nükleik Asit Ekstraksiyonu

- 1- DNA izalasyonu için 0.1 g yaprağın orta damarı (kurutulmuş örnekten 0.04 g) alınır ve sıvı azotla ezilir. 1ml % 2'lik CTAB üzerine 2-mercaptoetanol ilave edilir ve 2 ml'lik Eppendorf tüplere konulmuştur.
- 2- Örnekler 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 3- Karışım 15000 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra üst fazdan 750 µl alınır ve üzerine 750 µl fenol: chloroform: isoamlyalkol (25:24:1) eklenerek 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4- Bu işlem tekrar edilmiştir.
- 5- Üst fazdan 700 µl alınır ve üzerine 700 µl chloroform: isoamlyalkol eklenir. 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 6- 500 µl üst fazdan alınır ve üzerine 800 µl izopropanol eklenerek -20 °C de 2 saat bekletilerek DNA çöktürülmesi sağlanmıştır.
- 7- -20 °C'den çıkarılan tüpler 15000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilir sonra pellete dikkat edilerek sıvı faz uzaklaştırılır. 1 ml %70'lik soğuk alkol eklenir ve pelletin yerinden oynamamasına dikkat edilerek tüpler yavaşça alt üst edilip alkol dökülür. Kısa bir santrifüj' den sonra kalan sıvı pipetle alınmıştır.
- 8- Dipte kalan çökelti 37 °C de 20-30 dakika etüvde bekletilmiştir.
- 9- Tüplere 80-100 µl te buffer eklenir. TE tampon çözeltide çözündürülüp PCR çalışmaları yapılncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Testleri:

Polymerase chain reaction (PCR) işlemi iki aşamada yapılmıştır. Bunlar direkt-PCR ve Nested-PCR'dir. Direkt-PCR'da 1800 bp ürün veren P1 ve P7 primerleri, Nested-PCR'de ise 1050 bp ürün veren F01 ve R01 primer çiftleri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizleri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.1. Direkt ve Nested PZR analizlerinde kullanılan universal ve Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı (EÇSF) grubu fitoplazmaları için spesifik primer baz dizileri

Çoğalan DNA Primerler		Baz Dizilimi
uzunluğu (bp)	(Evrensel)	
Direkt PCR	1800	P1 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A- 3' (Deng ve Hiruki, 1991)
		P7 5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT- 3' (Smart ve ark., 1996)
Nested PCR	1050	F01 5' CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT 3' (Lee ve ark., 1995)
		R01 5' AAG TGC CCAACT AAA TGA T 3' (Lee ve ark., 1995)

İzole edilen DNA'ların PCR işlemi iki aşamada (direkt- ve nested-PZR) gerçekleşmiştir (Lee ve ark. 1992). Direkt-PZR aşamasında nükleik asitler 1/ 50 sulandırılarak 1µl DNA 50 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH: 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 2 ünit *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. Direkt-PZR döngüsü; 94 °C'de iki dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 57 °C'de iki dakika ve 72 °C'de üç dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72 °C'de 10 dakikadan oluşmuştur. Direkt-PZR'dan sonra uygulanan Nested-PZR da F01 ve R01 primerleri kullanılmıştır. Yukarıda açıklanan reaksiyon karışımına 1/50 oranında sulandırılmış Direkt-PCR ürünlerinden 1 µl eklenmiştir. Nested-PCR programı, direkt-PCR ile aynı olmakla birlikte 35 döngülük kısımda denatürasyon 94 °C'de 30 saniye ve primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklığı 55 °C'de 30 saniye uygulanmıştır. PCR ürünlerinin % 1.5 agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra ethidium bromide ile boyanacak ve sonuçlar UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır (Lee ve ark., 1992).

PZR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla reaksiyondan sonra ürünler % 1.2 agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez 1XTAE ortamında gerçekleştirilmiş ve aynı ortam jelin hazırlanmamasında da kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme ortamı (6X; 15ml için 150 mg bromophenol blue, 18 g gliserol, 6ml 50XTAE)

ile birlikte 12 µl yüklenen PZR ürünleri, 120 V’ da 35 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1mg/ µl EtBr içeren 0.5XTAE ortamında 3-5 dakika boyanmıştır (Ek.2). Daha sonra UV altında sonuçlar gözlenerek fotoğrafları çekilmiştir (Lee ve ark., 1992).

3.2.3.3. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Analizi

F01/ R01 primerleriyle elde edilen Nested PZR ürünlerinin RFUP analizi RsaI, SspI, Bmfl ve BsaAI(Ppu21I) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla 10 µl Nested PZR ürünü 0.5 µl enzim, 1.5 µl enzim tamponu, 3 µl d2H2O, BsaAI(Ppu21I) enzimi için 30°C’de 2-3 saat, RsaI, SspI, Bmfl enzimleri için ise 37°C’de 2-3 saat bekletildikten sonra elde edilen ürünler % 2’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Enzim kesimi sonucu pozitif kontrollerden EÇSF ile aynı band profili oluşturan örnekler EÇSF ile enfekteli kabul edilmiştir (Lee ve ark, 1998).

3.2.3.4. DNA dizileme

Nested PZR ile çoğaltılan ve beklenen seviyede bant oluşturan EÇSF izolatlarının DNA fragmentlerinin baz dizileri tayin edilmek üzere DNA dizileme yapan firmaya (İontek/İstanbul) gönderilmiştir. İontek firmasına gönderilen baz dizileri arasında Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak benzer bölgeler bulunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada kayıslarda önemli bir sorun olan Elma Çoklu Sürgün (Apple Proliferation=AP) fitoplazma hastalığının enfekteli aşı gözü kullanımı ile hangi oranda taşınabildiği ve özellikle fidanlıklarda önemli olan kök kaynaşması yoluyla taşınıp taşınmadığı araştırılmıştır.

4.1. Aşı gözü ile taşınma etkinliğinin saptanması

EÇS fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliklerinin belirlenmesi için 50 adet zerdali anacına Temmuz 2009’da yapılan durgun göz aşılardan tutmayanlara Mart 2010 döneminde tekrar “sürgün göz aşıları” yapılmıştır. Her iki dönemde aşılanan

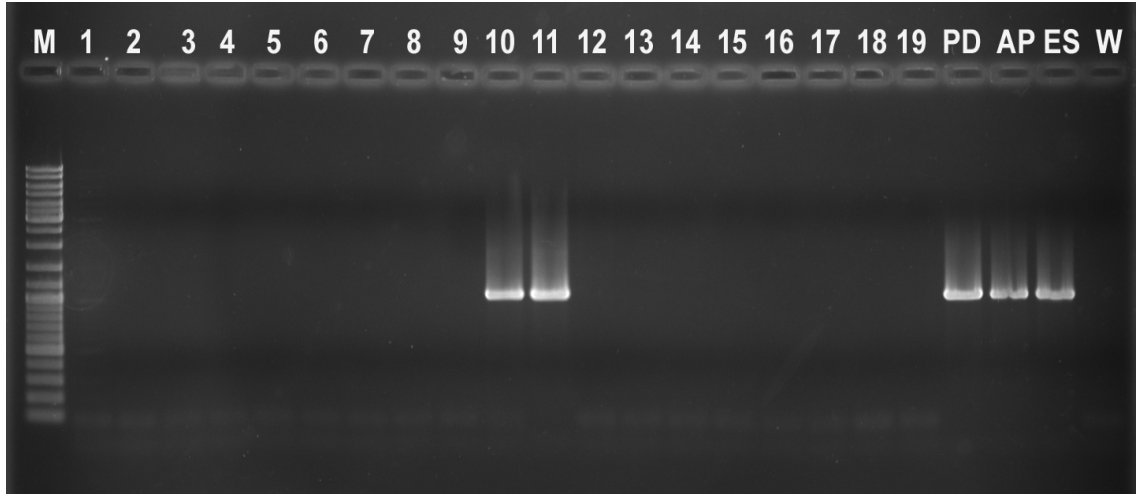
bitkilerden çıkan sürgünlerde kontrol bitkilerine göre daha zayıf bir gelişme saptanmış ancak tipik fitoplazma belirtileri gözlenmemiştir (Şekil 4.1- A, B).



