



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA ENFEKSİYON YAPAN
'*Candidatus* Phytoplasma prunorum'UN
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

MELİSA MUKANNASGİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

EKİM-2011



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA ENFEKSİYON YAPAN
'*Candidatus* Phytoplasma prunorum'UN
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

MELİSA MUKANNASGİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

EKİM-2011

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA ENFEKSİYON YAPAN
'*Candidatus* Phytoplasma prunorum'UN
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

MELİSA MUKANNASGİL

YÜKSEK LİSANS

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe danışmanlığında hazırlanan bu tez 28/10/2011 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Çiğdem Ulubaş Serçe
Başkan

Prof. Dr. Kadriye Çağlayan
Üye

Doç. Dr. Mehmet Arslan
Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Hüseyin Gözübenli
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG ve MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TÜBİTAK-TOVAG 109O448 ve MKÜ-BAP 1004Y0106

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Fitoplazmaların ayırımı ve sınıflandırılmasında çok gen temelli sistemler.....	7
2.1.1. Fitoplazmaların membran proteinleri.....	8
2.1.2. Fitoplazma sınıflandırılmasında 16S rRNA geni temelli sistem.....	9
2.1.3. 16S-23S rRNA genler arası bölge (ISR).....	11
2.1.4. <i>Tuf</i> geni temelli sistem	12
2.1.5. Ribozomal protein geni temelli sistem.....	13
2.1.6. <i>SecY</i> geni temelli sistem.....	14
2.1.7. <i>SecA</i> geni ve diğer genleri.....	14
2.1.8. Çoklu gen temelli sistemlere bakış	15
2.2. Türkiye’de Apple proliferation grubu fitoplazmaların durumu	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Bitki materyallerinin toplanması.....	19
3.2. <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum teşhisi	19
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	19
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları.....	20
3.2.3. Kesilmiş fragmentlerin uzunluğundaki polimorfizmi çalışmaları.....	21
3.3. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi.....	22
3.3.1. Sonuçların Analizi	24
3.4. Biyolojik indeksleme ve patojenin küsküt ile taşınması	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	26

4.1. <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> teşhisi çalışmaları	26
4.2. Küsküt ile taşıma çalışmaları	28
4.3. Genetik çeşitlilik çalışmaları	30
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	48
EKLER.....	49

ÖZET

SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVE AĞAÇLARINDA ENFEKSİYON YAPAN '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'UN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BİYOLOJİK VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Ülkemizden temin edilen *Candidatus Phytoplasma prunorum* (Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı, ESFY) izolatlarının virülensliği ve bunların evriminden sorumlu mekanizmalar hakkında yeni bilgiler kazanmak amacıyla, bu izolatların belirli gen bölgelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu amaçla, Isparta, Hatay, Yalova, Mersin, Niğde, Muğla, Burdur ve Malatya illerinden toplanan kayısı, erik ve şeftali örnekleri PCR-RFLP analizleri ile *Ca. P. prunorum* açısından test edilmiştir. Etmenin küsküt ile enfekteli bitkilerden GF-305 bitkilerine ve fitoplazma ile enfekteli Cezayir menekşesinden Cezayir menekşesine taşıma çalışmalarında pozitif sonuç alınamamıştır. Ancak etmen arazideki enfekteli bitkiden GF-305 bitkilerine aşı ile taşınabilmiştir. PCR ve RFLP analizleri sonucunda tespit edilen fitoplazma izolatları genetik çeşitlilik çalışmasında kullanılmıştır. Genetik çeşitliliği belirlemek için *imp*, *aceF*, *pnp*, *secY* ve *tuf* genleri hedef alınmıştır. *Ca. P. prunorum* izolatlarından *imp* geni 12 adet, *aceF* geni 10 adet, *Pnp* geni 9 adet, *SecY* geni 7 izolatla çoğaltılabilmektedir. Araştırılan izolatlar, *imp* genine göre I3 ve I26 genotiplerine dahil olmuştur. Bu genotiplerden I26 grubu izolatlar sadece Türkiye’de bulunmakta olup Avrupa’da tespit edilememiştir ve çalışılan izolatların 7/9’u bu gruba girmektedir. I3 genotipi ise daha önceki çalışmalarda sadece bir Almanya izolatında belirlenmiş olup çalışılan izolatlardan 2/9’u bu gruba girmiştir. *AceF* genine göre yapılan analizlerde 3 izolat A5, 2 izolat A6 ve 1 izolat A17 genotipine dahil olmuş, bir izolat ise *Ca. P. prunorum* ve *Ca. P. mali* türleri arasında rekombinasyon tespit edilmiştir. Çalışılan izolatlar P1 ve P2 *pnp* genotiplerine ve S1, S2 ve S3 genotiplerine dahil olmuşlardır. Sonuç olarak, analiz edilen izolatlardan bazıları Avrupa izolatlarından farklılık göstermektedir. Bu durum, fitoplazmaların epidemiyolojilerinin açıklanmasında önemli rol oynamaktadır.

2011, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler : Sert çekirdekli meyve ağaçları, çok gen lokuslu DNA dizi tipleme, fitoplazma, PCR-RFLP

ABSTRACT

INVESTIGATION ON GENETIC VARIABILITY OF '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' INFECTED STONE FRUIT TREES BY BIOLOGICAL AND MOLECULAR TECHNIQUES

Particular gene regions of *Candidatus Phytoplasma prunorum* (European stone fruit yellows, ESFY) isolates obtained from Turkey were examined to have new information on virulence and mechanisms responsible for their evaluation. For this purpose, apricot, plum and peach samples collected from Isparta, Hatay, Yalova, Mersin, Niğde, Muğla, Burdur and Malatya provinces were analysed for *Ca. P. prunorum* using PCR-RFLP. Although the pathogen could be transmitted from the infected trees in the field to GF-305 by grafting, there have been no positive results detected from research on transmission of pathogen from GF305 and vinca to vinca. The phytoplasma isolates detected by PCR and RFLP analysis were used in genetic variability studies. *Imp*, *aceF*, *pnp*, *secY* and *tuf* genes were targeted for genetic variability studies. DNA amplifications from *Ca. P. prunorum* isolates provided in 12 isolates with *imp*, 10 with *aceF*, 9 with *pnp*, 7 with *secY* genes. Investigated isolates included in I3 genotype and I26 genotype, according to *imp* gene. I26 genotype has been found only in Turkey and not identified in Europe yet, and 7/9 of isolates was included in this group. I3 genotype has been identified only in one isolate from Germany, 2/9 of investigated isolates was included in this group. Among the investigated isolates, 3 of them were included in A5 genotype, 2 of them in A6 and 1 in A17 genotype, according to *aceF* genes. Beside this, recombination between species of *Ca. P. prunorum* and *Ca. P. mali* were detected in one isolate. Investigated isolates were included in P1 and P2 *pnp* genotypes and S1, S2 and S3 genotypes. As a result, analysed several isolates were different from isolates of Europe and this situation has an important role on phytoplasma epidemiology

2011, 87 sayfa

Key words : Stone fruit trees, multi gene lokus sequence typing, phytoplasma , PCR-RFLP

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
ABKAE	Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü
<i>AceF</i>	Acetyltransferase
<i>Amp</i>	Antigenik membran proteini
AP	Apple proliferation
AY	Aster Yellow
bp	Baz çifti (base pair) mikoplazma
cm	Santimetre
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
d ₂ H ₂ O	Çift destile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTB	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid
ESFY	European stone fruit yellows phytoplasması
EtBr	Etidyum bromid
G	Gram
HCl	Hidroklorik asit
IDP	Immunodominant membran proteinleri
<i>IdpA</i>	Immunodominant membran protein A
ISR	Intergenic sequence region
<i>Imp</i>	Immunodominant membran proteinleri
KCl	Potasyum klorit
KOAc	Potasyum asetat
MBO	Mikoplazma benzeri organizma
MBS	Maize bushy stunt
ml	Mililitre
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfid
NaCl	Sodyum klorür

NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
°C	Santigrat derece
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PD	Pear Decline
pmol	Pikomol
<i>Pnp</i>	Polynucleotide Phosphorylase
RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
rRNA	Ribosomal ribonükleik asit
<i>secY</i>	Membrandan protein geçini kontrol eden gen.
SSCP	Tek kol konformasyon polimorfizmi
TAE	Tris acetate ethylon diamine tetra acetic acid
Taq	Thermo Stabil Polimeraz Enzim
<i>Tuf</i>	<i>Thermus thermophilus</i> 'da elongation factor Tu (EF-Tu)'yu kodlayan gen
UV	Ultraviyole

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Phytoplasma 16S ribosomal RNA RFLP group.....	10
Çizelge 3.1. <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum teşhisinde direk- ve nested-PCR analizlerinde kullanılan primerler	21
Çizelge 3.2. <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorumun fitoplazmalarının genetik çeşitliliğinin araştırılmasında kullanılan primerler.....	23
Çizelge 4.1. Farklı illerden temin edilen bitki örnekleri ve fitoplazma enfeksiyon durumları.....	27
Çizelge 4.2. Kayısı, erik ve şeftali ağaçlarından elde edilen ESFY fitoplazması izolatlarının genetik çeşitlilik çalışmasında markır genlere özgü primerlerin PCR ile çoğaltma yaptığı ESFY izolatları ve izolatların adlandırılmaları.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Yonca bitkilerine sarılmış küsküt bitkileri.....	25
Şekil 4.1. Mersin ilinden toplanan örneklerin PCR ile fitoplazma testi sonuçlarından bir jel görüntüsü. M 100 bp DNA ladder, ES (ESFY), PD ve AP pozitif kontrol, -K negatif kontrol.....	26
Şekil 4.2. Sert çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen fitoplazma izolatlarının PCR ürünlerinin <i>RsaI</i> ve <i>SspI</i> restiriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu oluşan band profilleri. M 100 bp DNA ladder mix, ES ESFY, PD ve AP pozitif kontrol, -E enzim içermeyen negatif kontrol.....	27
Şekil 4.3. a) Enfekteli ve sağlıklı bitki arasında köprü oluşturan küsküt, b) Cezayir menekşesi ve GF-305 bitkilerine sarılan küskütler, c) Küsküt ile taşıma çalışmasından genel bir görünüm.....	28
Şekil 4.4. Arazide <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ile enfekteli olduğu tespit edilen bitkilerin GF-305 bitkilerine aşı ile inokulasyonu sonucu elde edilen pozitif sonuçlar, 10 ve 11 nolu örnekler, M 100 bp DNA ladder, PD armut yıkım pozitif kontrol, AP elma çoklu sürgün, ES Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı pozitif kontrol.....	29
Şekil 4.5. <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> inokule edilen GF-305 bitkilerinde görülen bodurlaşma ve yaprak ayalarının küçülmesi belirtileri.....	30
Şekil 4.6. <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> fitoplazmasının <i>Imp</i> geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir.....	33
Şekil 4.7. <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> fitoplazmasının <i>imp</i> geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Tablo kullanılan izolatların kaynağı ve genotip sınıfını göstermektedir. TR Türkiye, FR Fransa, DE Almanya, HU Macaristan, ESP İspanya, IT İtalya, AZE Azerbaycan, CRO Hırvatistan.....	34

- Şekil 4.8. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *aceF* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbeycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir..... 36
- Şekil 4.9. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *pnp* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbeycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir..... . 37
- Şekil 4.10. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *secY* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbeycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir..... . 38

1. GİRİŞ

Sert çekirdekli meyve türleri Türkiye'nin yaş meyve sebze üretiminin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sert çekirdekli meyve türlerinin dünya üretimleri incelendiğinde Türkiye 390 bin ton kiraz, 530 bin ton kayısı üretimiyle 2007 yılında ilk sıradadır. Erik (225 bin ton) ve şeftali (560 bin ton) üretiminde ise dünya ülkeleri arasında 6. sırada yer almıştır (FAO, 2008).

Ülkemizdeki toplam meyve üretiminin % 25 gibi önemli bir payını sert çekirdekli meyveler oluşturmaktadır (Anonim, 2004). Ilıman iklime sahip yerlerde sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği, erkencilik, ürün verimliliği ve/veya yeni çeşitlerin potansiyel üretici bölgelere adaptasyonu çalışmaları uzun yıllar yapılan çalışmaları oluşturmaktadır. Ancak bu meyve türlerinin üretimini abiyotik faktörlerin yanısıra biyotik faktörler (fungus, bakteri, fitoplazma ve virüs enfeksiyonları) de önemli ölçüde sınırlamaktadır. Meyve ağaçlarında aşıyla taşınabilen 150 kadar virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni olduğu bilinmektedir. Virüsten ari bitkilerin kültürü, üretim veya sanitasyonunu başarısı eldeki mevcut virüs kaynaklarının varlığına, vektörlerin bulunuşuna ve etkisine, bölgede veya ülke genelinde enfeksiyonun durumuna ve çevre şartlarına bağlıdır (Dunez, 1988). Meyve ağaçlarında hastalık yapan en önemli patojen gruplarından birisi de fitoplazmalardır.

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 başarılı bir şekilde önlenabilmektedir. Ancak, virüs, viroid ve fitoplazma gibi hastalıklar kimyasallarla kontrol edilememektedirler.

Virüsler tarafından neden olduğu düşünülen bazı bitki hastalıklarının morfolojik olarak mikoplazmalara benzeyen prokaryotların floem dokularını kolonizasyonu ile olduğuna dair ilk kanıtlar 1967 yılında ortaya konmuştur (Doi ve ark, 1967). Japon araştırmacılar, elektron mikroskobu kullanılarak sarılık hastalığı görülen bitkilerde hücre duvarı olmayan mikroorganizmaları görüntülemişlerdir. O zamandan bu yana, sarılık hastalıkları olarak adlandırılan pek çok hastalık sendromunun daha sonra saprofitik yaşayan veya insan ve hayvanlarda hastalık yapan mikoplazmalara

benzediği için mikoplazma-benzeri organizmalar olarak adlandırılan etmenler tarafından neden olunduğu bildirilmiştir. *In vitro* 'da gelişememesi nedeniyle son 15 yıl öncesine kadar çok az özelliği bilinen bu organizmalar, ribozomal DNA dizileme sayesinde bitki floemi ve böcekleri kolonize edebilen ve hücre duvarı olmayan bu prokaryotların *Mollicutes* sınıfı içerisinde büyük bir monofiletik grup olduğu anlaşılmıştır. Uluslararası Karşılaştırmalı Mikoplazmoloji Araştırma Projesi (International Research Project for Comparative Mycoplasmaology)'nin Fitoplazma Çalışma Grubu, 1990'lı yıllarda, prokaryotların bu grubunu tanımlayabilmek için 'Fitoplazma' ismini vermiş ve 2004 yılında, bu prokaryotların resmi sınıflandırılması "*Candidatus Phytoplasma*" cinsi olarak yapılmaya başlanmıştır (Anonim, 2004).

Fitoplazma hastalıkları, her ne kadar bazıları konukçu dizisi ve yayılımı bakımından sınırlı kalmışsa da, tüm dünyada pek çok bitki grubunda hastalığa neden olmaktadır. Fitoplazmalarla ilişkili olduğu uzun zamandır bilinen en yaygın hastalıklar, tropik alanlarda hindistancevizi gizli sarılık (coconut lethal yellowing), sandal ağacı sivrilme hastalığı (sandal spike disease), paulownia cadı süpürgesi (paulownia witches' broom), mısır bodurlaşma (corn stunt), çeltik sarı cücelik hastalığı (rice yellow dwarf diseases) ekonomik olarak en önemlileridir. Orman ağaçları Hindistan, Orta Afrika, ABD ve Avrupa gibi ülke ve bölgelerde fitoplazma epidemilerinden ciddi şekilde zarar görmektedir. Karaağaç sarılık veya cadı süpürgesi (Elm yellows veya witches' broom) Avrupa ve Kuzey Amerika'da tarihi plantasyonları olduğu gibi yeni dikilmiş ağaçları da yok etmektedir. Meyve ağaçları içerisinde asma, elma, armut, erik, kayısı, kiraz, turunçgil ve üzüm sü meyvelerin çoğunluğu sarılık, yıkım, aşırı sürgün oluşumu ve cadı süpürgesi olarak adlandırılan fitoplazma hastalıkları ile az ya da çok hastalanmaktadır. Batı ABD veya Kuzey İtalya gibi bölgelerde ellili yıllardan bu yana armut yetiştiriciliği armut ağaçlarını çok hızlı veya yavaşça öldüren armut yıkım (pear decline) fitoplazması nedeniyle yok olmuştur. Benzer durum, Avrupa'da pek çok asma yetiştirilen bölgede fitoplazma ile ilişkili sarılık hastalığı: Flavescence doreé için de söz konusudur. Kalite ve verimi azaltan bu etmen Fransa, İspanya, Kuzey İtalya, ve Doğu Avrupa'da karantina patojenidir. Orta Doğu'da bazı bölgelerde özellikle Umman'da geleneksel lime üremine elemine eden lime cadı süpürgesi (lime witches' broom) hastalığı fitoplazma tarafından neden olunmaktadır. Dünya çapında kültüre alınan otsu bitkiler veya yabancı otlarda ciddi epidemi yapan fitoplazmalar da mevcuttur (Bertaccini, 2007).