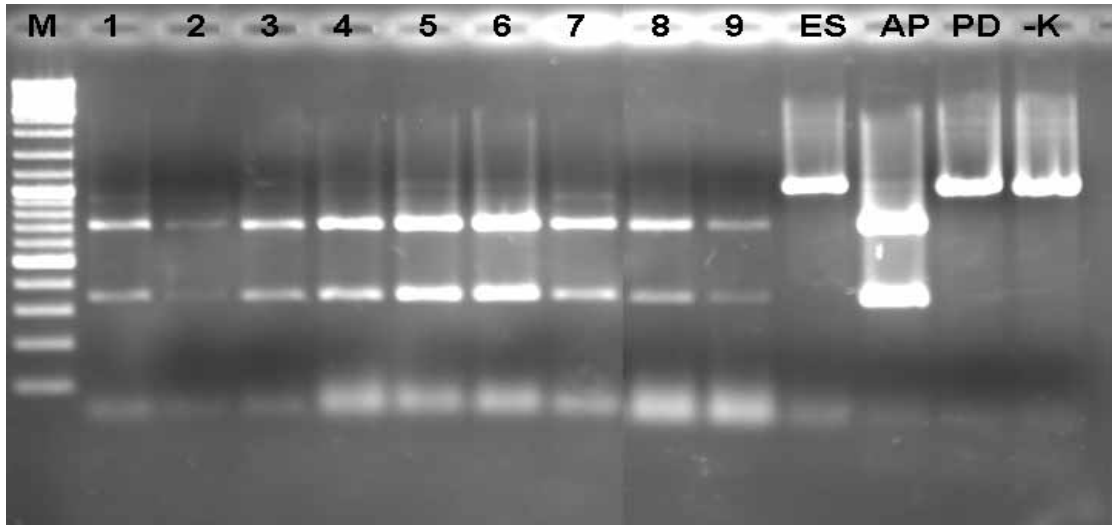
Şekil 4.1. A: Zerdali anacı üzerine aşılı enfekteli kayısı sürgünlerinde görülen zayıf gelişme belirtileri. B: Sağlıklı kontrol (kayısı).

Bu bitkiler periyodik olarak kontrol edilmiş 2009 Temmuz ayında yapılan ilk aşılamalardan 50 bitkiden 47 tanesi tutmuş ve bunların 24 tanesi sürmüştür. 2010 Mart ayında yapılan aşılamalardan ise 47 aşı tutmuş ve bunların 18 tanesi sürmüştür. Aşılanan tüm bitkiler (sürenler ve sürmeyenler) altı aylık periyotlarla nested PZR analizleri ile testlenmiştir. Bu testlemeler sonucunda sadece Kasım 2010 döneminde pozitif sonuç alınmıştır. Bu dönemde yapılan testlemelerde Temmuz 2009 döneminde yapılan aşılamalardan üç bitki (enfeksiyon oranı % 6.8), Mart 2010 döneminde aşılanan bitkilerden ise altı bitki (enfeksiyon oranı % 12.76 pozitif bulunmuştur (Şekil 4.2)

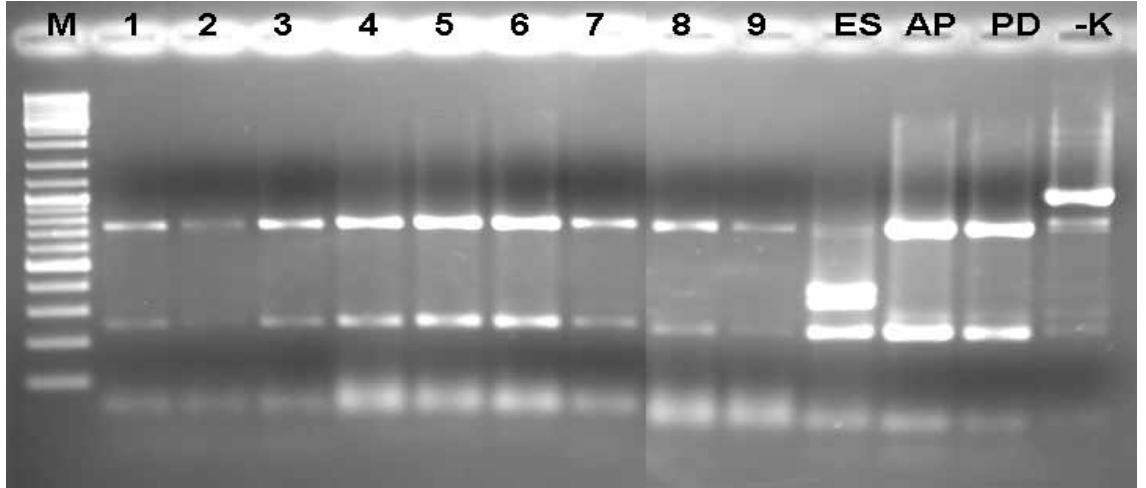
F01/ RO1 primer çifti kullanılarak yapılan Nested-PZR ürünlerinin RsaI, SspI, Bmfl ve Bsa1(Ppu21I) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan RFUP analizi sonucu elde edilen jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



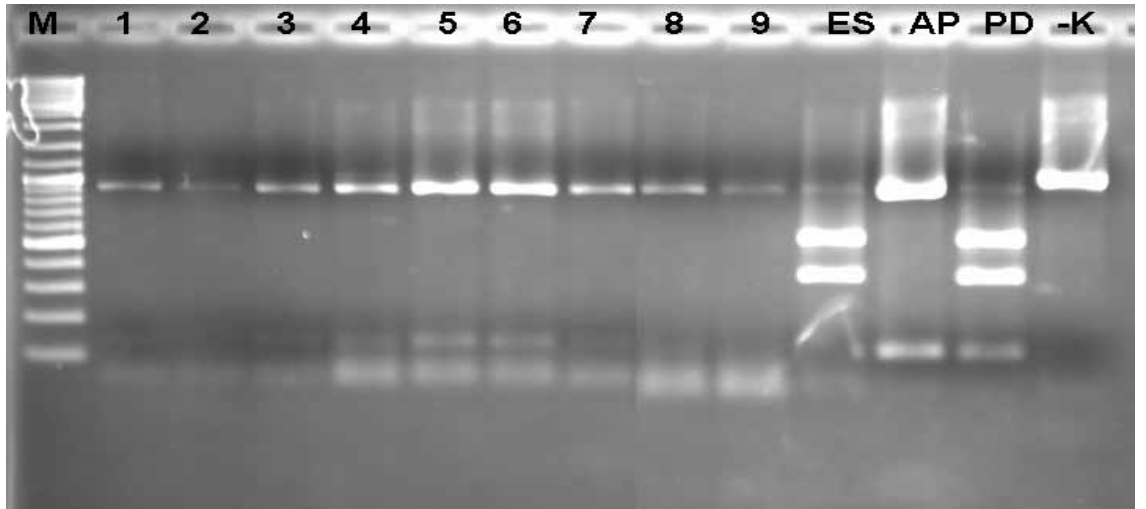
Şekil 4.2. Aşı ile taşınma için (26 ve 27) alınan kayısı örneklerinin F01/R01 primerleri ile yapılan Nested PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), W: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)



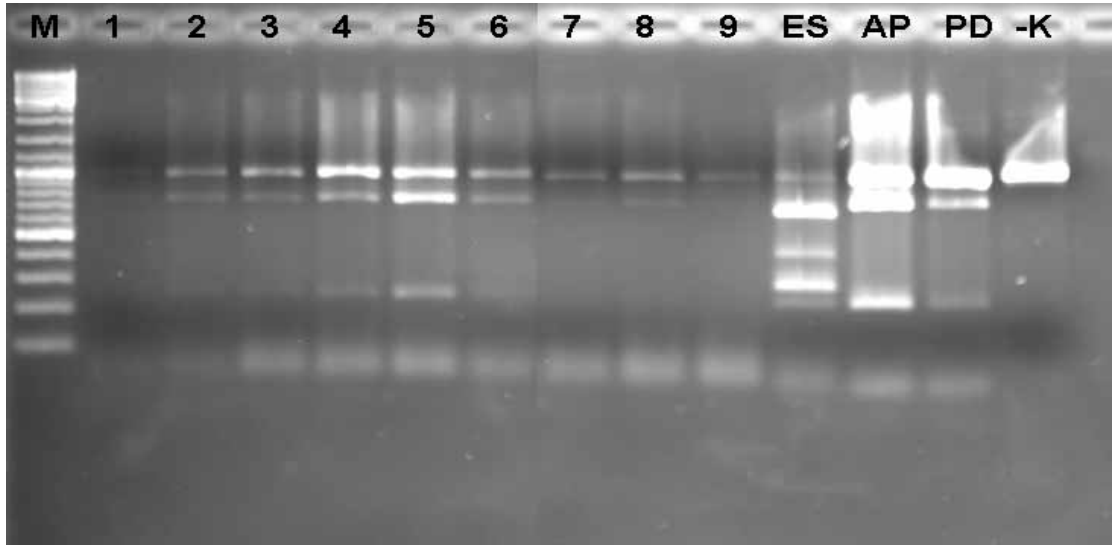
Şekil 4.3. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88)örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. . M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması).



Şekil 4.4. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)



Şekil 4.5. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BfmI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)



Şekil 4.6. Aşı ile taşınma (26, 27, 36, 61, 69, 82, 83, 84, 88) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ppu21I* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -K: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

PZR pozitif bulunan bitkilerin hiç birisinde tipik fitoplazma belirtileri gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, EÇS fitoplazmasının ilk aşılama sonrası yaklaşık bir yıl sonra PZR analizleri ile saptanabileceğini göstermiştir. Ayrıca ilk yıl alınan sonuçlara göre enfekteli aşı gözü kullanımının hastalığın taşınmasında etkili olduğu (% 9.78) ve bu oranın ileriki yıllarda artma olasılığı da göz önüne alındığında daha tehlikeli tabloloların ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. EÇS fitoplazmasının aşı gözü ile taşınma etkinliklerinin saptanmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak bu fitoplazmanın elmalarda farklı aşı yöntemleriyle taşınma etkinliğinin saptanmasına yönelik yürütülen bir çalışmada en etkili aşı yönteminin dil ve kabuk aşısı olduğu (% 100 taşınma) , göz aşısı yöntemi ile de % 55 oranında bir taşınmanın mümkün olduğu gösterilmiştir (Aldaghe ve ark., 2007). Fitoplazmaların odunsu bitkiler içinde konsantrasyonu düşük olduğu ve düzensiz dağıldıkları için enfeksiyondan sonraki ilk yıllarda moleküler testlerle dahi saptanmaları oldukça zordur (Berges ve ark., 2000). Bu çalışma kapsamında aşı ile taşıma yapılan bitkilerde ilk yıl elde edilen sonuçlar düşük

olmakla birlikte önemlidir ve bu bitkilerde gözlemlerin ve periyodik PZR testlemelerinin en az bir yıl daha yapılması gerekmektedir.

4.2. Kök kaynaşması yoluyla taşınma oranları

4.2.1. Simptomolojik Gözlemler

EÇS fitoplazmasının kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliklerinin belirlenmesi için simptomolojik gözlemler yapılmış ve 0-3 skalasına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 2009-Mart ayında inokulasyon yapılmış olan bitkilerde 2010 yılının Mart ayında Sakıt çeşidinde normal çiçeklenme görülürken, Hacıhaliloğlu çeşidinde çiçeklenme olmaksızın doğrudan yaprak oluşumu gözlenmiştir. Çiçeklenme olan Sakıt çeşidinde ise meyve tutumu gözlenmemiştir. Bu durumun fitoplazma enfeksiyonu ile ilişkisi PZR testleriyle de doğrulanmıştır.

Temmuz ortalarına gelindiğinde Hacıhaliloğlu çeşidinde yapraklarda kıvrılma ve sararma gözlemlenmiş daha sonra bu yapraklarda erken dökülmeler başlamıştır. Hiçbir bitkide ölüm görülmemiştir.

Çizelge 4.1. Hacıhaliloğlu ve Sakıt çeşitlerinde Simptomolojik Gözlemler (0-3 Skalasına göre) 0: Simptom yok, 1: Yapraklarda hafif renk değişimi, 2: Yapraklarda şiddetli renk değişimi, yaprak dökümü ve çiçeklenme anormallikleri 3: bitkinin gücünün azalması ve geriye ölüm.

Bitki sayısı	Hacıhaliloğlu		Sakıt	
	İnokulum verilen	İnokulum verilmeyen	İnokulum verilen	İnokulum verilmeyen
1	2	2	2	1
2	2	2	2	2
3	2	2	2	2
4	2	2	2	2
5	2	1	2	2
6	2	1	2	2
7	1	2	2	1
8	2	1	1	2
9	2	2	1	2
10	2	2	1	1
11	2	2	0	0
12	2	2	1	2
13	2	2	1	1
14	2	2	0	0
15	2	2	0	0

4.2.2. Kök kaynaşmasının mikroskopik incelenmesi

Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemelerinde kullanılan tüm bitkiler Kasım 2010 da PZR yöntemi ile testlenmiş ve bu bitkilerden en kuvvetli pozitif sonuç veren 13 nolu Hacıhaliloğlu ve 2 nolu Sakıt bitkileri sökülüştür (Şekil 4.7), (Şekil 4.8). Bu bitkilerde kök kaynaşması olup olmadığı hem görsel hem de mikroskopik incelemelerle değerlendirilmiştir. Mikroskopik incelemeler Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesinden Prof. Dr. Ziya GERÇEK ve Doç. Dr. Bedri SERDAR tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.7. Kök kaynaşması kontrolü amacıyla sökülen bitkilerin genel durumu.