Fitoplazmalar bakterilere benzeyen tek hücreli, hücre duvarı olmayan, obligat parazitlerdir. Böcek vektörler ve bitkilerdeki konukçu hücrenin sitoplazmasında büyür ve çoğalırlar. Tomurcuklanma vasıtasıyla aseksüel olarak ürerler. Fitoplazmalar enfekte ettikleri bitkilerin öncelikle floem iletim demetlerine saldırırlar ve floem dokusunda kalırlar. Bu patojenler bitkilerin floeminde beslenen yaprakpireleri, *Cixidiæ* ve *Psillidæ* familyasına baēlı böcek vektörlerle taşınırlar. Böcek bitkide beslenirken yaptığı emgi ile patojeni bünyesine alıp ve daha sonra beslenme kanalı, tükürük bezleri ile böcek patojeni saēlıklı bitkilere iletmeye özelliēine sahiptir. Genellikle böceēin infekteli olduēu bir latent dönem vardır, ancak bu dönem birkaç saat veya birkaç hafta sürebilir. Böcek vektörler bünyelerinde fitoplazma bulunmasından dolayı etki görmezler, ancak bazı durumlarda yumurta ile taşınma da görölmüştür. Fitoplazmalar ayrıca küsküt ile de taşınmaktadır, bu yolla taşınma genellikle araştırmalar için fitoplazmaların Cezayir menekşesi (*Vinca rosea*) gibi deneysel konukçu bitkilere aktarılması açısından önemlidir. Bu şekilde pek çok fitoplazma straini cezayir menekşesinde muhafaza edilmektedir. Diēer taraftan, aşılama, çelikle üretim, mikro çoēaltım gibi seksüel çoēaltmadan farklı yöntemlerle yapılan çoēaltma işlemlerinin fitoplazmanın taşınmasında rol oynadıēı uzun yıllardır bilinmektedir. Tohumla taşınma ise hala araştırlan bir konu olmakla birlikte, yonca bitkilerinde Hindistan cevizi gizli sarılık fitoplazmasının çok az sayıda bitkide tohumla taşındıēı belirlenmiştir (Bertaccini, 2007).

Fitoplazmaların ayrımı ve saptanması, hastalığın teşhisi için gereklidir. Bu prokaryotlar *in vitro* olarak kültüre alınamadıēından alternatif metodlar kullanılmak zorundadır. Geçmişte bu amaç için hem DNA hibridizasyonu hem de serolojik yöntemler kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR), bitki ve böcek konukçularındaki fitoplazmayı belirlemek için elverişli bir yöntem olduēundan günümüzde tercih edilmektedir. Fitoplazma genomunun, fitoplazmaya özgü 16S rRNA bölgesinin çoēaltılmasıyla elde edilen DNA parçalarından PCR primerleri geliştirilmiştir. Ancak, 16S rRNA genomuyla ilişkili olan fitoplazmaların birbirine benzer olması bu fitoplazmaların ayırt edilmesini zorlaştırmıştır. Son yıllarda, fitoplazmaların ayrımını saēlayan bölgenin 16S ve 23S rRNA genom bölgesi olduēunu saptanmış ve ana fitoplazma gruplarını ayırt etmeyi saēlayacak spesifik genom bölgelerine özgü PCR primerleri geliştirilmiştir. Bu teknik epidemiyolojik çalışmalar,

vektör ilişkilerinin analizi ve hastalığın kontrolüne yönelik strateji geliştirilmesi açısından önemlidir (Smart ve ark., 1996). Günümüzde halen fitoplazmaların tespitinde evrensel ve spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Candidatus Phytoplasma prunorum (Kison & Seemüller, 2001) ve *Ca.* Phytoplasma mali (Seemüller & Schneider, 2007) izolatlarının hastalık yapma şiddetleri (virülensliği) arasındaki fark fitoplazmalarda biyolojik çeşitliliğinin bir kanıtıdır. Bu durumda *Ca.* Phytoplasma prunorum hipo-virulent izolatların Fransa'da olan izolatlarla aynı türde olduğu rapor edilmiştir ve bunların çapraz korumalarda kullanımları için girişimlerde bulunulmuştur (Cornaggia ve ark., 1995; Morvan ve ark., 1991). *Ca.* Phytoplasma mali' nin biyolojik çeşitliliği son yıllarda *Ca.* Phytoplasma mali' nin genom sekansının tamamlanmasıyla (Kube ve ark., 2008) elde edilen hflB geninin (Schneider & Seemüller, 2009) sekans analizleri ile araştırılmaktadır. Buna karşın *Ca.* Phytoplasma prunorum ve *Ca.* Phytoplasma pyri' nin genetik çeşitliliği hakkında az şey bilinmektedir.

Oldukça korunmuş 16S rRNA gen dizileri fitoplazmaların sınıflandırılmasında birinci moleküler araç olmuştur. PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA dizilerinin RFLP analizi ile 19 farklı grup, 16S rRNA grubu olarak tanımlanmıştır veya *in silico* RFLP analizine göre ise 29 grup tanımlanmıştır. Her bir grubun en az bir fitoplazma türü ile temsil edilmesi önerilmiştir (Gundersen ve ark. 1994). Günümüzde tür belirlemesi fitoplazmalar arasında 16S rRNA dizilerinin temel olarak farklılık oranına göre yapılmaktadır. Ortalama %2,5 farklılık (dissimilarity) eşiği yeni bir tür seçiminde bir kural olarak uygulanmaktadır (Anonim, 2004). 16S rRNA geninin yüksek ölçüde korunmuş olması nedeniyle, bu kural pek çok ekolojik ve biyolojik olarak farklı fitoplazma ırkının dışarıda kalmasına neden olabilir. Böcek vektörler, konukçu vektörler gibi belli başlı biyolojik özellikler moleküler özelliklerle birlikte tür tanımlamada kullanılmalıdır. Son 10 yıldaki epidemiyolojik çalışmalar, 16S rRNA gen dizisine göre çok yakın akraba farklı fitoplazma ırkları farklı coğrafik bölgelerde yetiştirilen ürünlere verildiğinde farklı çeşitlerde benzer hastalıkları oluşturduğunu göstermiştir. Hastalık kontrol yöntemlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için farklı fitoplazma ırkları ve bunların tipik ekolojik nişleri arasındaki ilişkinin bilinmesi önemlidir. Genellikle bu ırklar 16S rRNA gen dizilerinin analizi ile kolayca ayırt edilemezler. Bu durum, yakın

akraba fitoplazma ırklarının ayırımında daha iyi ek markörlerin araştırılmasını gerektirmektedir. Son 10 yılda diğer bazı korunmuş genler veya spesifik genomik DNA parçacıkları yakın akraba ırklarının ayırımında ek moleküler markörler olarak kullanılmaktadır.

Prokaryotların genotiplenmesinde en uygun metod bakteriyal epidemiyolojide ve populasyon genetiğinde yaygın olarak kullanılan çok lokuslu dizi tiplemesidir (multilocus sequence typing; MLST) (Maiden ve ark., 1998 ; Urwin ve Maiden , 2003). Fakat bu yöntem gen dizilerinin tanısını gerektirir. Bu amaçla, apple proliferation grubu için daha önce uygulanmış olan beş gen sistemi bu araştırma kullanılmıştır. Bu çalışmada ülkemizden toplanan farklı *Ca. Phytoplasma prunorum* izolatlarının beş gen; *imp*, *aceF*, *pnp*, *secY* ve *tuf* genleri; bölgesinden DNA dizilerini elde edilerek bu ırkların tanısı ve sınıflandırılmasının yapılması amaçlanmıştır. Bu araştırmalar sonucu ülkemizdeki *Ca. Phytoplasma prunorum*'un genetik çeşitliliğine dair bilgiler elde edilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fitoplazmalar, *Mollicute* sınıfına dahil olan bitki patojeni bakterilerdir. Filogenetik olarak düşük G+C miktarlı, gram +, hücre duvarı olmayan bir grup mikro organizmalardır (Weisburg ve ark., 1989). Fitoplazmalar dünya üzerinde yüzlerce üründe hastalık yapan (Lee ve ark., 2000) ve bir bitkiden diğerine hemipter böceklerin özsü emmesi ile taşınan mikroorganizmalardır (Weintraub & Beanland, 2006). Avrupa iklimindeki meyve ağaçlarının fitoplazmalarla bağlantılı hastalıklardan etkilenmesi Avrupa meyve üretiminde çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Candidatus* Phytoplasma prunorum *Prunus* cinsi ağaç ve çalılarda Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı (ESFY), *Ca.* Phytoplasma mali birçok *Malus* cinsinde çoklu sürgün oluşumu (Apple proliferation; AP), *Ca.* Phytoplasma pyri *Pyrus* cinslerinde armıt yıkım hastalığı (Pear decline; PD)'ndan sorumludur (Seemüller ve Schneider, 2004). AP Avrupa ve Türkiye elma bahçelerini etkilemektedir (Seemüller, 1990; Sertkaya ve ark., 2008) ve en yüksek ekonomik zarar Almanya ve Kuzey İtalya da meydana gelmektedir. PD Avrupa, Kuzey Amerika, Orta Doğu (Battle ve ark., 1999; Blomquist ve Kirkpatrick, 2002b; Choueiri ve ark., 2007; Davies ve ark., 1992; Lorenz ve ark., 1995; Malinowski ve ark., 1996; Sharbatkhari ve ark., 2008) ve aynı zamanda Tayvan'da (Liu ve ark., 2001) rapor edilmiştir. ESFY Orta Avrupa dolaylarında mevcuttur (Marcone ve ark., 2010) ve kayısı klorotik yaprak kıvrıcılığının şiddetli formları yüzünden güney Fransa'da (Jarausch ve ark., 2001) her yıl kayısı ağaçlarının % 5'i ölmektedir. Aynı zamanda Japon kayısılarından *Prunus salicina*'da kayısı leptonekrozlarını meydana getirmektedir ve Güney Avrupa şeftalilerinin çoğunda sarılaşmayı ön plana çıkarmaktadır. Bu 3 fitoplazma 16SrX olarak adlandırılan aynı filogenetik gruba dahildir (Lee ve ark., 2000) ve birbiriyle yakın akraba üç altgrubu oluştururlar (Jarausch ve ark., 1994 ; Lorenz ve ark., 1994).

Ca. Phytoplasma mali , *Ca.* Phytoplasma pyri ve *Ca.* Phytoplasma prunorum bir ağaçtan diğerine *Cacopsylla* cinsi pisillidlerle (Carraro ve ark., 1998; Frisinghelli ve ark., 2000; Jarausch & Jarausch, 2009; Jensen ve ark., 1964), aşılama ve fidanlıklardaki enfekteli materyallerin etkileşimi ile taşınabilirler. Ek olarak *Ca.* Phytoplasma mali aynı zamanda bahçe içerisindeki ağaçların birbirlerine yakın

alanlarından kök kaynaşması ile de taşınabilmektedir (Ciccotti ve ark., 2007). Bu fitoplazmalar *Cuscuta* spp. kullanılarak enfekteli elma ağaçlarından *Catharantus roseus* test bitkisine taşınabilmiştir. Hastalık aşı gözü dışında tohumla ya da polenle taşınmamaktadır. (Marwitz ve ark., 1974; Heintz, 1986). Lübnan’da domates ve biber tarlalarında yapılan fitoplazma surveyi sonucunda, fitoplazmanın küsküt tarafından domateslere taşındığı saptanmıştır (Choueiri *et al.*, 2007). PD, ESFY, Rubus stunt, *Picris echioides* (bristly oxtangue) yellows ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) phyllody hastalıklarına sebep olan fitoplazmalar sırasıyla doğal enfekteli bitkilerden deneysel konukçulara *Cantharantus roseus* ve *Cuscuta* ssp (küsküt)’e aktarılmışlardır (Marccone ve ark., 1999). Yapılan çalışmalar sonucunda, *Cuscuta campestris* (Küsküt, *Cuscutaceae* familyası) alternatif konukçu olarak saptanmıştır. Onsekiz Mart Üniversitesi’nde yapılan bir çalışmada, stolbur hastalığının küsküt ile % 85,7 oranında taşındığı sonucuna varılmıştır.

Ca . Phytoplasma prunorum (Kison & Seemüller , 2001) ve *Ca . Phytoplasma mali* (Seemüller & Schneider, 2007) izolatlarının hastalık yapma şiddetleri (virülensliği) arasındaki fark fitoplazmaların biyolojik çeşitliliğinin bir kanıtıdır. Bu durumda *Ca . Phytoplasma prunorum* hipo-virulent izolatların Fransada olan izolatlarla aynı türde olduğu rapor edilmiştir ve bunların çapraz korumalarda kullanımları için girişimlerde bulunulmuştur (Cornaggia ve ark., 1995; Morvan ve ark., 1991). *Ca . Phytoplasma mali*’ nin biyolojik çeşitliliği son yıllarda tek kol konformasyon polimorfizmi ve (SSCP) ve *Ca . Phytoplasma mali*’ nin genom sekansı (Kube ve ark., 2008) ile sonuçlanan hflB geni dizilerinin (Schneider & Seemüller , 2009) analizleri ile araştırılmıştır. Buna karşın *Ca . Phytoplasma prunorum* ve *Ca . Phytoplasma pyri*’ nin genetik çeşitliliği hakkında az şey bilinmektedir.

2.1. Fitoplazmaların ayırımı ve sınıflandırılmasında çok gen temelli sistemler

Fitoplazmaların 40 yıldan fazla zaman öncesinden keşfinden beri hücre dışında bir ortamda kültüre alınma çabaları başarısız olmuştur, bu durum kültüre alınan prokaryotlarda uygulanan geleneksel metotlar ile fitoplazmaların taksonomik

durumlarını belirlemeyi zorlaştırmıştır. Geçtiğimiz son 25 yıla kadar fitoplazmaların sınıflandırılması ve birbirinden ayırt edilmesi, enfekteli bitkilerde oluşturdukları simptomlara, bitki ve böcek konukçularının spesifikliği 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. Modern *Mollicute* sistematğinde polifazik taksonomi sistemi uyarlanmıştır, bu sistem son yirmi yılda fenotipik, genotipik ve filogenetik kriterlere göre uyarlanmıştır. 16S rRNA'yı ve diğer genleri temel alan kapsamlı filogenetik çalışmalar *Mollicute* sınıfı fitoplazmalara kolayca uygulanmıştır. Son yirmi yılda uygulanan moleküler temelli analizlerin fitoplazma tanısında biyolojik çalışmalardan daha doğru ve kullanışlı olduğu ortaya konulmuştur.

2.1.1. Fitoplazmaların membran proteinleri

Yapılan çalışmalar, immunodominant membran proteinleri (IDP) olarak adlandırılan bir grup membran proteinlerinin fitoplazmaların toplam hücresel membran proteinlerinin büyük kısmını oluşturduğunu ortaya koymuştur (Shen ve Lin, 1993). Bunlar hücrenin dış yüzeyinde yer almakta ve bu proteinler bakterilerin konukçu hücre yüzeyine tutunmalarında rol oynamaktadır. Bu nedenle, konukçu-fitoplazma ilişkilerinde önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler önemli ölçüde aminoasit ve antigenik farklılık gösterirler.

IDP'ler üç farklı gruba ayrılır: 1. Immunodominant membran proteinleri (*imp*), 2. Immunodominant membran protein A (*IdpA*), 3. Antigenik membran proteini (*Amp*). Bu IDP'ler birbirleri ile aminoasit benzerliği göstermezler ve genomun farklı bölgelerinde lokalize olmuştur.

2.1.2. Fitoplazma sınıflandırmasında 16S rRNA geni temelli sistem

Fitoplazmaların ayırımında ve sınıflandırmasında bazı moleküler markörler uygulanmıştır. 16S rRNA geni fitoplazma araştırmacıları arasında en çok kullanılanıdır ve fitoplazmaların ilk sınıflandırmalarında çok kullanışlı olmuştur. 16S rRNA geni üzerindeki bazı universal veya generik oligonükleotid primer çiftleri, 16S-23S içsel ara bölge (intergenic space region) ve kısmî 23S rRNA geni dizisini kapsayan primerler düzenlenmiştir ve bunlar bitki ve böcek vektörlerle ilişkili çeşitli türde fitoplazmaların DNA çoğalmasını sağlamaktadır. 16S rRNA gen dizilişinin, seçilen enzimlerle RFLP analizi Schneidder ve ark (1993) ve Lee ve ark. (1993) tarafından fitoplazmaların sınıflandırılmasında uygulanmıştır. 17 restriksiyon enzimi ile RFLP analizi esas alınarak fitoplazmaların kapsamlı sınıflandırma şeması inşa edilmiştir. Büyük grupların ayırımı, 1-2 kb PCR amplikonunun RFLP görüntülerinin benzerlik (similarity coefficients) oranına göre hazırlanmıştır (Lee et al 1998). İki farklı grup arasındaki RFLP görüntülerinin benzerlik oranı %90 veya daha azdır. Bir grup içerisinde alt grup oluşumları bu amplikon içerisindeki yan restriksiyon analizi ile belirlenmiştir. Bir bilinmeyen fitoplazma ırkı o grubun mevcut üyelerininkinden bir veya daha fazla kesim bölgesine sahipse yeni bir alt grup olarak atanmıştır. Bu tablo periyodik olarak güncellenmektedir (Lee et al. 1998). Bu güne kadar, 19 büyük fitoplazma grubu ve yaklaşık 50 alt grup içermektedir (Tablo 2.1).