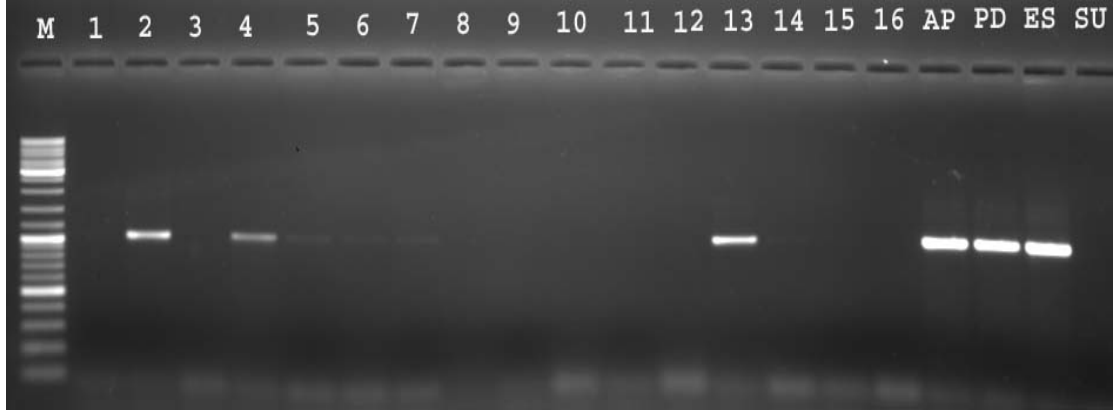
Şekil 4.8. Kök kaynaşma gözlemleri için sökülen Hacıhaliloğlu çeşidinin kök bölgesinin genel görünümü (solda). Mikroskobik inceleme için gönderilen ve kaynaşma olasılığı olan köklerin görünümü (sağda).

Gerek görsel gerekse mikroskopik incelemeler sonucunda inokule edilen ve edilmeyen bitkilerin kökleri arasında henüz bir nodül oluşumuna rastlanmamıştır. Elmalarda EÇS fitoplazmasının kök kaynaşması yolu ile taşınmasına yönelik yürütülen bir çalışmada kök kaynaşmasının dikimden dört yıl sonra gerçekleştiği ve patojenin bu yolla taşınabildiği gösterilmiştir (Bliefernicht ve Krczal, 1995). Bu çalışma iki yıllık bir denemenin sonucu olduğu için kök kaynaşmasının olmaması sürenin kısa olması nedeniyle olabilir. Ayrıca sert çekirdekli meyvelerde bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığı için mevcut sonuçların doğrudan kıyaslanma olanağı bulunamamıştır.

4.2.3. PZR Analizleri

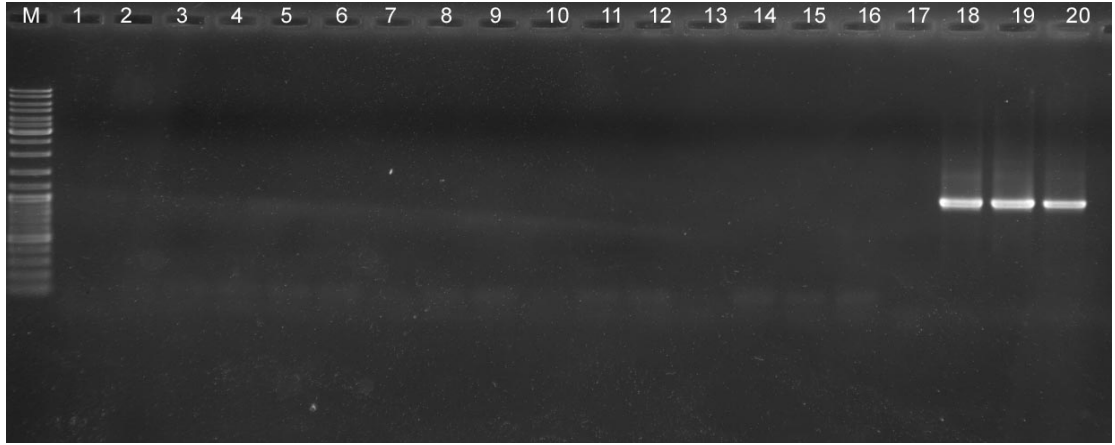
Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemelerinde kullanılan tüm bitkiler inokule edilmeden önce PZR yöntemi ile testlenmiş ve tüm bitkiler negatif bulunmuştur. İlk inokulasyon tarihinden (Mart 2009) üç ay sonra testlemelere başlanmış ve Haziran 2009'da yapılan testlemelerde 1-A nolu Hacıhaliloğlu örneğinin sadece yapraklarından pozitif sonuç alınmıştır (Çizelge 4.2). Haziran ve Temmuz aylarında yapılan PZR testlerinde sadece yaprak dokuları kullanılmış, kök ve sürgün örnekleri ise Ağustos ayından itibaren testlenmiştir. Temmuz ayında 7-A nolu Sakıt örneği ile 2-A ve 5-A nolu Hacıhaliloğlu örnekleri pozitif bulunmuştur.

Ağustos ayında yapılan testlemelerde 2-A, 4-A, 5-A, 6-A, 7-A,13-A nolu Sakıt örnekleri ile 11-A nolu Hacıhaliloğlu örneği pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan inokulumlu bitkilerin kök kısımlarından örnek alınmış ve bunlardan 2-A ve 13-A nolu Sakıt örneği ile 11-A nolu Hacıhaliloğlu örneği pozitif bulunmuştur. Bunun yanısıra inokulum verilmeyen bitkilerin yaprakları testlendiğinde 2-B nolu Sakıt örneği, kök kısımları testlendiğinde ise 2-B,4-B,5-B,6-B,7-B,13-B nolu sakıt örnekleri ile 11-B nolu Hacıhaliloğlu örnekleri pozitif bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Kök kaynaşması (Sakit 2A, 4A, 5A, 6A, 7A ve 13A) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen Ağustos ayı PZR sonuçları. M: DNA markırı (MBI Fermentas), Su: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Eylül ayında Sakıt çeşidinde 1-A, 2-A, 4-A, 5-A, 6-A ve 9-A nolu bitkilerle Hacıhaliloğlu 7-A, 9-A, 10-A, 12-A, 13-A, 14-A nolu bitkileri pozitif bulunmuş ve ayrıca inokulum verilmeyen bitkilerin kök kısımları da testlenmiş Sakıtta 1-B, 2-B, 3-B, 7-B Hacıhaliloğlunda 3-B, 8-B, 14-B, 15-B nolu örnekler pozitif bulunmuştur. Eylül ayı testlemelerinde görülüyor ki inokulum verilen bitkilerde negatif sonuçlar verirken inokulum verilmeyen bitkilerde pozitif sonuçlar vermesi fidanların virüs ve benzeri etmenlerden arı olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Fitoplazmaların bitki içindeki ve mevsimsel dağılımı düzensiz olduğu için teşhislerinde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Bu yüzden sertifikasyon programlarına daha fazla önem verilmelidir. Ekim ayında testlenen örneklerin hiçbirisinden pozitif sonuç alınamamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kök kaynaşması örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen Ekim ayı PZR sonuçları. M: DNA markırı (MBI Fermentas), Su: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

Kasım ayında yapılan testlemelerde 4-A, 5-A,10-A nolu Sakıt örnekleri ile 1-A, 2-A, 3-A, 4-A, 5-A, 6-A, 7-A, 8-A, 9-A, 10-A, 11-A, 12-A, 13-A, 14-A, 15-A nolu Hacıhaliloğlu örnekleri pozitif bulunmuştur. Bunun yanısıra inokulum verilmeyen Sakıt çeşitleri testlendiğinde 1-B, 2-B, 3-B, 4-B, 5-B, 6-B, 7-B, 8-B, 9-B, 12-B, 13-B nolu örnekleri ile 1-B, 2-B, 4-B nolu Hacıhaliloğlu örnekleri pozitif bulunmuştur.

Aralık ayında ise inokulum verilen Sakıt çeşidinde hiçbir bitki pozitif bulunmazken sadece Hacıhaliloğlu çeşidinde 1-A nolu örnek pozitif sonuç vermiştir. İnokulum verilmeyen Sakıt çeşidinde ise 9-B, 10-B nolu örnekler ile Hacıhaliloğlunda 1-B, 4-B, 5-B, 6-B, 7-B, 15-B nolu örnekler pozitif bulunmuştur.

Ocak 2010 da ise inokulum verilen Sakıt çeşidinde 13-A nolu örnek ile inokulum verilmeyen Hacıhaliloğlunda 14-B nolu örnek pozitif bulunmuştur.

Şubat ve Mart aylarında hiçbir örnek pozitif bulunamamıştır.

Nisan ayında da inokulum verilmeyen 14-B, 15-B nolu Hacıhaliloğlu fidanları enfekteli bulunmuştur.

Mayıs 2010 da testlenen örneklerin tamamı negatif bulunmuştur. Kasım 2010'daki testlemelerde Sakıt çeşidinde inokulum verilen ve verilmeyen hiçbir örnek pozitif bulunmazken inokulum verilen Hacıhaliloğlu 3-A, 10-A, 13-A, 14-A, 15-A nolu örneklerle inokulum verilmeyen 8-B, 9-B ve 13-B nolu örnekler pozitif bulunmuştur.

Bu sonuçlar inokulum verildikten 18 ay sonra Hacıhaliloğlu çeşidinde tüm bitkilerin farklı aylarda ve organlarda EÇS fitoplazması ile enfekteli olduğunu ve kök kaynaşması yoluyla geçiş beklenen inokulumsuz bitkilerin ise 12 tanesinde enfeksiyon saptandığını (% 80 enfeksiyon) göstermiştir. Sakıt çeşidinde ise inokulum verilen 15 bitkiden 8 tanesinde enfeksiyon saptanmış (% 53.33), inokulum verilmeyen ve kök kaynaşması yoluyla geçiş beklenen bitkilerde ise % 80 oranında enfeksiyon saptanmıştır. Hacıhaliloğlu çeşidinde beklenen sonuçlar elde edilmesine karşın Sakıt çeşidinde inokulum verilmeyenlerde verilenlere göre daha yüksek enfeksiyon oranının saptanması, deneme bitkilerinin alındığı kaynaktan enfekteli gelmesi nedeniyle olabilir. Deneme başlangıcında yapılan testlemelerde bu bitkilerin tamamının negatif bulunması, fitoplazma konsantrasyonunun çok düşük olması ve deneme süresince yükselerek moleküler testlerle saptanabilecek düzeye gelmesi ile açıklanabilir.

Çizelge 4.2 Elma çoklu sürgün (Apple Proliferation=AP) fitoplazması' nın Farklı Kayısı Çeşitlerinde Kök Kaynaşması Yoluyla Taşınma Durumunun Aylık Nested-PZR Analiz Sonuçları

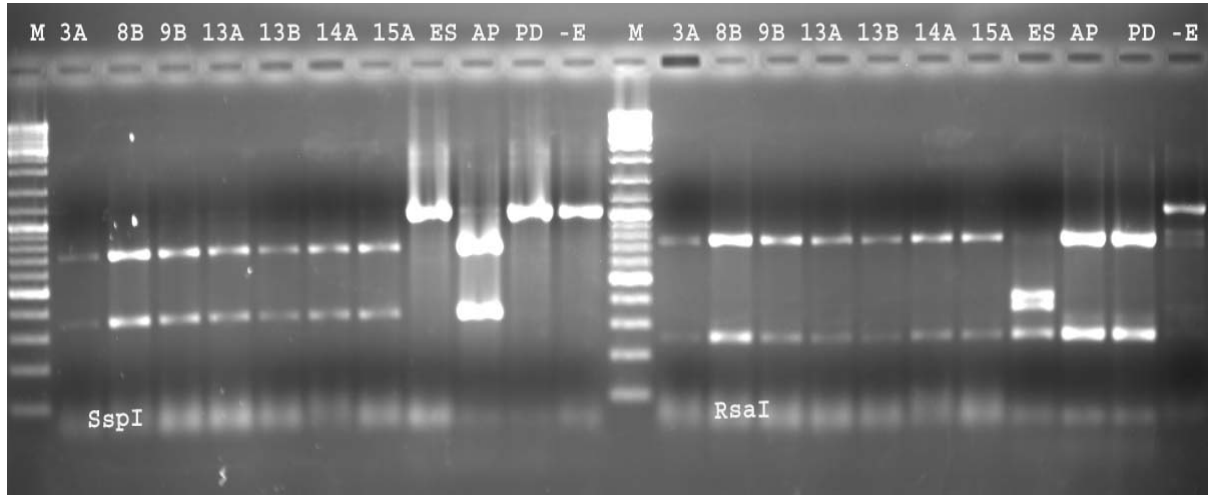
[illegible]

A: İnokule edilmiş bitki B: İnokule edilmemiş bitki Ö: Ölen bitki

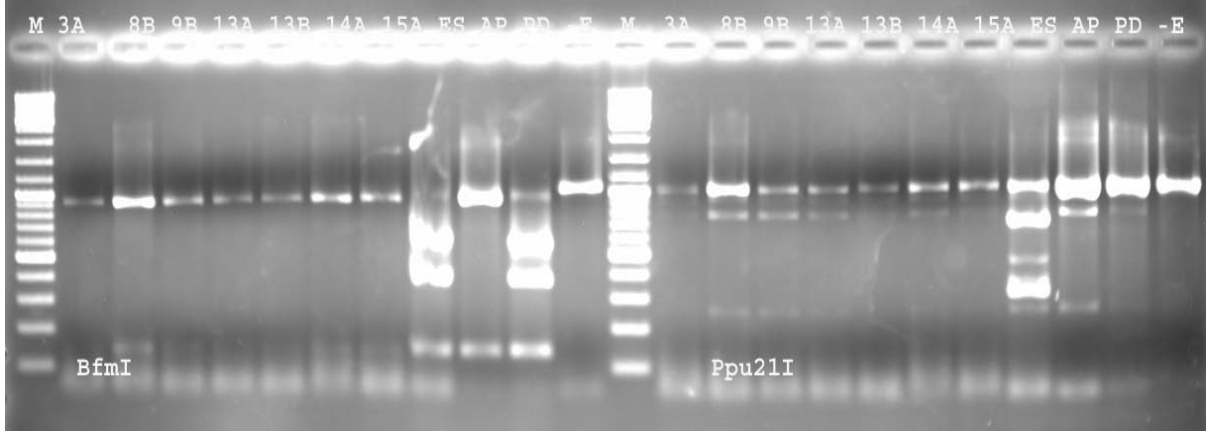
4.2. 4. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Analizi

Nested PZR sonucunda beklenen seviyede bant veren fitoplazma enfekteli örnekler ve pozitif kontroller restriksiyon endonükleaz enzimleri ile RFUP analizine tabi tutulmuştur.