RFLP ile oluşturululan grupta 16S rRNA dizilerinin analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç ile oldukça benzerdir. Her bir grubun en az bir fitoplazma türü ile temsil edilmesi önerilmiştir (Gundersen ve ark, 1994). Son yıllarda, tablo daha görsel RFLP görüntüleri kullanılarak daha ileriye güncellenmiştir (Wei ve ark., 2007, 2008; Zhao ve ark., 2009b). Günümüzde, tablo 29 grup ve 89 alt grubu içermektedir. Her alt grup tek bir RFLP görüntüsünden oluşmaktadır. Tablo, referans fitoplazma strainlerinin RFLP patternlerinin gösterildiği bir şekil ile birlikte verilmek zorundadır. Bu görüntülerin karşılaştırılması ile bir kişi bilinmeyen bir fitoplazma ırkının 16S rRNA gen dizisinin ya gerçek yada bilgisayar aracılığı ile oluşturulan görsel RFLP analizi aracılığı ile tanımlayabilir. 16S rRNA geninin dizilemesi görsel RFLP analizinin oluşturulması için gereklidir. Pratikte, gerçek RFLP analizi, bilinmeyen bir fitoplazma

hastalığının ön karakterizasyonunda ya çok sayıda örnek analiz edilecekse veya dizileme imkanı yoksa tercih edilebilir. Bu güncellenmiş tablo fitoplazmaların en kapsamlı sınıflandırmasını temsil eder ve fitoplazma ırklarının hızlı tanısı amacıyla kullanışlı moleküler markörler sağlamaktadır.

Çizelge 2.1. Phytoplazmaların 16S ribosomal RNA RFLP yöntemiyle sınıflandırılması

Grup	Alt grup sayısı	'Ca. Phytoplasma' türlerinin sayısı
16SrI: Aster yellows grup	11	1 ('Ca Phytoplasma asteris')
16SrII: Peanut witches'-broom grup	12	2 ('Ca Phytoplasma aurantifolia' ve 'Ca Phytoplasma australasiae')
16SrIII: X-disease grup	19	1 ('Ca Phytoplasma pruni ⁽¹⁾)
16SrIV: Coconut lethal yellows grup	6	1 ('Ca Phytoplasma palmae ⁽²⁾)
16SrV: Elm yellows grup	6	3 ('Ca Phytoplasma ulmi', 'Ca Phytoplasma ziziphi' ve 'Ca Phytoplasma vitis')
16SrVI: Clover proliferation grup	8	1 ('Ca Phytoplasma trifolii')
16SrVII: Ash yellows grup	3	1 ('Ca Phytoplasma fraxini')
16SrVIII: Loofah witches'-broom grup	1	1 ('Ca Phytoplasma luffae ⁽³⁾)
	4	1 ('Ca Phytoplasma phoenicium')
16SrIX: Pigeon pea witches'-broom grup		
16SrX: Apple poliferation grup	5	4 ('Ca Phytoplasma mali', 'Ca Phytoplasma pyri', 'Ca Phytoplasma prunorum' ve 'Ca Phytoplasma spartii')
16SrXI: Rice yellow dwarf grup	3	1 ('Ca Phytoplasma oryzae')
16SrXII: Stolbur grup	7	4 ('Ca Phytoplasma australiense', 'Ca Phytoplasma japonicum', 'Ca Phytoplasma fragariae' ve 'Ca Phytoplasma solani ⁽⁴⁾)
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence grup	2	1
16SrXIV: Bermudagrass white leaf grup	1	1 ('Ca Phytoplasma cynodontis')
16SrXV: Hibiscus witches'-broom grup	1	2 ('Ca Phytoplasma brasiliense')
16SrXVI: Sugarcane yellow leaf syndrome grup	1	1 ('Ca Phytoplasma graminis')
16SrXVII: Papaya bunchy top grup	1	1 ('Ca Phytoplasma caricae')

16SrXVIII: American potato purple top wilt grup	1	1 ('Ca Phytoplasma americanum')
16SrXIX: Japanese chestnut witches'-broom grup	1	1 ('Ca Phytoplasma castaneae')
16SrXX: Buckthorn witches'-broom grup	1	1 ('Ca Phytoplasma rhamni')
16SrXXI: Pine shoot poliferation grup	1	1 ('Ca Phytoplasma pini')
16SrXXII: Nigerian coconut lethal decline (LDN) grup	1	1 ('Ca Phytoplasma cocosnigeriae')
16SrXXIII: Buckland Valley grapevine yellows grup	1	1
16SrXXIV: Sorghum bunchy shoot grup	1	1
16SrXXV: Weeping tea tree witches'-broom grup	1	1
16SrXXVI: Mauritius sugarcane yellows D3T1 grup	1	1
16SrXXVII: Mauritius sugarcane yellows D3T2 grup	1	1
16SrXXVIII: Havana derbid phytoplasma grup	1	1
16SrXXIX: Cassia witches'-broom grup ^d	1	1 ('Ca Phytoplasma omanense')
16SrXXX: Salt cedar witches'-broom grup	1	1 ('Ca Phytoplasma tamaricis')

16S rRNA geni temelli sistemin fitoplazma sınıflandırmasındaki faydası bu genin oldukça korunmuş olmasındandır, böylece universal oligonükleotid primerler oldukça kolay düzenlenebilmekte ve gen bankasından temin edilebilen dizilerle kapsamlı filogenetik ağaçlar çizilebilmektedir. Ancak, çok korunmuş doğası nedeniyle, 16S rRNA geni yakın akraba ama farklı olan fitoplazma strainlerinin daha iyi ayırımında yetersiz kalmaktadır. Bazı alt grupların birden fazla biyolojik olarak farklı ırkları içerdiği bilinmektedir.

2.1.3. 16S-23S rRNA genler arası bölge (ISR)

Fitoplazma 16S-23S rRNA genleri arası bölge (yaklaşık 232 bp) oldukça korunmuş tRNA^{le} kodlayan bir parçayı içerir. Fakat , tDNA^{le} 16S rDNA ve 23S rDNA

aralarındaki diziler çeşitli fitoplazmalar arasında değişkendir. ISR fitoplazma grup ve alt gruplarının ayırımında kullanışlı bir araç sağlar. Oldukça kısa dizileri olduğundan sınırlı bilgi verici özellikleri olduğunda ISR tüm 16Sr alt gruplarının ayırd edilmesinde kullanılamamaktadır. Diğer taraftan, 16S rRNA ve ISR dizilerinin birleştirilerek analiz edilmesi aynı 16Sr alt grubundaki farklı strain tiplerini ayırt etmekte pek çok kez kullanışlı olmuştur (Griffiths ve ark., 1999; Marcane ve ark., 2000, Padovan ve ark., 2000; Anderson ve ark., 2006).

2.1.4. *Tuf* geni temelli sistem

EF-Tu faktörünün elongation faktörünü kodlayan *Tuf* geni, fitoplazmaların sınıflandırılmasında ve ayırımında sıkça kullanılan oldukça korunmuş diğer bir genidir. 1997'de Schneider ve ark. düzenlediği primer dizileri ile pek çok fitoplazma grubundan *Tuf* geni dizilerini çoğaltmada kullanmıştır. *Tuf* geninin, 16S rRNA geni gibi, fitoplazma gruplarının sınıflandırılmasında potansiyel bir markör olduğu bulunmuştur. Aster yellows (AY), peach X-disease ve stolbur (STOLL) fitoplazma grupları arasında nükleotid dizi benzerliği %88,8-97,0 arasında değişmektedir. Fitoplazma grup ve alt grupları birkaç restriksiyon endonükleaz kullanılarak RFLP analizi yardımı ile ayırt edilebilmektedir. Fitoplazmalar arasında farklı soyları ayırma etkinliği 16S rRNA geninden çok az daha düşüktür (Schneider ve ark., 1997; Marcane ve ark., 2000). Ancak bazı durumlarda *tuf* geni 16S rRNA alt grupları içindeki çeşitli ekolojik ırkların veya ırk varyantların ayırımında kullanışlı bulunmuştur (Langer and Maixner, 2004). Örneğin, birkaç ırk varyantı 16XII-A ve 16XII-B içerisinde *tuf* geni dizilerinin analizi ile fark edilmiştir (Langer ve Maixner, 2004; Streten ve Gibb, 2005; Andersen ve ark., 2006).

2.1.5. Ribozomal protein geni temelli sistem

Ribozomal protein (rp) genleri 16S rRNA genininden daha değişkendir ve farklı fitoplazma ırklarını ortaya çıkaran yüksek çözölme gücü sonuçlayan fitogenetik olarak bilgi verici özelliklere sahiptir. 16S rRNA ve 16SrV grubu fitoplazma ırkları ile yapılan ilk çalışmalar göstermiştir ki, rp gen dizilerinin analizi 16Sr alt grupları ile uyumlu alt grupların kolayca ayırt edilmesini sonuçlamakla kalmamıştır, aynı zamanda 16S rRNA geni dizilerinin analizi ile ayrılmayan ek olarak farklı ırkların aynı alt grupta tanımlanması sağlanmıştır (Martini ve ark., 2002; Lee ve ark., 2004a). Tanımlanan ek soyların çoğu, farklı biyolojik özelliklere sahiptir. Örneğin, Maize bushy stunt (MBS) fitoplazması, 16SrI-B'in bir alt grubunun bir üyesi olarak sınıflandırılır, bu alt grubun dar bir konukçu bitki ve spesifik vektörleri olup bu bakımdan 16Sr grubunun diğer üyelerinden farklıdır, bu özelliği ile farklı rp alt grubunu temsil ederler. Benzer şekilde, alt grup 16SrV-C alt grubu bazı kilit restriksiyon enzimleriyle yapılan RFLP analizleri esas alınarak birkaç rp alt grubuna ayrılabilir (Martini ve ark., 2002; Lee ve ark., 2004a).

Son zamanlarda, Martini ve ark., (2007) 12 16Sr grubunu temsil eden 46 fitoplazma ırkında rpIV (rpI22) ve rpsC (rps 3) adlı iki ribozomal protein genlerinin analizini temel alarak kapsamlı bir filogenetik ağaç oluşturmuşlardır. Bu rp geni temelli filogenetik ilişkileri ortaya koymuş ve 16SrRNA temelli ağaç ile elde edilenden daha ayırıştırıcı farklı soyların ve farklı fitoplazma alt sınıflarının elde edilmesini sağlamıştır. Örneğin, üç *Ca. Phytoplasma* türü (*Ca. Phytoplasma mali*, *Ca. Phytoplasma pyri* ve *Ca. Phytoplasma prunorum*) 16SrDNA'ya göre %98,9-%99,1 benzerlik paylaşmaktadır, rp genlerine göre ise %94,3-%94,6 dizi benzerliği göstermektedir. İki 16S fitoplazma grupları arasında ortalama dizi benzerliği 16S rRNA geni ile rp genleri kıyaslandığında rp genlerinde %50,4-83,5, 16S rRNA genlerinde ise %85,0-96,9'dur. Daha yüksek dizi değişkenliği farklı fitoplazma ırklarının sınıflandırmasında rp genlerini daha iyi moleküler araçlar olarak ortaya koymaktadır.

2.1.6. *SecY* geni temelli sistem

SecY geni bir protein translocase alt ünitesini kodlanmaktadır ve fitoplazma ırklarının daha iyi ayırımında kullanılan bir diğer markördür. *secY* geni dizi değişkenliği *rp* genlerinin benzeridir. 16Sr fitoplazma grupları içinde ikisi arasındaki *secY* geni dizi benzerlikleri %57,4-76,0 arasında değişmektedir (Lee ve ark., yayımlanmamış). 16SrI ve 16SrV grubundan fitoplazmaların *secY* geni dizilerinde RFLP analizleriyle elde edilen *secY* alt grupları genellikle *rp* geni dizileri ile elde edilenlerle aynı olmuştur (Lee ve ark., 2004a,b, 2006b; Martini ve ark., 2007). Bununla birlikte, daha çok bilgi verici özelliklerden dolayı, *secY*'nin ayırtıcı gücü *rp* geni dizilerinden biraz daha iyidir. Fitoplazma gruplarının çoğunluğunun ve bunların temsilci ırklarının tam karakterizasyonu çalışmaları devam etmektedir (Lee et al., yayımlanmamış). *SecY* geni, *rp* geni gibi, fitoplazma ırklarının sınıflandırmasında iyi bir markör adaydır.

2.1.7. *SecA* geni ve diğer genleri

Protein translocase alt ünitesi kodlayan diğer bir gen olan *SecA* fitoplazmaların sınıflandırılmasında son zamanlarda kullanılmaya başlamıştır. Yaklaşık 480 bp uzunluğundaki gen dizisi parçası 12 16Sr grubunu temsil eden çeşitli fitoplazma ırklarında PCR ile çoğaltılmıştır. İki fitoplazma 16Sr grubu arasındaki dizi benzerlik oranı %69,7-84,4 arasında değişmiştir. Fitoplazma ayırımında bir filogenetik markör olan *secA* geninin ayırtıcı gücü *rp* ve *secY* genlerine benzer oluşmuştur.

Diğer genler *nusA* (ShaO ve ark., 2006) folate genleri (*folP* ve *folK*) (Davis ve ark., 2003) ve *dnaB* 16SrI ve 16SrXII gruplarındaki ırklar arasında ayırım gücü yüksek bulunmuştur. *dnaA* (kromozomal replikasyon başlatıcı protein kodlar), *polC* (DNA polymerase III alpha alt ünitesini kodlar) gibi birkaç housekeeping genler fitoplazmaların sınıflandırılmasında kullanılabilecek diğer aday genlerdir. Bu genlerin dizi değişkenlik oranları *secY* ve *rp* genlerine benzer veya biraz daha fazladır.

2.1.8. Çoklu gen temelli sistemlere bakış

Fitoplazmalar böceklerle taşınan bitki patojenleridir ve konukçu bitki ve vektörün her ikisinde de çoğalabilirler (Lee ve ark., 2000). Farklı böcek ve bitki türlerinin fitoplazmalara olan hassasiyeti ilgili fitoplazma ırklarına göre değiştiği için, böcek ve/veya konukçu bitki tarafından ilgili fitoplazma üzerine kurulan seleksiyon baskısı tek fitoplazma popülasyonlarının veya farklı ırkların zamanla evrimi ve/veya izolasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bunun ötesinde, bitki vektör türlerinin coğrafik dağılımındaki değişkenlik nedeniyle, coğrafik izolasyon bu olayı sonuçlayabilir. Fitoplazma, vektör ve konukçu bitki arasındaki üç yönlü ilişki fitoplazma ekolojinin karmaşıklığına neden olmaktadır. Bu ekolojik olarak izole olan fitoplazma ırkları genellikle bitki ve vektör türlere spesifik olma ve etkilediği bitkide neden olduğu belirtilen biyolojik özelliklere sahiptir.

İtalya'da ESFY izolatlarının moleküler karakterizasyonu ribozomal genlerden daha az korunmuş non-ribozomal DNA bölgesindeki *tuf* geni kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçta bir erik örneğinde yeni bir moleküler varyant tespit edilmiştir (Ferreti ve ark., 2007).

Fransa'da 16SrX grubuna giren fitoplazmaları tiplmek için non-ribozomal genetik lokuslarda *aceF* ve *pnp* genleri seçilmiş, *aceF* baz dizilerine göre Fransa'da *Prunus*, *Malus* ve *Pyrus* türlerinde ve *Cacopsylla pruni*'de tespit edilen ESFY izolatlarının dört farklı grup oluşturduğu belirlenmiştir.

Fransa'da yapılan bir çalışmada Azerbaycan'dan temin edilen bir izolatın Fransa'da tespit edilen izolatlardan çok daha farklı olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan *aceF* geni *pnp* genine kıyasla daha fazla varyasyon tespit etmesi nedeniyle, Avrupa'daki izolatların varyasyonunu tespit etmede daha iyi bir markır gen olarak önerilmiştir (Danet ve ark., 2008).

Lübnan'da PD izolatlarının *aceF* markır geni ile karakterizasyonu sonucu bu ülkede tespit edilen izolatların Avrupa izolatlarından farklı olduğu tespit edilmiştir (Salar ve ark., 2007).

Fransa'da bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan'dan temin edilen ESFY izolatlarının *imp*, *aceF*, *pnp* ve *SecY* genleri ile tiplmeleri sonucu 30 alt grup

tanımlanmış, *imp* geninin genetik çeşitliliği en iyi belirleyebilen markör olduğu belirtilmiştir. Azerbaycan'dan temin edilen bir örnekle elde edilen sonuçlar, Doğu ülkeleri ile Avrupa'nın batısı arasında yüksek bir genetik farklılığın olabileceğini göstermiştir (Danet ve ark., 2011).

2.2. Türkiye'de Apple proliferation grubu fitoplazmaların durumu

Günümüze kadar ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazmaların saptanması konusundaki çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmış ve ilk simptomolojik bulgular 1999 yılında Çağlayan ve Gazel tarafından bildirilmiştir. Daha sonra, İzmir'den temin edilen bir adet Japon eriği (*Prunus salicina*)'de ESFY fitoplazması PCR-RFLP ile tespit edilmiş ve bu tespitin ülkemizde ilk kayıt olduğunu bildirilmiştir (Jarausch ve ark., 2000).

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 Precco de Thyrinte çeşidinde, bir adedi ise ülkemizin en önemli sofralık çeşidi olan Sakıt çeşidinde saptanmıştır.

Adana, Hatay ve İçel illerinden toplanan toplam 21 kayısı, badem, şeftali ve erik ağacından 4 tanesinin ESFY fitoplazması ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Sertkaya ve ark., 2005). Bu çalışmalarla ESFY fitoplazmasının ülkemizdeki bölgesel olarak varlığı ortaya konulmuştur. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında tüm Avrupa'da önemli bir sorun olan *Ca. Phytoplasma prunorum* ülkemizin bir çok bölgesindeki gen kaynaklarında %54,8 ticari bahçelerde ise %3,2 oranında saptanmıştır (Ulubaş ve ark., 2006).

Mersin'de 2007-2009 yılları arasında yürütülen bir çalışmada Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) Müdürlüğü' nün damızlık kayısı parselinde bulunan çeşitler ile Mut yöresinde yetiştirilen bazı kayısı çeşitlerinin *Ca. Phytoplasma prunorum* ile bulaşma oranlarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. PCR-RFLP yöntemi ile 112 örnekte yapılan testlerde gerek simptomlu gerekse

simptomsuz bitkilerde fitoplazma ile enfeksiyon oranı % 8.035 olarak belirlenmiştir (Altan, 2009).

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 varlığı ve hastalığı taşıdığına dair ilk bulgular 2010-2011 yıllarında yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir. Altı farklı sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan ilde yapılan sörvey çalışmalarında *Cacopsylla pruni* Adana, Mersin, Bursa ve Yalova illerinde *Prunus spinosa* veya yabani *Prunus* türlerinde bulunurken, Hatay ve Malatya illerinde bulunamamıştır; Mersin ilinden toplanan *C. pruni*'lerin bireysel testleri sonucunda *Ca. Phytoplasma prunorum* içerme oranlarının %23 olduğu tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2011).

Türkiye'de kayısılardan elde edilen üç *Ca. Phytoplasma prunorum*, iki adet armut ve bir *C. pyri*'den elde edilen *Ca. Phytoplasma pyri* izolatlarının *imp*, *aceF*, *pnp* ve *SecY* genleri ile karakterizasyonu çalışmaları sonucu ESFY izolatı I26 adı ile anılan ve diğer Avrupa izolatlarından farklı olan bir grupta yer almıştır (Danet ve ark., 2011).

Türkiye'deki sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli fitoplazma hastalığı *Ca. Phytoplasma prunorum*'un moleküler teşhisi konusunda bazı çalışmalar bulunmasına rağmen, moleküler karakterizasyon ve epidemiyolojik çalışmalar hala eksiktir. Bu hastalıkların yayılması ve vektörleri arasındaki ilişkiler ile Türk izolatlarının tanılanması için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır. ESFY strainleri arasında virülenslik açısından büyük farklar tespit edildiği gibi (Kison ve Seemüller, 2001) genetik varyasyonlar da bildirilmiştir.

Türkiye *Prunus*'ların orijini ve doğu ile batı ülkeleri arasında bir köprü olduğu için, ESFY izolatlarının değişkenliğinin analiz edilmesi, fitoplazmaların çeşitliliğini görmek açısından önemli olacaktır. Ülkemizde farklı bölgelerden elde edilen ESFY

izolatlarının genetik çeşitliliğinin *imp*, *aceF*, *pnp*, *secY* ve *tuf* genleri kullanılarak analiz edilmesi ve diğer ülkelerin bilinen izolatlarıyla kıyaslanması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki materyallerinin toplanması

Ca. Phytoplasma prunorum fitoplazmasının genetik çeşitliliğinin moleküler yöntemlerle araştırılması için, kayısı, şeftali ve erik bitki örnekleri Isparta, Hatay, Yalova, Mersin, Niğde, Muğla, Burdur ve Malatya illerinden toplanmıştır. Toplanan bu örneklerden *Ca. Phytoplasma prunorum* teşhisi amacıyla moleküler testler gerçekleştirilmiştir.

3.2. *Candidatus Phytoplasma prunorum* teşhisi

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Doyle ve Doyle, (1990)'a göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre:

- DNA izolasyonu için yaprağın orta damarı veya sürgünden floem dokusunun kazınması ile elde edilen 0,1 g doku alınarak ve sıvı azotla ezilmiştir. Üzerine 1 ml ezme tampou eklenmiş ve 2 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur.
- Eppendorf tüplerdeki örnekler 60°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Karışım 15000 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Daha sonra üst fazdan 750 µl alınmış ve üzerine 750 µl fenol : chloroform: isoamilalkol (25:24:1) eklenerek karıştırılmış, 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bu işlem bir kez tekrar edilmiştir.
- Üst fazdan 700 µl alınmış ve üzerine 700 µl chloroform: isoamlyalkol (24:1) eklenmiş, karıştırıldıktan sonra 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

- 500 µl üst fazdan alınmış ve üzerine 800 µl izopropanol eklenerek -20 °C de 2 saat bekletilmiştir. Bu şekilde DNA çöktürülmüştür.
- -20°C'den çıkarılan tüpler 15000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden çıkan tüplerdeki üst sıvı faz uzaklaştırılmıştır.
- Çökelti üzerine 1 ml %70'lik soğuk alkol eklenmiş ve çökeltinin yerinden oynamamasına dikkat edilerek tüpler yavaşça alt üst edilip alkol dökülmüştür. Kısa bir santrifüj 'den sonra kalan sıvı pipetle alınmıştır.
- 37 °C de çökelti 20-30 dakika kurutulmuştur.
- Tüplere 80-100 µl TE tamponu eklenerek DNA çözölmüş ve solösyon haline getirilmiştir.
- DNA solösyonu PCR çalışmaları yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. (Nökleik asit ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözelti EK.1' de verilmiştir.)

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction; PCR) işlemi iki aşamada yapılmıştır. Bunlar direk-PCR ve nested-PCR'dir (Lee ve ark., 1992). Direkt-PCR' da 1800 bp ürün veren P1 ve P7 primerleri, nested-PCR' da ise 1050 bp ürün veren apple proliferation grubuna özgü F01 ve R01 primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Direkt-PCR aşamasında nökleik asitler 1/50 oranında sulandırılarak 1 µl DNA 25 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 1xPCR tamponu (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 2 ünite *Taq* DNA polimeraz'dan oluşmuştur. Direkt-PCR döngüsü; 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 57°C'de 2 dakika ve 72 °C'de 3 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikadan oluşmuştur. Direkt-PCR'dan sonra uygulanan nested-PCR'da yukarıda açıklanan reaksiyon karışımına 1/50 oranında sulandırılmış direkt-PCR ürünlerinden 1 µl eklenmiştir. Nested-PCR programında 35 döngölük kısımda denatürasyon 94°C'de 30 saniye ve primerlerin bağlanma sıcaklığı 55°C'de 30 saniye uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. *Candidatus* Phytoplasma prunorum teşhisinde direk- ve nested-PCR analizlerinde kullanılan primerler

	Çoğalan DNA uzunluğu (bp)	Primer Adı	Primer baz dizisi
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- (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)

PCR 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 2 µl yükleme tamponu (6X; 15ml için 150 mg bromophenol blue, 18 g gliserol, 6 ml 50xTAE) ile birlikte 12 µl yüklenen PCR ürünleri, 120 V'da 40 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/µl EtBr içeren 0.5xTAE ortamında 3-5 dakika boyanmıştır (Ek.2). Daha sonra UV altında sonuçlar gözlenerek fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3. Kesilmiş fragmentlerin uzunluğundaki polimorfizm çalışmaları

Kesilen fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism; RFLP) çalışmaları ile F01/R01 primerleriyle elde edilen nested-PCR ürünlerinin RFLP analizi *RsaI* ve *SspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla reaksiyon karışımı; 10 µl nested-PCR ürünü, 0.5 µl enzim, 1.5 µl enzim tamponu, 3 µl d₂H₂O' dan oluşmuştur. *RsaI* ve *SspI* 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 ESFY ile aynı band profili oluşturan örnekler ESFY ile enfekteli kabul edilmiştir (Lee ve ark., 1999).

3.3. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

Genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla PCR işlemi, *tuf* geni için tek aşamada, *imp*, *aceF*, *pnp* ve *secY* genleri için iki aşamada (Direk-PCR ve Nested-PCR) yapılmıştır. Bu genlerin fitoplazmadan çoğaltılmasında kullanılan primerler ve baz dizileri ve ürün boyları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Imp, *aceF*, *pnp* ve *secY* genleri için direkt-PCR aşamasında nükleik asitler sulandırılmadan 1 µl DNA 20 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 1xPCR tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP’ler, 3.5 pmol primerler, 2 ünite *Taq* DNA polimeraz’dan oluşmuştur. Direkt-PCR döngüsü; 95°C’de 3 dakika denatürasyondan sonra, 94°C’de 30 saniye , 50°C’de 30 saniye ve 66 °C’de 45 saniyeden oluşan 20 döngüyü takiben 66°C’de 7 dakikadan oluşmuştur. Nested-PCR da, ilk PCR ürününden 1 µl kullanılarak 95°C’de 3 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra 94°C’de 30 saniye, 50°C’de 30 saniye ve 66 °C’de 45 saniyeden oluşan 35 döngüyü takiben 66°C’de 7 dakikadan oluşmuştur. PCR ürünlerinin %1.2 agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra ethidium bromide ile boyanmış ve sonuçlar UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır.

Tuf geni için, PCR tek aşamada gerçekleştirilmiştir. Nükleik asitler sulandırılmadan 1 µl DNA 20 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 1xPCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP’ler, 3.5 pmol primerler, 2 ünite *Taq* DNA polimeraz’dan oluşmuştur. PCR döngüleri , 95°C’de 3 dakika denatürasyondan sonra, 95°C’de 1 dakika , 50°C’de 1 dakika ve 72 °C’de 1 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C’de 10 dakikadan oluşmuştur. PCR ürünlerinin %1.2 agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra ethidium bromide ile boyanmış ve sonuçlar UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.2. *Candidatus* Phytoplasma prunorum fitoplazma izolatlarının genetik çeşitliliğinin araştırılmasında kullanılan primerler.

Genin adı	Çoğalan DNA uzunluğu (bp)	PCR tipi	Primer adı	Primer baz dizilimi	Literatür
<i>aceF</i>	797	Direct PCR Nested PCR	AceFf1 AceFr1 AceFf2 AceFr2	5'-TAAAATTCGCTGATGTTGGCG-3' 5'-CATCTTTCAATTCATTA AAACTAG-3' 5'-AGGTATTGAAGAAGGAACTG-3' 5'-CAACCGCTTTCATAATAAAAG-3'	Danet ve ark., 2011
<i>Pnp</i>	549	Direct PCR Nested PCR	Pnpf1 Pnpr1 Pnpf2 Pnpr2	5'-GAAGTTGGTATTACTGCTTTAC-3' 5'-GATAAATCTATTTGACCGCG-3' 5'-TACAATTAGATATTAAGTTAAAGG-3' 5'-ATTAATTTTAATACATTTTCGC-3'	Danet ve ark., 2011
<i>secY</i>	664	Direct PCR Nested PCR	SecYMalf1 SecYMalr1 SecYMalf2 SecYMalr2	5'-TTAGGACGTAGTATACAAATCCNTT-3' 5'-ACAATAATTAAAAATCCTGTNCC-3' 5'-AAGAATGGCGTGAACARGGNGA-3' 5'-GCATCTTGTTTAGATAAATGTTC-3'	Danet ve ark., 2011
<i>imp</i> (ESFY)	673	Direct PCR Nested PCR	IMPF1 IMPR1 IMPF2 IMPR2	5'-CAAATGATAAAGCTGATCAA-3' 5'-CCTTTAAGACCACATCCTTTG-3' 5'-CAGTGTATTAAATTAACAATG-3' 5'-CCATCATTACAAC TAAACAT-3'	Danet ve ark., 2011
<i>imp</i> (AP)	670	Direct PCR Nested PCR	IMPF1 IMPR1bis IMPF3 IMPR3mal	5'-CAAATGATAAAGCTGATCAA-3' 5'-CAAGACCTTTAAGGCCACATC-3' 5'-GTTTTATGTTATAATAAACAGTG-3' 5'-CAA ACTATAGTTAAAATTAAAGC-3'	Danet ve ark., 2011
<i>imp</i> (PD)	452	Direct PCR Nested PCR	IMPF2bis IMPR1bis IMPF3pyr IMPR4pyrA	5'-GTATTTAGTTACAATTATTTACTAG-3' 5'-CAAGACCTTTAAGGCCACATC-3' 5'-AGGAGAAAAAATAATGGAAGC-3' 5'-TTGTGTTCTAAAAGTATCAC-3'	Danet ve ark., 2011
<i>Tuf</i>	896	PCR	fTuf rTuf	5'-GCAAATGGACGCTGGTATTT-3' 5'-ACATTATAGAATGGTTAAATAAGC-3'	Marcone ve ark., 2010

3.3.1. Sonuçların Analizi

Nested PCR ile çoğaltılan her bir izolata ait DNA fragmentlerinin baz dizileri tayin edilmek üzere ürünler baz dizisi tayin eden firmalara gönderilmiş ve sonuçlar elektronik posta ile alınmıştır. Çoklu baz dizisi karşılaştırmaları ClustalW 2.0.11 (Larkin ve ark., 2007) ve filogenetik analizler maximum parsimony metodu ile MEGA 5.1 (Kumar ve ark., 2001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Biyolojik indeksleme ve patojenin küsküt ile taşınması

Ca. Phytoplasma prunorum'un biyolojik indekslenmesi için Yalova'dan temin edilen 3 adet fitoplazma izolatu, enfekteli tespit edilen örneklerden yama aşısı yolu ile GF-305 bitkilerine aşılanmıştır. Aşılamayı takip eden 4. ayda ve her 2 ayda bir PCR ile test edilmiştir. İlerleyen dönemlerde simptomolojik olarak takip edilmiştir.

Ca. Phytoplasma prunorum'un küsküt ile taşınması için ilk aşama olarak küsküt yetiştirilmiştir. Patojeni küsküt ile taşımak için öncelikle küsküt elde edilmesi için farklı uygulamalar yapılmıştır.

1. uygulama: Ocak ayında küsküt bitkisinin tohumları petri içindeki filtre kağıtlarının üzerine serpilip üzerine steril saf su eklenmiş ve bu petrilerden 3 tanesi 20 °C'deki, 2 tanesi 15 °C'deki, 2 tanesi de 26.5 °C'deki inkübatöre konulup inkübasyona maruz bırakılmıştır. Ara ara petrilerdeki nem oranı kontrol edilip gerektiğinde steril saf su ilavesi yapılmıştır. İnkübasyon sonucu Şubat ayında petrilerde küsküt gelişimi gözlenmiş ve ticari olarak alınan 6 domates fidesinin yaprakları üzerine petrilerde gelişen küskütler aktarılıp küskütlerin doğal ortamlarda gelişmesi amaçlanmıştır.
2. uygulama: Şubat ayında 5 domates fidesi alınıp fidelerin diplerine küsküt tohumları atılmış ve domates fidelerinin diplerine atılan küsküt tohumlarının gelişip domates fidesine sarılmaları amaçlanmıştır. Gözlemler sonucu gelişen küsküt tohumlarının domates fidelerinin gövdesine sarılıp daha sonra öldüğüdür. Nedeni, küskütlerde görülen mevsimsel dormansidir.

3. uygulama : 2. Uygulama Temmuz ayında tekrar edilmiştir. Ancak bu kez 15 lt'lik saksılara kum+pellet+torf karışımı konulmuş ve saksılara küskütün konukçularından olan biber, domates, patlıcan fideleri ekilmiştir. Bu fidelerin diplerine de küsküt tohumları serpilmiştir.