F01/ RO1 primer çifti kullanılarak yapılan Nested-PZR ürünlerinin RsaI, SspI, BmfI ve BsaI(Ppu21I) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan RFUP analizi sonucu elde edilen jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12)



Şekil 4.11 Kök kaynaşması (3-A, 8-B, 9-B, 13-A, 13-B, 14-A ve 15-A) Hacihaliloğlu örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin SspI enzimi (sol) ve RsaI enzimi (sağ) ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)



Şekil 4.12. Kök kaynaşması (3-A, 8-B, 9-B, 13-A, 13-B, 14-A ve 15-A) Hacıhaliloğlu örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin BfmI enzimi (sol) ve (Ppu21I) enzimi (sağ) ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, Pozitif kontrollere: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması)

4.2.5. Sekans Analiz Sonuçlar

RFUP analizleri sonucu referans EÇSF ile aynı bant profili veren izolattan 2 tanesi DNA dizilemeleri yapılmak üzere firmaya gönderilmiştir. Firmadan gelen her bir izolatin nükleotid dizilimleri gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılmıştır. Buna 6 nolu Sakıt kayısı bitkisinden elde edilen EÇSF izolatu gen bankasında kayıtlı CU469464.1 izolatu ile %100 oranında (Şekil 4.13), 12 nolu Hacıhaliloğlu kayısı bitkisinden elde edilen EÇSF izolatu gen bankasında kayıtlı CU469464.1 izolatu ile %99 oranında (Şekil 4.14) benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

>emb|CU469464.1| Candidatus Phytoplasma mali strain AT complete chromosome
Length=601943

Score = 1755 bits (950), Expect = 0.0
Identities = 950/950 (100%), Gaps = 0/950 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	CGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAA	60
Sbjct	264271	CGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAA	264330
Query	61	ACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTAAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTG	120
Sbjct	264331	ACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTAAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTG	264390
Query	121	GTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC	180
Sbjct	264391	GTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC	264450
Query	181	ATTGGGATTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA	240
Sbjct	264451	ATTGGGATTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA	264510
Query	241	TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAATATTTAGGTATGTAAAGT	300
Sbjct	264511	TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAATATTTAGGTATGTAAAGT	264570
Query	301	TCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG	360
Sbjct	264571	TCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG	264630
Query	361	CCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT	420
Sbjct	264631	CCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT	264690
Query	421	TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCTT	480
Sbjct	264691	TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCTT	264750
Query	481	AACGTTGTGATGCTATGGAACGTTTGTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCA	540
Sbjct	264751	AACGTTGTGATGCTATGGAACGTTTGTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCA	264810
Query	541	TGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG	600
Sbjct	264811	TGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG	264870
Query	601	GGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGT	660
Sbjct	264871	GGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGT	264930
Query	661	AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACAGTGCTGAAGTTAACAC	720
Sbjct	264931	AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACAGTGCTGAAGTTAACAC	264990
Query	721	ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGA	780
Sbjct	264991	ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGA	265050
Query	781	CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTGGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGG	840
Sbjct	265051	CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTGGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGG	265110
Query	841	TCTTGACATACTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGT	900
Sbjct	265111	TCTTGACATACTTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGT	265170
Query	901	GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA	950
Sbjct	265171	GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA	265220

Şekil 4.13. Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemesinde 6 nolu Sakıt kayısı bitkisinden elde edilen EÇSF izolatının baz eşleşme sonuçları.

>[emb|CU469464.1](#) Candidatus Phytoplasma mali strain AT complete chromosome
Length=601943

Score = 1749 bits (947), Expect = 0.0
Identities = 949/950 (99%), Gaps = 0/950 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	CGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAA	60
Sbjct	264271	CGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAA	264330
Query	61	ACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTAAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTG	120
Sbjct	264331	ACTTTTAAAGACCCGCAAGGGTATGCTAAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTG	264390
Query	121	GTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC	180
Sbjct	264391	GTAAGGTAACGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC	264450
Query	181	ATTGGGATTGAGATACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA	240
Sbjct	264451	ATTGGGATTGAGATACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA	264510
Query	241	TGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAATATTTAGGTATGTAAAGT	300
Sbjct	264511	TGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAATATTTAGGTATGTAAAGT	264570
Query	301	TCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG	360
Sbjct	264571	TCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG	264630
Query	361	CCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGCAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT	420
Sbjct	264631	CCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT	264690
Query	421	TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCTT	480
Sbjct	264691	TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCTT	264750
Query	481	AACGTTGTGATGCTATGGAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCCA	540
Sbjct	264751	AACGTTGTGATGCTATGGAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGAATTCCA	264810
Query	541	TGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG	600
Sbjct	264811	TGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG	264870
Query	601	GGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	660
Sbjct	264871	GGTCTTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	264930
Query	661	AGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACAGTGCTGAAGTTAACAC	720
Sbjct	264931	AGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACAGTGCTGAAGTTAACAC	264990
Query	721	ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGA	780
Sbjct	264991	ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGA	265050
Query	781	CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTGGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGG	840
Sbjct	265051	CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTGGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGG	265110
Query	841	TCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGT	900
Sbjct	265111	TCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGT	265170
Query	901	GCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA	950
Sbjct	265171	GCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA	265220

Şekil 4.14. Kök kaynaşması yoluyla taşınma denemesinde 12 nolu Hacıhaliloğlu kayısı bitkisinden elde edilen EÇSF izolatının baz eşleşme sonuçları.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye Asya ve Avrupa kıtaları arasında bir köprü oluşturan ve meyvecilik kültürünün tarihin çok eski dönemlerine kadar dayanmakta olduğu bir ülkedir. Sahip olduğu ekolojik koşullardan dolayı kayısı, kiraz, erik, elma gibi birçok meyve türünün merkezidir. Sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazma hastalıkları verim kayıplarına ve meyve kalitesinde azalmalara neden olmaktadır. Özellikle yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli fitoplazma hastalıklarından olan Elma çoklu sürgün (EÇS) fitoplazması (*Candidatus Phytoplasma mali*) sert çekirdekli meyve ağaçlarında da simptom oluşturmakta ve bazı ticari çeşitlerde gözle görülebilir simptom oluşturmadığından sinsi yayılabilmektedir. Ülkemizde kaysılarda Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması (ASÇF) yaygın olarak saptanmış olup EÇSF'nin sert çekirdeklilerde varlığına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle kayısı yetiştiriciliği yapılan alanlarda fitoplazma hastalıklarının erken ve doğru teşhis edilebilmesi ekonomik kayıpların önlenmesi açısından son derece önemlidir. Fitoplazmaların bitki içindeki ve mevsimsel dağılımı düzensiz olduğu için teşhislerinde önemli sorunlar yaşanmaktadır.