Küsküt bitkileri geliştirildikten sonra aynı saksı içerisine enfekteli ve sağlıklı cezayir menekşesi bitkileri dikilerek küskütün bu bitkilere sarılması sağlanmıştır. Diğer taraftan aşılama ile inokule edilen GF-305 bitkileriyle aynı saksıya sağlıklı cezayir menekşeleri dikilmiş ve küskütlerin bu bitkilere sarılmaları sağlanmıştır. Bu bitkiler iklim odalarında 25 ± 2 °C'de tutulmuştur. Sağlıklı ve enfekteli bitkilere teması sağlanan küsküt bitkilerinin etmeni sağlıklı bitkilere aktarmaları izlenmiştir (Şekil 3.1). Uygulamadan 3 ay sonra ve bunu izleyen her 2 ayda bir sağlıklı ve enfekteli bitkilere fitoplazma aktarımını kontrol etmek amacıyla PCR testleri uygulanmıştır. Bitkiler simptomolojik olarak takip edilmiştir.

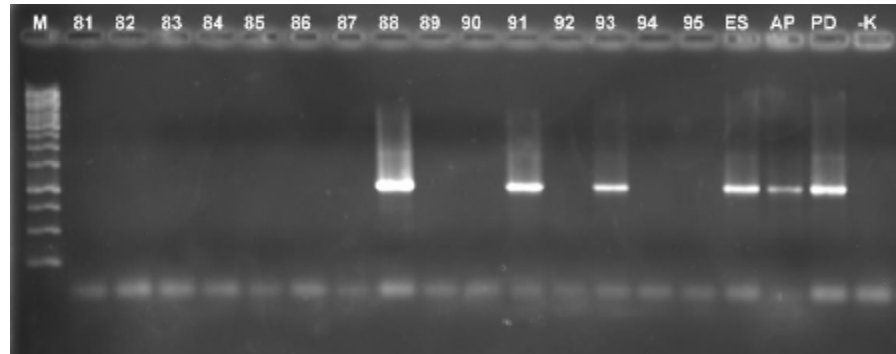


Şekil 3.1. Yonca bitkilerine sarılmış küsküt bitkileri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *Ca. Phytoplasma prunorum* teşhisi çalışmaları

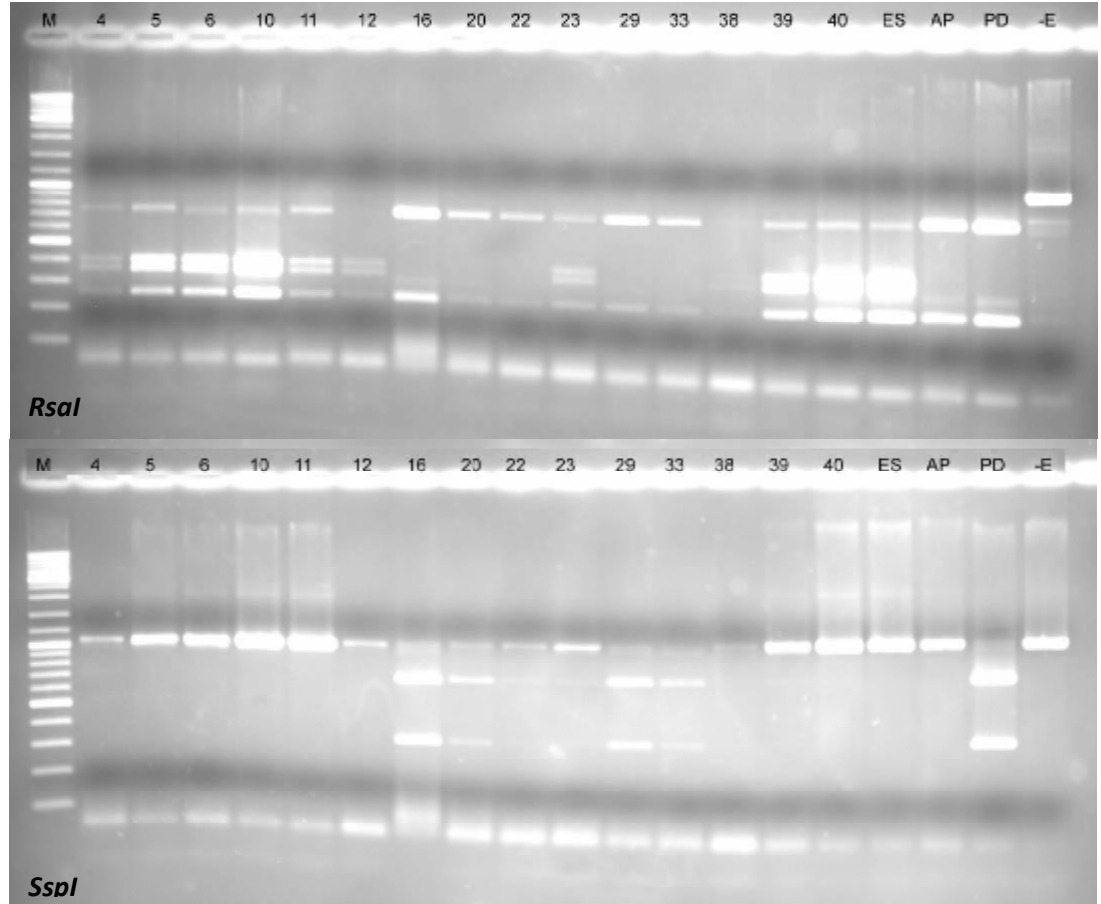
Ca. Phytoplasma prunorum (European stone fruit yellows, ESFY= Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı) fitoplazmasının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla projenin toplam 27 kayısı, 52 şeftali 22 erik ve 6 adet yabani erik olmak üzere Isparta, Hatay, Yalova, Mersin, Niğde, Muğla, Burdur ve Malatya illerinden bitki örnekleri temin edilmiştir (Çizelge 4.1). Temin edilen toplam 107 adet bitki örneğinden DNA ekstraksiyonları yapılarak fitoplazma enfeksiyonları açısından PCR işlemine tabi tutulmuştur. Bu testler sonucu 8 kayısı, 10 şeftali, 7 erikte fitoplazma enfeksiyonu belirlenirken yabani eriklerde tespit edilmemiştir (Şekil 4.1). Tespit edilen bu fitoplazmalardan elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ile *Ca. Phytoplasma prunorum* enfeksiyonları teyid edilmiştir. Bu işlemlerde kontrol amacıyla AP ve PD pozitif örnekleri de kullanılmıştır. F01/R01 PCR ürünlerinin *RsaI* ve *SspI* restriksiyon enzim ile kesilmesi sonucu 10 fitoplazma izolatu ESFY, 5 fitoplazma izolatu ise AP'ye benzer band profili vermiştir. Hiçbir izolat PD profilleri ile aynı sonucu vermemiştir (Şekil 4.2). Araştırılan izolatlar arasında AP benzeri band profillerinin tespit edilmesi bu ağaçlarda *Ca. Phytoplasma mali* enfeksiyonunu göstermektedir. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında *Ca. Phytoplasma mali* enfeksiyonları daha önce de rapor edilmiştir (Mehle ve ark., 2007).



Şekil 4.1. Mersin ilinden toplanan örneklerin PCR ile fitoplazma testi sonuçlarından bir jel görüntüsü. M 100 bp DNA ladder, ES (ESFY), PD ve AP pozitif kontrol, -K negatif kontrol.

Çizelge 4.1. Farklı illerden temin edilen bitki örnekleri ve fitoplazma ile enfeksiyon durumları.

İl	İlçe, köy	Bitki çeşidi								Toplam	
		Kayısı		Şeftali		Erik		Yabani erik			
		topla m	ESFY	toplam	ESFY	toplam	ESFY	toplam	ESFY	Topla m	Fitoplazm
		örnek	pozitif	örnek	pozitif	örnek	Poziti f	örnek	pozitif	Örnek	Pozitif
Niğde	Çamardı	2	0	2	0	0	0	3	0	7	0
	Ulukışla	5	0	6	0	3	1	0	0	14	1
Konya	Karaman	4	0	2	0	0	0	0	0	6	0
	Bozkır	2	0	4	0	3	0	0	0	9	0
Burdur	Söğüt	0	0	3	3	5	1	0	0	8	4
Mersin	Mut, Kırovası	9	3	30	7	11	5	3	0	53	15
Isparta	Eğirdir	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5
Yalova	Merkez	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0
Topla m		27	8	52	10	22	7	6	0	107	25



Şekil 4.2. Sert çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen fitoplazma izolatlarının PCR ürünlerinin *RsaI* ve *SspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu oluşan band profilleri. M 100 bp DNA ladder mix, ES ESFY, PD ve AP pozitif kontrol, -E enzim içermeyen negatif kontrol.

4.2. Küsküt ile taşıma çalışmaları

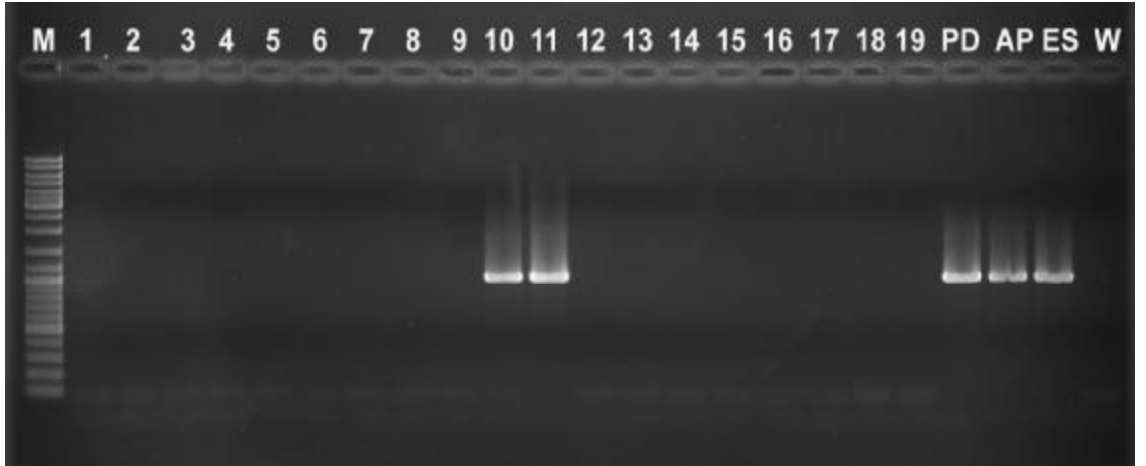
Küsküt geliştirmek amacıyla uygulanan 1. ve 2. uygulamalar sonucu küsküt geliştirilememiştir. Bunun nedeni, küskütlerin canlı bir konukçu olmadan gelişimlerini srdrememeleri veya ksktlerde görülen mevsimsel dormansidir. Uygulanan 3. yöntemde saksılardaki küskütlerin geliştiği ve biber, domates, patlıcan fidelerine sarılıp büyüdüğü gözlenmiştir (şekil 4.3).



şekil 4.3. a) Enfekteli ve sağlıklı bitki arasında köprü oluşturan küsküt, b) Cezayir menekşesi ve GF-305 bitkilerine sarılan küskütler, c) Küsküt ile taşıma çalışmasından genel bir görünüm

Küskütlerin köprü oluşturmāsından 3 ay sonra yapılan PCR testlerinde saēlıklı cezayir menekşesinde enfeksiyon tespit edilememiştir. Bu testler beşinci ve yedinci aylarda da tekrar edilmiş ancak gerek enfekteli bitkide gerekse saēlıklı bitkide *Ca. Phytoplasma prunorum* tespit edilmemiştir. Bu süreçte bitkilerde de herhangi bir simptom gözlenmemiştir. Bu durum, fitoplazma konsantrasyonunun gerek sert çekirdekli meyve ağaçları olan konukçularında gerekse Cezayir menekşesinde her dönemde bitkide yüksek oranda olmamasından kaynaklanabilir. İklim odasında kontrollü koşullarda tutulan bitkilerin doğal koşullara alındığı taktirde sıcak yaz aylarında fitoplazma konsantrasyonlarının artması beklenebilir.

GF-305 bitkilerine aşılama ile inokule edilen 3 adet *Ca. Phytoplasma prunorum* izolatının, inokulasyondan 6 ay sonra yapılan PCR testlerinde pozitif sonuçlar alınmıştır (Şekil 4.4). Bu bitkilerin inokulasyondan 6 ay sonra verdiği simptomlar, bodurlaşma, yaprak ayalarının küçülmesi, yaprakların seyrekleşmesi, yapraklarda sarılık ve kırmızı lekeler şeklinde kaydedilmiştir (Şekil 4.5). Bu enfekteli bitkiler daha sonra küsküt ile fitoplazmanın GF-305 bitkilerinden saēlıklı cezayir menekşelerine taşınmasında da kullanılmıştır. Ancak cezayir menekşesinden cezayir menekşesine taşıma çalışmasında olduğu gibi bu uygulamada da saēlıklı menekşelerde enfeksiyon tespit edilememiştir.



Şekil 4.4. Arazide *Ca. Phytoplasma prunorum* ile enfekteli olduğu tespit edilen bitkilerin GF-305 bitkilerine aşı ile inokulasyonu sonucu elde edilen pozitif sonuçlar, 10 ve 11 nolu örnekler, M 100 bp DNA ladder, PD armut yıkım pozitif kontrol, AP elma çoklu sürgün, ES Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı pozitif kontrol.



Şekil 4.5. *Ca. Phytoplasma prunorum* inokule edilen GF-305 bitkilerinde görülen bodurlaşma ve yaprak ayalarının küçülmesi belirtileri

4.3. Genetik çeşitlilik çalışmaları

Ca. Phytoplasma prunorum fitoplazmasının *imp* geni markörleri ile PCR işlemleri sonucu 12 adet ESFY izolatının nükleik asit dizisi çoğaltılabilmektedir. ESFY fitoplazmasının izolatları aynı zamanda *imp* geninin AP ve PD spesifik primerleri ile de PCR işlemine tabi tutulmuş ve bu işlemlerde PD spesifik primerlerle hiç DNA çoğalması olmazken, 4 adet ESFY izolatında AP spesifik primerlerle de DNA çoğalması sağlanmıştır.

ESFY izolatlarının diğer markör genlerle yapılan PCR işlemlerinde *aceF* ile 10 adet, *Pnp* ile 9 adet, *SecY* ile 7 izolatta DNA çoğalmaları gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2). *Tuf* geni spesifik primerlerle ESFY izolatlarının tamamında herhangi bir DNA çoğalması olmamıştır. Bu nedenle, filogenetik analizlerde bu gen kullanılamamıştır. *Imp*, *aAceF*, *pnp* ve *secY* genlerine spesifik primerlerle ESFY izolatlarından elde

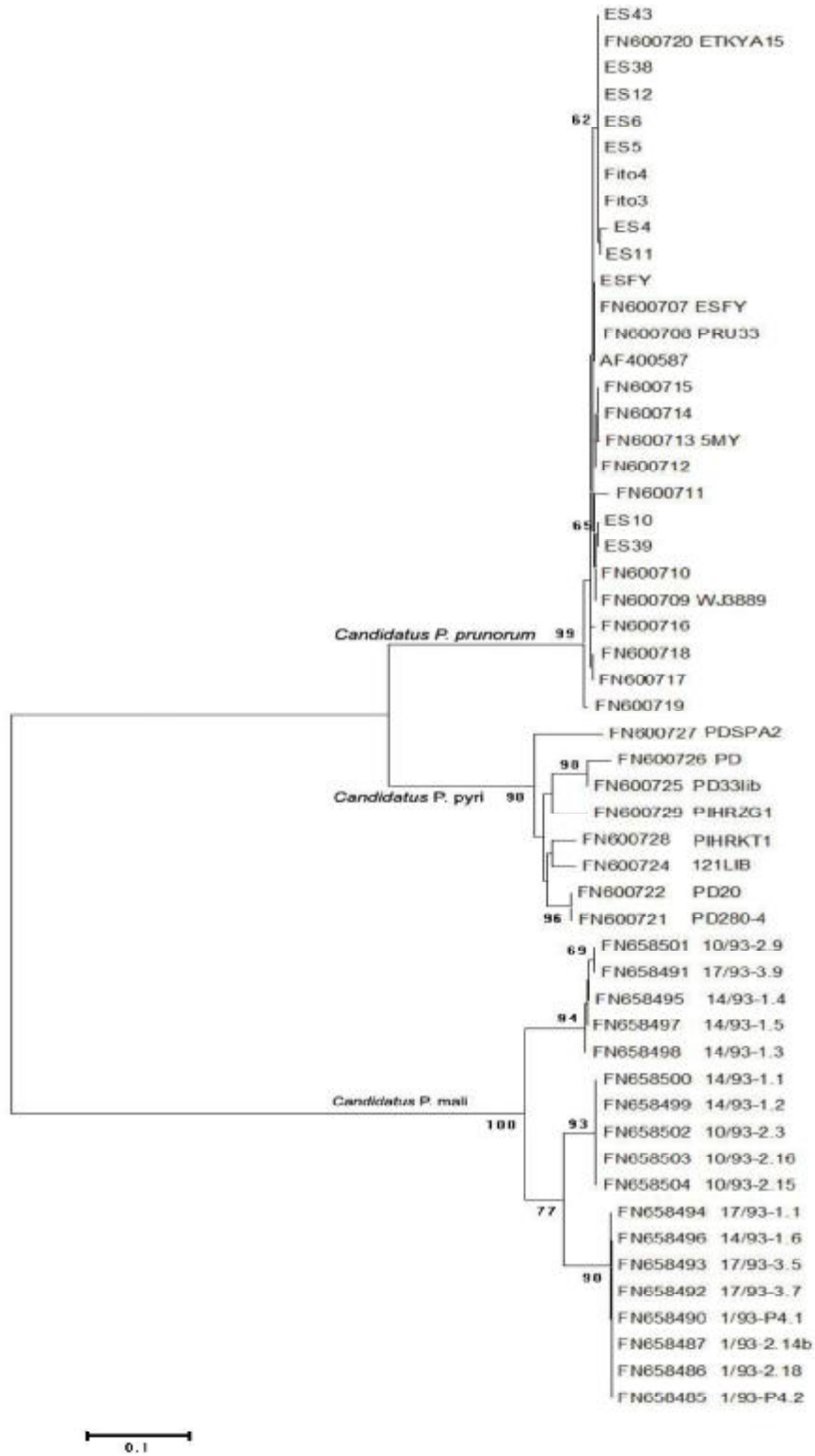
edilen toplam 38 DNA fragmenti DNA dizilimi yapılmak üzere DNA dizileme hizmeti veren firmalara gönderilerek çift yönlü olarak DNA dizileri okutulmuştur.

Yalova'dan 3, Mersin'den 5, Isparta'dan 1 örnekte çoğalan ESFY fitoplazmasının *imp* geni bölgesi, gen bankasına kayıtlı diğer fitoplazma izolatlarının *imp* geni bölgesiyle filogenetik analize tabi tutulmuştur (Şekil 4.6). Analiz sonucunda ülkemizden elde edilen izolatların diğer *Ca. P. prunorum* izolatları ile birlikte bir grup oluşturduğu *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. mali* izolatlarından yüksek bootstrap değerleriyle ayrıldığı belirlenmiştir.

Ca. P. mali izolatlarına özgü *imp* geni primerleri ile elde edilen DNA fragmentlerinin (Fito3 ve Fito4) filogenetik analizinde bu izolatların da *Ca. P. prunorum* olduğu belirlenmiştir. Elde edilen DNA dizilerinin çoklu karşılaştırmaları incelendiğinde Fito3 ve Fito4 izolatlarının DNA dizilerinin *Ca. P. prunorum* izolatları ile aynı olduğu görülmektedir (EK 1). *Ca. P. prunorum* Avrupa, Türkiye ve Azerbaycan'dan temin edilen üç fitoplazmaya ait izolatlarıyla daha önce yapılan bir çalışmada bu fitoplazmalar arasında 30 farklı genotip (I1-I30) tespit edilmiştir (Danet ve ark., 2011). Ülkemiz izolatlarıyla yapılan analizlerde ise araştırılan izolatlar, *imp* genlerine göre belirlenen toplam 30 genotipten (I1-I30) I3 genotipine (2 adet Mersin izolatı), ve I26 genotipine (3 Yalova, 3 Mersin, 1 Isparta) dahil olmuştur. Bu genotiplerden I26 grubu izolatlar sadece Türkiye'de bulunmakta olup Avrupa'da tespit edilememiştir ve çalışılan izolatların 7/9'u bu gruba girmektedir. I3 genotipi ise sadece bir Almanya izolatında belirlenmiş olup çalışılan izolatlardan 2/9'u bu gruba girmiştir. Analiz edilen Türkiye ESFY izolatlarının *imp* genine göre Avrupa izolatlarından farklılık gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.7).

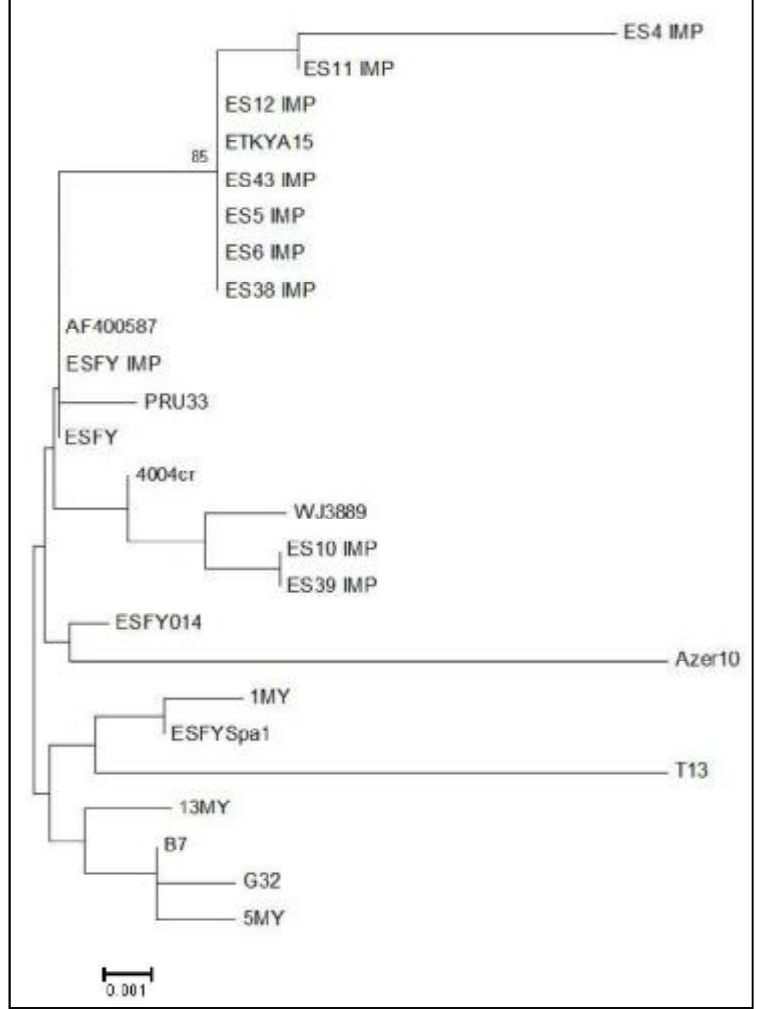
Çizelge 4.2. Kayısı, erik ve şeftali ağaçlarından elde edilen ESFY fitoplazması izolatlarının genetik çeşitlilik çalışmasında markır genlere özgü primerlerin PCR ile çoğaltma yaptığı *Ca. Phytoplasma prunorum* izolatları ve izolatların adlandırılmaları

izolat no	Bitki çeşidi	il	<i>Imp</i> f2/r2	izolat adı	<i>Imp</i> F3/mal	izolat adı	<i>Imp</i> F3pyr/pyrA	<i>AceF</i> f2/r2	izolat adı	<i>Pnp</i> f2/r2	izolat adı	<i>SecY</i> MalF2/R2	izolat adı
ES4	Kayısı	Yalova	+	ES4	-	-	-	+	Fito26	+	Fito62	-	-
ES5	Kayısı	Yalova	+	ES5	+	Fito1	-	+	Fito27	+	Fito63	+	Fito90
ES6	Erik	Yalova	+	ES6	+	Fito2	-	+	Fito28	+	Fito64	+	Fito91
ES10	Kayısı	Mersin	+	ES10	--	-	-	+	Fito29	+	Fito65	+	Fito92
ES11	Kayısı	Mersin	+	ES11	-	-	-	+	Fito30	+	Fito66	+	Fito93
ES12	Kayısı	Mersin	+	ES12	-	-	-	+	Fito35	+	Fito70	-	-
ES13	Kayısı	Mersin	+	ES13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES37	Şeftali	Mersin	+	ES37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ES38	Şeftali	Mersin	+	ES38	-	-	-	+	Fito31	-	-	-	-
ES39	Erik	Mersin	+	ES39	-	-	-	+	Fito32	+	Fito67	+	Fito94
ES43	Kayısı	Isparta	+	ES43	+	Fito3	-	+	Fito33	+	Fito68	+	Fito95
ES45	Erik	Hatay	-	-	+	Fito4	-	-	-	-	-	-	-
ESFY kontrol	cezayir menekşesi	İtalya	+	ESFY	-	-	-	+	Fito34	+	Fito69	+	Fito96



Şekil 4.6. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *imp* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir.

İzolat Adı	Kaynağı (Ülke)	Imp genotipi
ETKYA15	TR	I26
AF400587	UK	I2
PRU33	FR	I2
400cr	FR, CRO, IT, HU	I4
WJ3889	DE	I3
ESFY014	FR	I6
Azer10	AZE	I5
1MY	FR	I12
ESFYSpa1	FR, ESP	I11
T13	FR, CRO, DE, ESP	I13
13MY	FR, CRO, IT	I10
B7	FR, DE, ESP	I9
G32	FR	I8
5MY	FR	I7
ES4	TR (Yalova)	I26
ES5	TR (Yalova)	I26
ES6	TR (Yalova)	I26
ES10	TR (Mersin)	I3
ES11	TR (Mersin)	I26
ES12	TR (Mersin)	I26
ES38	TR (Mersin)	I26
ES39	TR (Mersin)	I3
ES43	TR (Isparta)	I26
ESFY	IT (vinka kontrol)	I2



Şekil 4.7. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *imp* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Tablo kullanılan izolatların kaynağı ve genotip sınıfını göstermektedir. TR Türkiye, FR Fransa, DE Almanya, HU Macaristan, ESP İspanya, IT İtalya, AZE Azerbaycan, CRO Hırvatistan

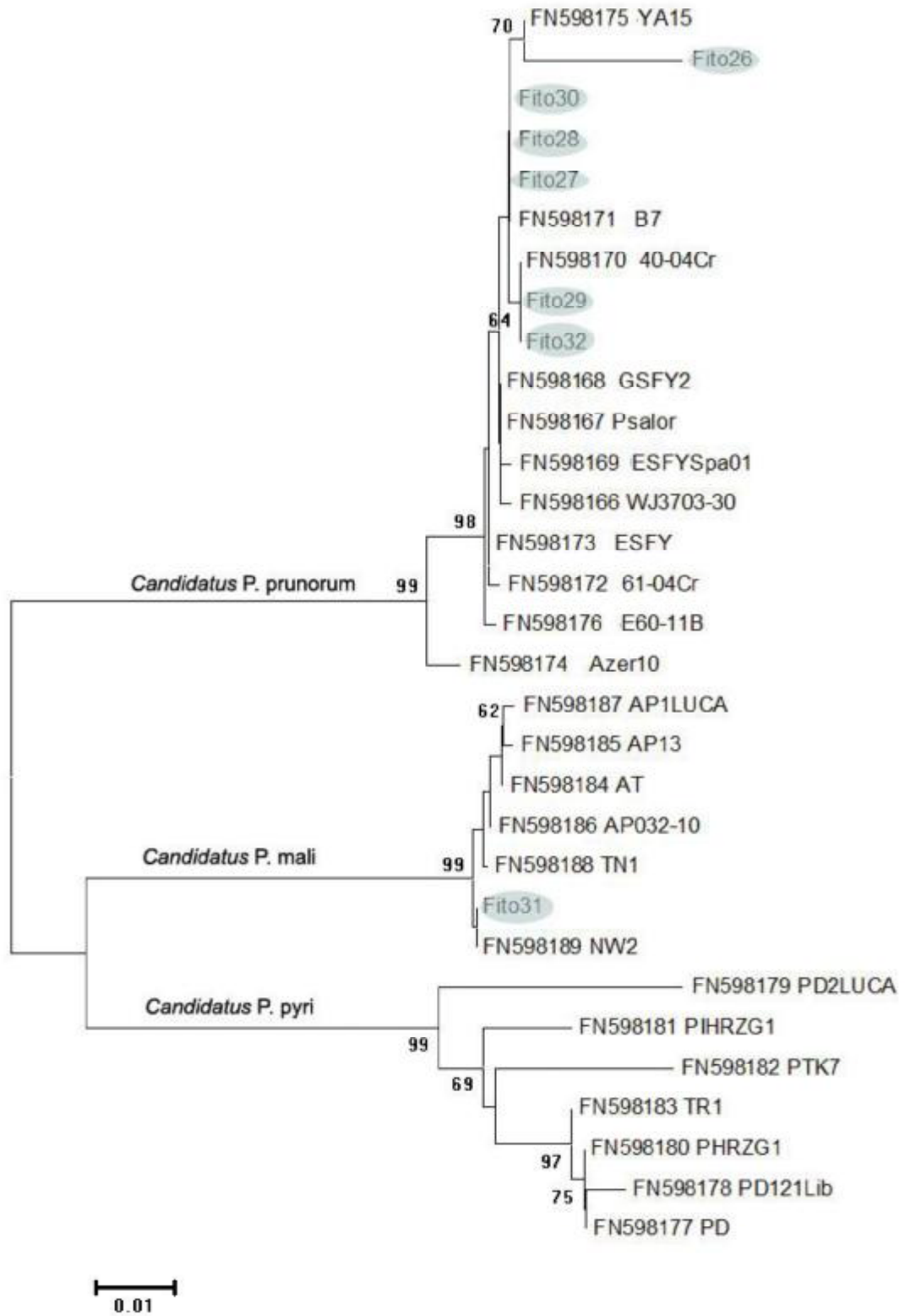
Danet ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada en yaygın genotipin I1 olduğunu ve bu genotipin altı ülkeden gelen 56 bitki ve böcek örneğinde tespit edildiğini, I5 ve I6

genotiplerinin sırasıyla Azerbaycan ve Türkiye’den temin edilen izolatlarda belirlemişler ve bu genotiplerin Avrupa’da tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Yalova’dan 3, Mersin’den 5, Isparta’dan 1 örnekte çoğalan *Ca. P. prunorum* fitoplazmasının *aceF* geni bölgesi, gen bankasına kayıtlı diğer fitoplazma izolatlarının *aceF* geni bölgesiyle filogenetik analize tabi tutulmuştur (Şekil 4.8). Bu analizlerde 8 izolat *Ca. P. prunorum* içerisinde toplanırken bir izolat Fito31 *Ca. P. mali* grubu içinde yer almıştır. Bu izolatin çoklu dizi karşılaştırmalarına bakıldığında (EK 2) elde edilen bu izolata ait DNA dizilerinin *Ca. P. mali* izolatları ile aynı olduğu görülmektedir. Danet ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *aceF* genine göre üç fitoplazmayı 24 genotipe ayırmışlardır. Ülkemiz izolatlarıyla yapılan filogenetik analizde Fito27, Fito28 ve Fito30 izolatları A5 genotipi, Fito29 ve Fito32 izolatları A6 genotipi, Fito 26 izolatu ise A17 genotipi ile aynı grupta yer almıştır. Bunlardan A17 izolatu Danet ve ark. (2011)’nın Türkiye’den temin ettikleri YA15 adlı izolatta belirledikleri genotiptir ve sadece bu izolatta tespit edilen bir genotiptir. Benzer şekilde A6 genotipi içerisinde de bir Türk izolatu yer almaktadır, bununla birlikte Fransa, Almanya, Hırvatistan ve İtalya’dan da izolatlar bulunmaktadır.