Koşulların bu kadar elverişli olmasına rağmen yüksek verimli ve kaliteli meyve elde etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumun en önemli sebeplerinden birisi de virüs, fitoplazma ve diğer aşı ile taşınan patojen enfeksiyonlarıdır. Bu nedenlerden dolayı özellikle damızlık parsellerin ve koleksiyon bahçelerinin virüs ve fitoplazma hastalıkları açısından testlenmelerinde mutlak surette moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. En doğru ve hızlı teşhisi PZR- RFUP analizleri ile yapılmaktadır. Fitoplazmalar bitkide düşük konsantrasyonda dahi bulunduklarında bu teknikler sayesinde mevsimlere bağlı olmaksızın kolayca teşhis edilebilmektedir. Yapılacak olan erken ve doğru teşhis sonucu fitoplazma ile enfekteli alanlarda hastalığın sağlıklı bitkilere yayılması önlenecek ve ekonomik kayıplar azalacaktır.

Bu çalışma kapsamında önemli bir fitoplazma hastalığı olan EÇS'nin etmeni *Ca. Phytoplasma mali*'nin arazi koşullarında enfekteli bitkilerden alınan aşı gözleri kullanıldığında ne oranda taşımanın gerçekleştiği araştırılmıştır. PZR analizlerinde sadece Kasım 2010 döneminde testlenen bitkilerde pozitif sonuç alınmıştır. Buna göre aşılama yapılan bitkilerde toplam aşı ile taşıma oranı %12.76 olarak bulunmuştur. Bu oran oldukça yüksek olup fidan üretimlerinde sağlıklı aşı gözü kullanımının ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Kök kaynaşmasındaki sonuçlar inokulum verildikten 18 ay sonra Hacıhaliloğlu çeşidinde tüm bitkilerin farklı aylarda ve organlarda EÇS fitoplazması ile enfekteli olduğunu ve kök kaynaşması yoluyla geçiş beklenen inokulumsuz bitkilerin ise 12 tanesinde enfeksiyon saptandığını (%80 enfeksiyon) göstermiştir. Sakıt çeşidinde ise inokulum verilen 15 bitkiden 8 tanesinde enfeksiyon saptanmış (% 53.33), inokulum verilmeyen ve kök kaynaşması yoluyla geçiş beklenen bitkilerde ise % 80 oranında enfeksiyon saptanmıştır. Hacıhaliloğlu çeşidinde beklenen sonuçlar elde edilmesine karşın Sakıt çeşidinde inkolum verilmeyenlerde verilenlere göre daha yüksek enfeksiyon oranının saptanması, deneme bitkilerinin alındığı kaynaktan enfekteli gelebilme durumu ile açıklanabilir. Deneme başlangıcında yapılan testlemelerde bu bitkilerin tamamının negatif bulunması, fitoplazma konsantrasyonunun çok düşük olması ve deneme süresince yükselerek moleküler testlerle saptanabilecek düzeye gelmesi ile açıklanabilir.

Ayrıca hastalığı gerek kök kaynaşması gerekse vektör böceklerle etkin olarak taşınması nedeniyle sadece temiz fidan kullanımı da hastalık kontrolünde yeterli olmamaktadır. Bu nedenle dayanıklılık çalışmalarına da ağırlık verilmeli ve tüm önlemlerin birlikte kullanılmasına özen gösterilmelidir.

Ülkemizde kayısı yetiştiriciliğinde önemli rol üstlenen özellikle Malatya ili için tehlike arz eden kontrolsüz fidanın ithalatının yapılması, bakanlık kontrolündeki damızlık blokların ve fidan üretim merkezlerinin kontrollerinin düzenli yapılmaması, sertifikasyon programlarına önem verilmemesi, ilgili kurum ve kuruluşlar arasında yeterince bilgi alış verişi yapılmaması ve sağlıklı olmayan bitki materyallerinin kullanılması fitoplazma hastalığının yayılmasını daha uygun hale getirmektedir.

Kayısılarda sanitasyon ve sertifikasyon programlarının ülkemizde de acilen başlatılması ve bakanlık- üniversite işbirliği çerçevesinde yapılacak kontrollü üretim ile diğer virüs ve benzeri hastalıkların yanı sıra EÇSF'nin de yayılması engellenerek ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2005. TÜİK, Tarımla Yapı, Üretim, Fiyat, Değer.
- Balan, V., Ivascu, A., Toma, St. Solcan, Gh., Tatu, St., 1999. The reaction to phytoplasma infection of different apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. **Acta Hort.**, 488 765-768.
- Berges, R., Rott, M., and Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology**. 90: 1145-1152.
- Bianchedi, P.L., Cicotti, A.M., Pedrazzoli, F. and Zorer, R., 2005. Dinamica di colonizzazione stagionale del fitoplasma Apple Proliferation in relazione ad alcuni parametri fisiologici nelle piante. **Petria**, 15(1/2): 157-159.
- Bliefernicht, K. and Krezal, G. 1995. Epidemiological studies on apple proliferation disease in Southern Germany. **Acta Hort.** 386:444-447.
- Blumer, S.; Bovey, R., 1957 [On apple proliferation virus]. **Phytopathologische Zeitschrift** 30, 237-258.
- Bovey, R., 1963. Apple Proliferation . In: Virus diseases of apples and pears. **Technical Communication, Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops**. 30: 63-67.
- Bovey, R., 1972. Maladie des proliférations. In: La defense des plantes cultivees (Ed. By Bovey, R., et. al.) (**6th edition**), 227-231. Payot, Switzerland.
- Canik, D., Ertunç, F., 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. **Bulletin of Insectology**. 60 (2), 335-336.
- Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Baragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F. and Mattedi, M., 2008. Natural and experimental transmission of Candidatus Phytoplasma mali by root bridges. **Acta Hort.**, 781: 459-464.
- Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., Gazel, M., Jelkmann, W. 2005. First report of identification of apple viruses in Turkey. **J. Turk. Phytopath.** 32 (2), 57-60.
- Çağlayan, K., Gazel, M., 1999. Primary studies for viroid and phytoplasma problems of stone fruits in East Mediterranean Area of Turkey. XIVth International Plant Protection Congress (IPPC) Jerusalem, Israel, July 25-30. p. 16. characterisation of Mediterranean Prunus Necrotic Ringspot Virus Isolates. **Journal of Plant Pathology**, 83 (1), 45-49.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Ulubaş, Ç., Ember, I., 2004. Doğu Akdeniz Bölgesindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında Avrupa sert çekirdekli meyve ağacı sarılığı (European stone fruit yellows=ESFY) fitoplazmasının yaygınlık durumunun PCR/RFLP yöntemleriyle saptanması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri 8-10 Eylül 2004, Samsun**. 141.
- Deng, S, Hiruki, C., 1991. Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. **Phytopathology** 81:1475-1479.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows of pawlownia witches broom. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** 33:259-266.
- Ducroquet, J.P.; Dosba, F.; Lansac, M.; Mazy, K., 1986. Effect of temperature on symptom expression of apple proliferation. **Agronomie** 6, 897-903.
- Frisinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M.S., Forti, D. and Vindimian, M.E., 2000. Cacopsylla costalis (Flor 1861), as a vector of apple proliferation phytoplasma in Trontino. **J. Phytopathol.** 148: 425-431.

- Heintz, W., 1986. [*Cuscuta odorata*- an effective vector for myovoplasma-like organism (MLO)]. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes** 38, 138-141.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M., Mohns, M., and Dosba, F., 2000. Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasmas. **Journal of Phytopath.**, 148: 489-493.
- Jarausch, B. Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Seemüller, E., Dickler, E. 2003. First report of *Cacopsylla picta* as vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. **Plant Disease**, 87: 101
- Jarausch, B., Fuchs, A., Schwind, N., Krcal, G. And Jarausch, W. (2007b) *Cacopsylla picta* as most important vector for *Candidatus Phytoplasma mali* in Germany and neighbouring regions. **Bulletin of Insectology** 60, 189-19
- Lee, R.F. and Rocha-Pena, M.A. (1992) Citrus tristeza virus .In: Mukhopadhyay, A.N., Chaube, H.S., Kumar, J. And Singh, U.S. (eds) **Plant Diseases of International Importance**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 226-249.
- Lee, I.M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**. 85: 728-735.
- Lee I.M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology** 48: 1153-1169.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phytolasma: phytopathogenic mollicutes. **Annu. Rev. Microbiol**, 54: 221-255.
- M. Aldaghe, S. Massart, S. Roussel, S. Steyer, M. Lateur & M. H. Jijaklı Comparison of different Techniques for inoculation of *Candidatus Phytoplasma mali* on apple and periwinkle in biological indexin presedure **Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University**, 72/4 2007
- Marcone C, Ragazzino A, Seemüller E. 1996. Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. **Plant Pathology** 45, 857-63.
- Marwitz, R.; Petzold, H.; Kunze, L., 1974. [Investigations on the transfer of the possible causal agent of apple proliferation to herbaceous host]. **Phytopathologische Zeitschrift** 81, 85-91.
- Morvan, G.; Castelain, C., 1975. Nouvelles observations sur la sensibilite de *Malus x dawsoniana* a la maladie de la proliferation du pommier et sur son utilisaton comme indicateur. **Acta Horticulturae**. 44: 175-182.
- N. Mehle, J. Brzin, J. Boben, M. Hren, J. Frank, K. Gruden, T. Dreo, I. Zezlina, G. Seljak and M. Ravnkar. First report of 'Candidatus *Phytoplasma mali*' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. **Plant Pathology** (2007) 56, 721
- Özkan, M., Kurçman, S., 1976. Orta Anadolu elma bahçelerinde görülen virüs hastalıkları. **Bitki Koruma Bülteni**. 16:1. 106-115.
- Seemüller, E., Scapher, U., Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Z. PflKrankh. PflSchutz**. 91: 371-382.
- Seemüller, E. (1990) Apple proliferation. In Jones, A.L. and Aldwinckle, H.S. (eds) *Compendium of Apple and Pear Diseases*. APS Press, St Paul, Minnesota, pp. 67-68
- Seemüller, E., Garnier, M. and Schneider, B. (2002) Mycoplasmas of plants and insect. In: Razin, S. And Heermann, R. (eds) **Molecular Biology and Pathology of Maycoplasmas**. Academic/Plenum Kluwer, London, pp. 91-116.
- Seemüller, E., Schneider, B., 2004. *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri* and *Candidatus Phytoplasma prunorum*, the causal agents of apple proliferation,

- per decline and European stone fruit yellows, respectively. In **J. Syst and Evol. Microbiol**, 54: 1217-1226
- Seemüller, E., Moll, E. and Schneider, B.(2008) Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. **European Journal of Plant Pathology** 121, 109-119
- Sertkaya E. 2005. Doğu akdeniz Bölgesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında sorun olan fitoplazma kökenli hastalıkların yaygınlığının, böcek vektörlerinin belirlenmesi ile bunların populasyon gelişmesi ve vector etkinliğinin araştırılması. **TUBİTAK-TOGTAG-3205 (2003-2005) proje raporu.**
- Sertkaya G., Martini M., Ermacora P., Musetti R., Osler R., 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and Pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. **Phytoparasitica** 33:380-390.
- Smart, C.D. and Kirkpatrick, B.C. (1996) Identification of host plant genes whose expression is altered upon aster yellows phytoplasma infections. **IOM Letters** 4,274.
- Tedeschi, R., Bosco, D. and Alma, A., 2002. Population Dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), as a vector of apple proliferation phytoplasma in North western Italy. **J. Econ. Entomol**, 95: 544-551.
- Ulubas Serce, C., Gazel, M., Caglayan, K., Bas, M., Son, L., 2006. Phytoplasma Diseases of Fruit Trees in Germplasm and Commercial Orchards in Turkey. **Journal of Plant Pathology**. 88 (2), 179-185.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Yalçın, S., Çağlayan, K., 2007. Responses of Six Turkish Apricot Cultivars to ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’ under Greenhouse Conditions. **Bulletin of Insectology** 60 (2), 309-310.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan ve yol gösteren danışman hocam Prof. Dr.Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgilerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye ve hocam Doç. Dr. Mona GAZEL'e teşekkürlerimi sunarım. Labaratuar çalışmalarında bana yardımcı olan arkadaşlarım Ziraat Müh. Melisa MUKANNASGİL ve Şefika YAVUZ'a teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Hatay ilinin Dörtyol ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Dörtyol ilçesinde tamaladım. 2006 yılında HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi ünvanıyla mezun oldum. 2008 yılı Bahar döneminde Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji bilim dalında Yüksek Lisansa başladım. 2011 yılında mezun oldum.

EKLER**EK 1. Fitoplazma DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler****%2'lik CTAB Solüsyonu pH 8.0 (100 ml)**

Kimyasal	Miktar
CTAB (%2)	2g
NaCl (1.4M)	8.2g
EDTA	0.7g
Tris HCl (500mM)	6g
*B-mercaptoethanol	% 2

*B-mercaptoethanol, bitki örnekleri ezilmeden hemen önce karışıma taze olarak eklenir.

TE Tampon Çözeltisi 50 ml için:

Tris 10mM

EDTA 1mM

Ek 2. AGAROSE JEL ELEKTROFOREZ ÇÖZELTİLERİ ve HAZIRLANMASI

(MANIATIS ve ark., 1982)

TAEX50

100ml stok için:

Trizma base 24.2 g

0.5 M EDTA ph 8.0 10 ml

0.6 glacial acetic acide 5.71 ml

Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

Yükleme buffer

15ml 6X stok için:

150mg Bromophenol blue

18g Glycerol

6ml TAEX50

-20 °C’de saklanır.

Ethidium Bromide Solüsyonu

1mg/ml 200ml stok için:

200ml 0.5XTAE

200 µl Ethidium Bromide (Sigma E-50) (Son konsantrasyon 1mg/ml)

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanır. 5-10 defaya

kadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.

% 1.2’lik Agorose Jelin Hazırlanması

1.2 g agaroz, 100ml 1XTAE içindemikrodalga fırında eritilir. Yaklaşık 40 °C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülerek agarozun donması beklenir (15-20 dakika). 1XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilen agaroz jelin çukurlarına PZR ürünleri yüklenir. Örnek yükleme, 12 µl PZR ürünü 2 µl yükleme bufferı ayrı bir yerde karıştırılarak yapılır. PZR ürünlerinin 120V'da 35 dakika elektroforezinden sonra ethidium bromide solüsyonu ile 3-5 dakika boyanır ve UV transilluminatörde sonuçlar gözlenir. İstenildiği takdirde kamera ile paloroid fotoğraf çekilir.