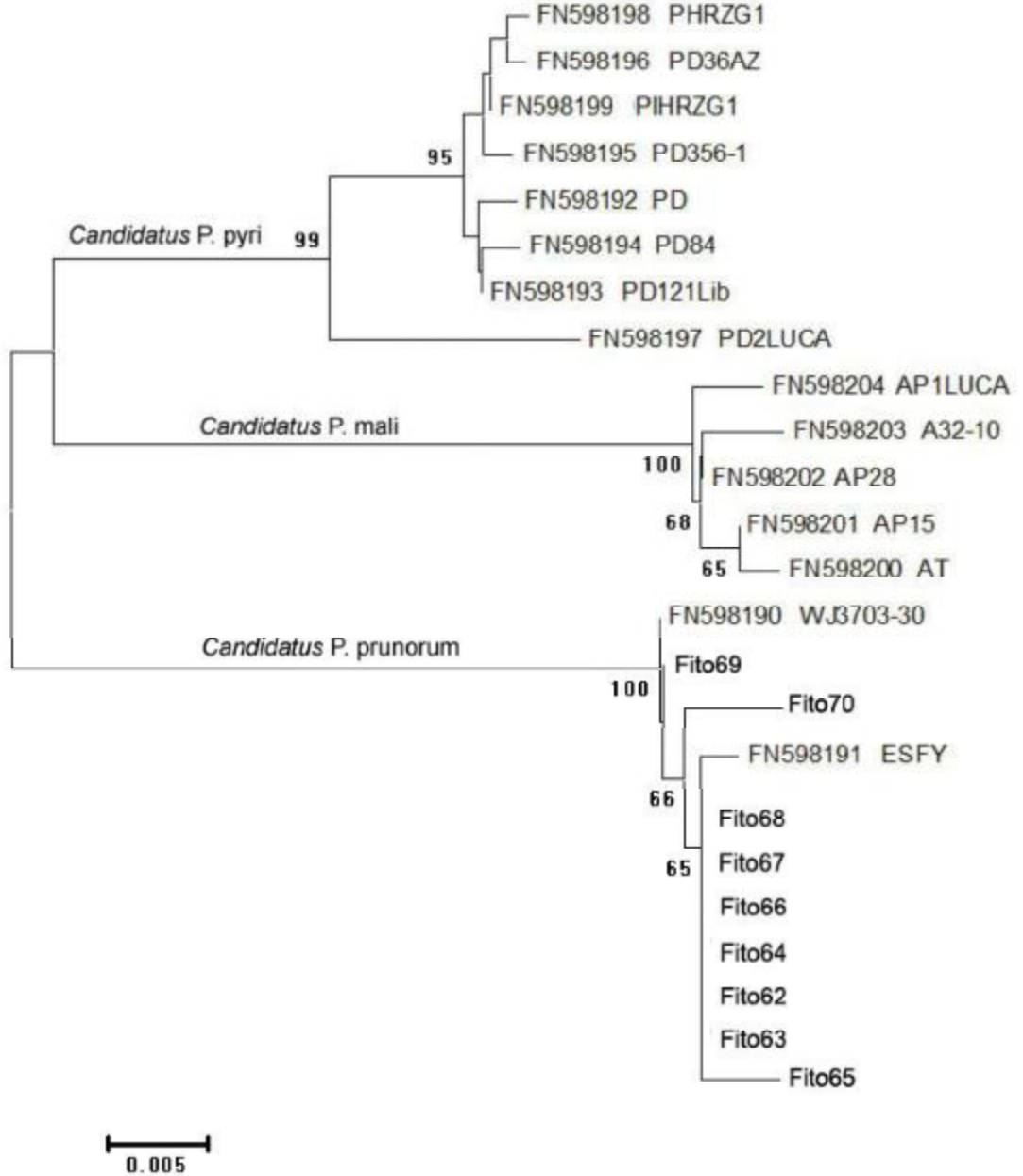
Danet ve ark. (2011) *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. prunorum* arasında türler arası rekombinasyon bildirmiştir. Araştırmacılar *imp*, *aceF*, *pnp* ve *secY* genleri ile yaptıkları çok lokuslu dizi analizlerinde İspanya ve Azerbaycan’dan temin edilen *Ca. P. pyri* izolatlarının hem *Ca. P. prunorum* hem de *Ca. P. pyri* genetik markırlarına sahip olduklarını belirtmişlerdir. Ülkemizden Mersin ilinden temin edilen Fito31 izolatu *Ca. P. prunorum* *imp* genlerine sahipken *aceF* (Şekil 4.8) geni *Ca. P. mali* genotipi içinde yer almıştır. Bu durum *Ca. P. prunorum* ve *Ca. P. mali* arasında türler arası rekombinasyondan kaynaklanabilir. Sert çekirdekli meyvelerde bu iki fitoplazmanın karışık enfeksiyonları daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Mehle ve ark., 2007). Bu tip karışık enfeksiyonlar türler arası rekombinasyonların oluşmasına sebep olabilmektedir.

Ca. P. prunorum izolatlarından *pnp* ve *secY* genlerinden elde edilen DNA dizilerinin filogenetik analizleri, *Ca. P. prunorum*, *Ca. P. mali* ve *Ca. P. pyri* gruplarının oluşumunu onaylamıştır (Şekil 4.9, 4.10). Her bir türün izolatları bir arada gruplar oluşturmuş ve gruplar birbirlerinde yüksek bootstrap değerleriyle ayrılmıştır.

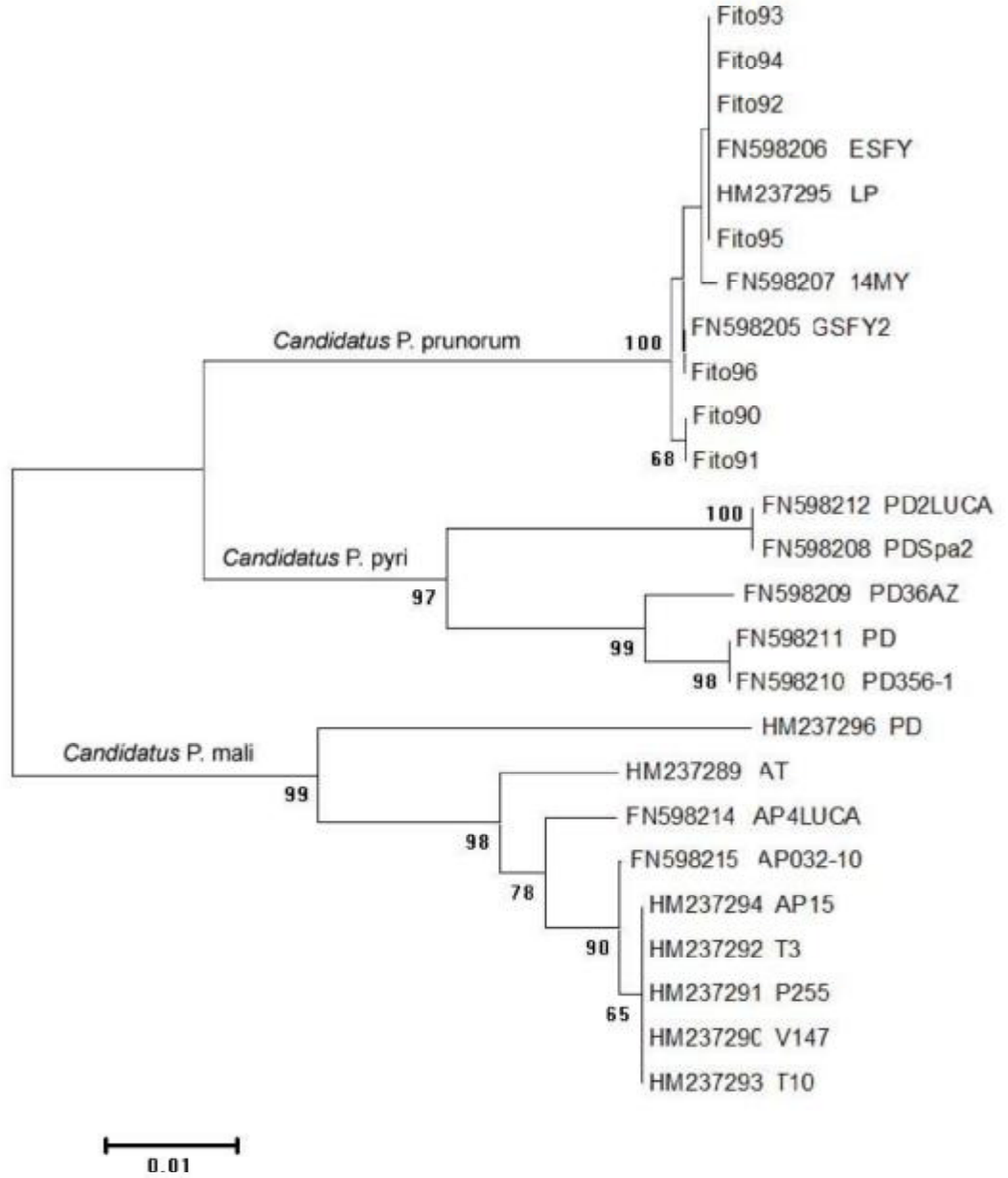


Şekil 4.8. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *aceF* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbeycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir.

Danet ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada bu üç fitoplazma türünün *pnp* ve *secY* analizlerinde genetik farklılığın *imp* ve *aceF* genlerine göre daha az olduğunu bildirmişler, *pnp* geni ile 15 *secY* geni ile 12 genotip belirlemişlerdir. Buna göre ülkemiz izolatları yapılan filogenetik analizlerde P1 ve P2 *pnp* genotiplerine ve S1, S2 ve S3 *secY* genotiplerine dahil olmuşlardır (Şekil 4.9, 4.10).



Şekil 4.9. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *pnp* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir.



Şekil 4.10. *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazmasının *secY* geni bölgesinden elde edilen DNA dizilerinin bazı Avrupa ülkeleri ve Azerbaycan izolatları ile filogenetik analizi. Genbankası dizileri kayıt numaraları ve izolat adları ile birlikte verilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Türkiye’deki sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli fitoplazma hastalığı *Candidatus* Phytoplasma prunorum (European stone fruit yellows; Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı; ESFY)’dur. Ülkemizde bu hastalığın moleküler teşhisi konusunda bazı çalışmalar bulunmasına rağmen, moleküler karakterizasyon ve epidemiyolojik çalışmalar hala eksiktir. Bu hastalıkların yayılması ve vektörleri arasındaki ilişkiler ile Türk izolatlarının tanılanması için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Ca. P. prunorum ırkları arasında virülenslik açısından büyük farklar tespit edildiği gibi (Kison ve Seemüller, 2001) genetik varyasyonlar da bildirilmiştir. Böcek vektörler, konukçu vektörler gibi belli başlı biyolojik özellikler moleküler özelliklerle birlikte tür tanımlamada kullanılmalıdır. Son 10 yıldaki epidemiyolojik çalışmalar, 16S rRNA gen dizisine göre çok yakın akraba farklı fitoplazma ırklarını farklı coğrafik bölgelerde yetiştirilen ürünlere verildiğinde farklı çeşitlerde benzer hastalıkları oluşturduğunu göstermiştir. Hastalık kontrol yöntemlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için farklı fitoplazma ırkları ve bunların tipik ekolojik nişleri arasındaki ilişkinin bilinmesi önemlidir.

Daha önce Danet ve ark (2011) tarafından geliştirilen çok gen lokuslu DNA dizi analizi ile tipleme yöntemi ülkemiz *Ca. Phytoplasma prunorum* izolatlarına uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olmuştur. Ancak Danet ve ark., yaptığı çalışmalarda *Ca. P. prunorum* ile *Ca. P. pyri* arasındaki rekombinasyondan farklı olarak ülkemizde *Ca. P. prunorum* ve *Ca. P. mali* arasında rekombinasyon olabileceği tespit edilmiştir. Çalışılan izolatlar arasında başka rekombinasyon belirlenememiştir. Daha önce Danet ve ark. (2011)’nın tespit ettiği gibi *imp* ve *aceF* genleri yapılan bu çalışmada en değişken markör genler olmuştur, ancak bu iki gen tek başına kullanılmamalıdır. *secY* ve *pnp* genlerinde de farklı gruplanmalar olabileceği için bu 4 genin bir arada kullanılması gereklidir. *Tuf* geni ise yapılan çalışmada tiplemede uygun bulunmamıştır.

Çok gen lokuslu DNA dizi analizi ile tipleme yöntemi özellikle yabani ve kültüre alınan bitkilerin bir arada olduğu bölgelerde epidemiyolojik araştırmalar yapılmasında

oldukça elverişli bir yöntemdir. Ülkemizde *Ca. Phytoplasma prunorum* sert çekirdekli meyve ağaçları dışında yabancı bitkilerden *Prunus spinosa* ve yabancı *Prunus* bitkilerinde de bulunabilmektedir. Çünkü vektörü olan *Cacopsylla pruni* bu bitkileri ziyaret ederek beslenmektedir. Bu beslenmeleri sırasında patojeni de bu bitkilere aktarabilmektedir. Çok gen lokuslu DNA dizi analizi ile tipleme yönteminin psyllid vektörlere de uygulanması ile *Ca. P. prunorum*'un yabancı bitkilerden mi bahçeye yayıldığını tespit etmek mümkün olabilmektedir. Bu nedenle, yapılan çalışmanın devamı olarak vektör psillidlerde de yapılması gerekmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda Türkiye'den temin edilen ve kaynağı *Cacopsylla pyri* olan *Ca. P. pyri* izolatının spesifik bir izolat olduğu, diğer Avrupa izolatlarında farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Danet ve ark., 2011). Bunlar dikkate alındığında yapılan bu çalışmanın *Ca. P. mali* ve *Ca. P. pyri*'nin gerek bitkilerden ve gerekse vektör psillidlerden elde edilen izolatları ile devam ettirilmesi gerekmektedir. Elde edilecek veriler, ülkemizde bu etmenlerin epidemiyolojisi hakkında bilgiler sağlayacaktır.

Sonuç olarak, analiz edilen *Ca. P. prunorum* izolatları Avrupa izolatlarından farklılık göstermektedir. Bu durum, fitoplazmaların epidemiyolojilerinin açıklanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu araştırma ile *Ca. Phytoplasma prunorum*'un diğer ülke izolatlarıyla ilişkisi araştırılmış olup, benzer çalışmaların diğer fitoplazma etmenleri ile de elde edilmesi bu etmenlerin epidemiyolojilerinin açıklanması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Altan, 2009. Mersin ili kayısı damızlık parselinde ve bazı üretici bahçelerinde Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) hastalığının moleküler yöntemlerle testlenmesi. **Yüksek Lisans Tezi**, 35 sayfa.
- Andersen, M.T., Newcomb, R.D., Liefting, L.W. and Beever, R.E. 2006. Phylogenetic analysis of '*Candidatus Phytoplasma australiense*' reveals distinct populations in New Zealand. **Phytopathology** 96: 838-845
- Anonim, 2004. TÜİK, Tarımla Yapı, Üretim, Fiyat, Değer.
- Battle, A., Lavina, A., Marta, F. and Medina, V. 1999. Incidence and epidemiology of pear decline in North-Eastern Spain. **First Internet Conference of Phytopathogenic Mollicutes**.
- Bertaccini, A. 2007 Phytoplasmas, diversity, taxonomy, and epidemiology. **Frontiers of Bioscience** 12: 673-689
- Blomquist, C.L., Kirkpatrick, B.C., 2002. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. **Phytopathology** 92: 1218-1226.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., and Refatti, E., 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. **Journal of Plant Pathology** 80: 233-239.
- Choueiri, E., Salar, P., Jreijiri, F., Zammar, S.E., Danet, J.L. and Foissac, X. 2007. First report and characterization of pear decline phytoplasma on pear in Lebanon. **J. Plant Pathology** 89, S75.
- Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Bragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F. and Mattedi, L. 2007. Transmission of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by root bridges under natural and experimental conditions. **Bull Insectol** 60: 387-388.
- Cornaggia, D., Gentit, P., Boye, R., Desvignes, J.C. 1995. A new phytoplasma disease of apricot tree : the peach vein clearing. **Acta Hort**: 386: 448-453.
- 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.
- Danet, Jean-luc J.L., Bahriz, H., Cimerman, Agnes A., Foissac, Xavier X. (2008) New molecular typing tools to monitor fruit tree phytoplasma variability in the 16SrX taxonomic group. Proceedings of the XXth International symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops - Fruit tree diseases - 2006/05/22-26 ; Antalya (TUR), **Acta Horticulturae**, 781: 343-349.
- Danet, J-L., Balakishiyeva G., Cimerman A., Sauvion N., Marie-Jeanne V., Labonne G., Lavina A., Battle A., Krizanac I., Skoric D., Ermacora E., Ulubaş Serce Ç., Çağlayan K., Jarausch W and Foissac X., 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter species recombination. **Microbiology** 157: 438-450
- Davies, D.L., Guise, C.M., Clark, M.F. and Adams, A.N. 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. **Plant Pathology** 41: 195-203.

- Davis, R.E., Jomantiene, R., Zhao, Y. and Dally, E.L. 2003. Folate biosynthesis pseudogenes, *ψfolP* and *ψfolK*, and an O-sialoglycoprotein endopeptidase gene homolog in the phytoplasma genome. **DNA Cell Biology** 22: 697-706.
- 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.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.
- Dunez, J. 1988. Fruit crop sanitation in the Mediterranean and Near east Region. Status and Requirements. FAO. **United Nations Development Programme**, s. 251-259.
- Ferretti, L., G. Pasquini, G. Albanese, M. Barba. 2007. Molecular investigation on the genetic polymorphism of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' detected in plum and apricot fruit trees
- 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.
- Griffiths, H.M., Sinclair, W.A., Boudon-Padieu, E., Daire, X., Lee, I.-M., Sfalanga, A. and Bertaccini, A. 1999. Phytoplasmas associated with elm yellows. Molecular variability and differentiation from related organisms. **Plant Disease** 83: 1101-1104.
- Gundersen, D.E. Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E. and Kingsbury, D.T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. **Journal of Bacteriology** 176: 5244-5254
- Jarausch, B. and Jarausch, W. 2009. Psyllid vectors and their control. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, pp. 250-271. Edited by Weintraub, P. & Jones, P.. Wallingford. : CABI.
- 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, W., Jarausch-Wegrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C., and Garnier, M., 2001. Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in Southern France. **European J. Plant Path.** 107: 209-217.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F. and Bové, J.-M. 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 2916-2923.
- Jensen, D.D., Griggs, W.H., Gonzales, C.Q. and Schneider, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. **Phytopathology** 54: 1346-1351.

- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows Phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. **J. Phytopathology** 149: 533-541.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R. And Seemüller, E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. **BMC Genomics** 9, 306.
- Kumar, S. ,Tamura, K., Jakobsen, I., Nei, M., 2001. MEGA2 : Molecular Evolutionary genetics analysis, version 2.1.
- Langer, M. and Maixner, M. 2004 Molecular characterization of grapevine yellows associated with phytoplasmas of stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. **Vitis** 43: 185-189.
- 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., and Davis, R.E., Chen, T.-A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., and Schaff, D.A., 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. **Phytopathology** 82, 977-986.
- 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., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. Phytoplasmas, phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology** 54: 221-255
- Lee, I.-M., Gundersen, D.E., Davis, R.E., Bottner, K.D., Marcone, C. and Seemüller, E. 2004b. '*Candidatus Phytoplasma asteris*' , a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 54: 1037-1048
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E. and Gundersen, D.E. 1993 Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology** 83: 834-842.
- Lee, I.-M., Martini, M., Marcone, C. and Zhu, S.F. 2004a. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 54: 337-347
- Lee, I.-M., Zhao, Y. and Bottner, K.D. 2006b. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. **Molecular Cell Probes** 20: 87-91.
- Liu ve ark., 2001. Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. **Molecular Cell Probes** 16: 197-208.
- Lorenz, K.-H., Dosba, F., Poggi Pollini, C., Llacer, G., Seemüller, E., 1994. Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. **Z. Pflkrankh. Pflschutz** 101: 567-575.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U. and Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. **Phytopathology** 85: 771-776.

- Maiden, M.C. J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K. and other authors. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 3140–3145.
- Malinowski, T., Zandarski, J., Komorowska, B., Zawadzka, B., 1996. Detection of pear decline phytoplasma in declining pear trees in Poland. **Plant Dis.** 80, p.464.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring harbour Laboratory. 545 pages.
- Marcone, C., Jarausch, B. and Jarausch, W. 2010. *Candidatus* Phytoplasma prunorum, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. **J. Plant Pathology** 92: 19–34.
- Marcone, C., Lee, I.-M., Davis, R.E., Ragozzino, A. and Seemüller, E. 2000. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 50: 1703-1713.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casatti, P., Bianco, P.A., Benedetti, R. and Bertaccini, A. 2002. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. **Molecular Cell Probes** 16: 197-208.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C. and Osler, R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 2037-2051.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovic, N., Gruden, K., Dreo, T., Zezlina, I., Seljak, G. and Ravnikar, M. 2007. First report of *Candidatus* Phytoplasma mali in *Prunus avium*, *P. armenica* and *P. domestica*. **Plant Pathology** 56:721.
- Morvan, G., Castelain, C., Chastellière, M.G. and Audergon, J.M. 1991. An account of the attempts at controlling apricot chlorotic leaf roll with cross protection. **Acta Horti** 293: 555–561.
- Padovan, A., Gibb, K. and Persley, D. 2000. Association of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ with green petal and lethal yellows diseases in strawberry. **Plant Pathology** 49: 362-369.
- Salar, P., Choueri, E., Jreijiri, F., El Zammar, S., Danet, J., Foissac, X., 2007. Phytoplasmas in Lebanon : characterization of *Candidatus* Phytoplasma pyri and stolbur phytoplasma respectively associated with pear decline and grapevine bois noir diseases. **Bulletin of Insectology** 60(2): 357-358.
- Schneider, B. and Seemüller, E. 2009. Strain differentiation of *Candidatus* Phytoplasma mali by SSCP and sequence analyses of the hflB gene. **J. Plant Pathology** 91: 103–112.
- Schneider, B., Aherns, U., Kirkpatrick, B.C. and Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. **Journal of General Microbiology** 139: 519-527
- Schneider, B., Gibb, K.S. and Seemüller, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. **Microbiology** 143: 3381-3389

- Seemüller, E. 1990. Apple proliferation. In Compendium of Apple and Pear Diseases edited by Jones, A. L. & Aldwinkle, H. S., pp. 67–68. St Paul, USA. : American Phytopathological Society.
- Seemüller, E. and Schneider, B. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus* Phytoplasma mali ', the apple proliferation agent. **Phytopathology** 97: 964–970.
- 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.
- 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 Ppear by PCR-RFLP analysis in Turkey. **Phytoparasitica** 33: 380-390.
- Sertkaya, G., Martini, M., Osler, R., 2008. First report of *Candidatus* Phtoplasma mali in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 90(1): 143-149.
- Shao, J., Jomantiene, R., Dally, E.L., Zhao, Y., Lee, I.-M., Nuss, D.L. and Davis, R.E. 2006. Phylogeny and characterization of phytoplasmal NusA and use of the nusA gene in detection of group 16SrI strains. **Journal of Plant Pathology** 88: 193-201
- Sharbatkhari, M., Bahar, M. and Ahoonmanesh, A. 2008. Detection of the phytoplasmal agent of pear decline in Iran, Isfahan province, using nested-PCR. **International Journal of Plant Production** 2: 167–173.
- Shen, W.C. and Lin, C.P. 1993. Production of monoclonal-antibodies aganist a mycoplasmalike organism associated with sweet-potato witches-broom. **Phytopathology** 83: 671-675.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B.C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23SrRNA spacer region. **Appl. Environ. Microbiol** 62: 2988-2993.
- Streten, C. and Gibb, K.S. 2005. Genetic variation in *Candidatus* Phytoplasma australiense. **Plant Pathology** 54: 8-14.
- Ulubaş Serçe, Ç., 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., Yvon, M., Kaya, K., Gazel, M., Can Cengiz, F., Çağlayan, K., Sauvion, N., 2011. Survey on the presence of *Cacopsylla pruni* in Turkey: preliminary results. **Bulletin of Insectology** 64 (Supplement): 145-146.
- Urwin, R. and Maiden, M.C.J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiology** 11: 479–487.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.-M. and Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of ,16s rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 1855-1867.
- Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R.E., Suo, X. and Zhao, Y. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and

- distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 58: 2368-2377.
- Weintraub, P.G. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. **Annual Review of Entomology** 51: 91-111.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P. and Oyaizu, H. et al. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas, basis for their classification. **Journal of Bacteriology** 171: 6455-6467
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X. and Davis, R.E. 2009b. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan ve yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgilerini esirgemeyen hocamlarım Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a , Doç. Dr. Mona GAZEL'e ve Doç. Dr. İlhan ÜREMİŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Labaratuar çalışmalarımnda bana yardımcı olan arkadaşlarım Ziraat Yüksek Müh. Şefika YAVUZ'a ve Ziraat Yüksek Müh. Hacer GÜLTEKİN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay ilinin Antakya ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antakya ilçesinde tamamladım. 2009 yılında HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Ziraat Mühendisi ünvanıyla mezun oldum. 2009 yılı Bahar döneminde Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Fitopatoloji alanında Yüksek Lisans'a başladım. 2011 yılında mezun oldum.

EKLER

EK 1. *Candidatus* Phytoplasma prunorum'un *imp* geninin gen bankasından sağlanan diğer izolat ve *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. mali* izolatlarının genleri ile çoklu dizi karşılaştırmaları

Fito4_IMP	-----T
Fito3_IMP	-----AAT
ES4_IMP	TAGAATATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES5_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES6_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES10_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES11_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES12_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES38_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES39_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ES43_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
ESFY_IMP	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600720_ETKYA15	-----TAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600719	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600718	-----TTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600717	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600716	-----CAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600715	--GATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600714	-----TATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600712	-----TAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600711	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAGAAA-T
FN600710	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600708_PRU33	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600709_WJ3889	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600707_ESFY	-----TATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
AF400587	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN600713_5MY	TAGATTATTATAATTTAATATAAAAAATATTCAAAGAGGAGAAAAAAAT
FN658504maliimp10/93-2.15	-----
FN658503maliimp10/93-2.16	-----
FN658502maliimp10/93-2.3	-----
FN658501maliimp10/93-2.9	-----
FN658500maliimp14/93-1.1	-----
FN658499maliimp14/93-1.2	-----
FN658498maliimp14/93-1.3	-----
FN658497maliimp14/93-1.5	-----
FN658496maliimp14/93-1.6	-----
FN658495maliimp14/93-1.4	-----
FN658494maliimp17/93-1.1	-----
FN658493maliimp17/93-3.5	-----
FN658492maliimp17/93-3.7	-----
FN658491maliimp17/93-3.9	-----
FN658490maliimp1/93-P4.1	-----
FN658487maliimp1/93-2.14b	-----
FN658486maliimp1/93-2.18	-----
FN658485maliimp1/93-P4.2	-----
FN600729pyriimpPIHRZG1	-----
FN600728pyriimpPIHRKT1	-----
FN600727pyriimpgenePDSPA2	-----
FN600726pyriimpPD	-----TTTAAAAATATTTTAAAAAAGGAGAAAAAAAT
FN600725pyriimpPD33lib	-----
FN600724pyriimp121LIB	-----
FN600722pyriimpPD20	-----
FN600721pyriimpPD280-4	-----
Fito4_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
Fito3_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES4_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES5_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES6_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES10_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTACAGCAGTTGGGTCAATTTTTG
ES11_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES12_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES38_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ES39_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTACAGCAGTTGGGTCAATTTTTG
ES43_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG
ESFY_IMP	AATGGAACAAACCAACAAAAAATGCTTATAGTAGTTGGGTCAATTTTTG

[illegible][illegible]

Fito4_IMP
Fito3_IMP
ES4_IMP
ES5_IMP
ES6_IMP
ES10_IMP
ES11_IMP
ES12_IMP
ES38_IMP
ES39_IMP
ES43_IMP
ESFY_IMP
FN600720_ETKYA15
FN600719
FN600718
FN600717
FN600716
FN600715
FN600714
FN600712
FN600711
FN600710
FN600708_PRU33
FN600709_WJ3889
FN600707_ESFY
AF400587
FN600713_5MY
FN658504maliimp10/93-2.15
FN658503maliimp10/93-2.16
FN658502maliimp10/93-2.3
FN658501maliimp10/93-2.9
FN658500maliimp14/93-1.1
FN658499maliimp14/93-1.2
FN658498maliimp14/93-1.3
FN658497maliimp14/93-1.5
FN658496maliimp14/93-1.6
FN658495maliimp14/93-1.4
FN658494maliimp17/93-1.1
FN658493maliimp17/93-3.5
FN658492maliimp17/93-3.7
FN658491maliimp17/93-3.9
FN658490maliimp1/93-P4.1
FN658487maliimp1/93-2.14b
FN658486maliimp1/93-2.18
FN658485maliimp1/93-P4.2
FN600729pyriimpPIHRZG1
FN600728pyriimpPIHRKT1
FN600727pyriimpgenePDSPA2
FN600726pyriimpPD
FN600725pyriimpPD33lib
FN600724pyriimp121LIB
FN600722pyriimpPD20

[illegible][illegible]

[illegible][illegible]

Fito4_IMP
Fito3_IMP
ES4_IMP
ES5_IMP
ES6_IMP
ES10_IMP
ES11_IMP
ES12_IMP
ES38_IMP
ES39_IMP
ES43_IMP
ESFY_IMP
FN600720_ETKYA15
FN600719
FN600718
FN600717
FN600716
FN600715
FN600714
FN600712
FN600711
FN600710
FN600708_PRU33
FN600709_WJ3889
FN600707_ESFY
AF400587
FN600713_5MY
FN658504maliimp10/93-2.15
FN658503maliimp10/93-2.16
FN658502maliimp10/93-2.3
FN658501maliimp10/93-2.9
FN658500maliimp14/93-1.1
FN658499maliimp14/93-1.2
FN658498maliimp14/93-1.3
FN658497maliimp14/93-1.5
FN658496maliimp14/93-1.6
FN658495maliimp14/93-1.4
FN658494maliimp17/93-1.1

[illegible]

Fito4_IMP
Fito3_IMP
ES4_IMP
ES5_IMP
ES6_IMP
ES10_IMP
ES11_IMP
ES12_IMP
ES38_IMP
ES39_IMP
ES43_IMP
ESFY_IMP
FN600720_ETKYA15
FN600719
FN600718
FN600717
FN600716
FN600715
FN600714
FN600712
FN600711
FN600710
FN600708_PRU33
FN600709_WJ3889
FN600707_ESFY
AF400587
FN600713_5MY
FN658504maliimp10/93-2.15
FN658503maliimp10/93-2.16
FN658502maliimp10/93-2.3
FN658501maliimp10/93-2.9
FN658500maliimp14/93-1.1
FN658499maliimp14/93-1.2
FN658498maliimp14/93-1.3
FN658497maliimp14/93-1.5
FN658496maliimp14/93-1.6
FN658495maliimp14/93-1.4
FN658494maliimp17/93-1.1
FN658493maliimp17/93-3.5
FN658492maliimp17/93-3.7
FN658491maliimp17/93-3.9
FN658490maliimp1/93-P4.1
FN658487maliimp1/93-2.14b
FN658486maliimp1/93-2.18
FN658485maliimp1/93-P4.2
FN600729pyriimpPIHRZG1
FN600728pyriimpPIHRKT1
FN600727pyriimpgenePDSPA2
FN600726pyriimpPD
FN600725pyriimpPD33lib
FN600724pyriimp12LIB
FN600722pyriimpPD20
FN600721pyriimpPD280-4

TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTAGCCA--TAAATCTCTCTTTAAATA--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TCGACCAATTATTAACTTTTTTATCTA--TAAATCTCTCTTTAAATT--
TTGAAGATTTTTAAAAGCTGCAAAATAAATACAAACAAAACAGAAC--
TTGAAGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAAACCAAACACAGAAC--
TTGAAGATTTTATAACAGCTGCAAAAAAATTAACCAAAACACAGAAC--
TTGAAGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAACCAAACACAGAAC--
TTGAAGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAACCAAACACAGAAC--
TTGAAGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAACCAAACACAGAAC--
TTGACGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAACCAAACACAGAAC--
TTGACGATTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATTAACCAAACACAGAAC--

[illegible]

AGGGAAAATTAAACAGCAATAAAACATTAAACAGATTATAA---TGAAG
AGGGAAAATTAAACAGCAATAAAACATTAAACAGATTATAA---TGAAG
AGGGAAAATTAAACAGCAATAAAACATTAAACAGATTATAA---TGAAG
AGGGAAAATTAAACAGCAATAAAACATTAAACAGATTATAA---TGAAG

[illegible]

[illegible][illegible]

ES43_IMP	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
ESFY_IMP	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600720_ETKYA15	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600719	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600718	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600717	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600716	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600715	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600714	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600712	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600711	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600710	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600708_PRU33	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600709_WJ3889	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600707_ESFY	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
AF400587	ACTAATCTAATTATCATATATTTATTAAAAATAAATATATATTTTTTTTA
FN600713_5MY	-----
FN658504maliimp10/93-2.15	-----
FN658503maliimp10/93-2.16	-----
FN658502maliimp10/93-2.3	-----
FN658501maliimp10/93-2.9	-----
FN658500maliimp14/93-1.1	-----
FN658499maliimp14/93-1.2	-----
FN658498maliimp14/93-1.3	-----
FN658497maliimp14/93-1.5	-----
FN658496maliimp14/93-1.6	-----
FN658495maliimp14/93-1.4	-----
FN658494maliimp17/93-1.1	-----
FN658493maliimp17/93-3.5	-----
FN658492maliimp17/93-3.7	-----
FN658491maliimp17/93-3.9	-----
FN658490maliimp1/93-P4.1	-----
FN658487maliimp1/93-2.14b	-----
FN658486maliimp1/93-2.18	-----
FN658485maliimp1/93-P4.2	-----
FN600729pyriimpPIHRZG1	-----
FN600728pyriimpPIHRKT1	-----
FN600727pyriimpgenePDSPA2	-----
FN600726pyriimpPD	AAAATACTAACTAAATATATATTTATTTTAAATAAATATATTATTAGAAT
FN600725pyriimpPD33lib	-----
FN600724pyriimp121LIB	-----
FN600722pyriimpPD20	-----
FN600721pyriimpPD280-4	-----
Fito4_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATAATGTTTTAGTTGTAATGATGGTT
Fito3_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATAATGTTTTATTTGTAATGGGGTTT
ES4_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES5_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES6_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES10_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES11_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES12_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES38_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES39_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ES43_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
ESFY_IMP	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600720_ETKYA15	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600719	GTTAGTATTTTTTTATGATTAATATTAATA-----
FN600718	GTTAGAATTTTTTTATTTTA-----
FN600717	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600716	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600715	GTTAGTATTTTTTTATT-----
FN600714	GTTAGTATTTTTTTATAAT-----
FN600712	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATAATGTTTTAGTTGTA-----
FN600711	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATAAG-----
FN600710	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600708_PRU33	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600709_WJ3889	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN600707_ESFY	GTTAG-----
AF400587	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATAATGTTTTAGTTGTAATGATGGTT
FN600713_5MY	GTTAGTATTTTTTTATTTTAATATTAATA-----
FN658504maliimp10/93-2.15	-----
FN658503maliimp10/93-2.16	-----
FN658502maliimp10/93-2.3	-----

FN658501maliimp10/93-2.9	-----
FN658500maliimp14/93-1.1	-----
FN658499maliimp14/93-1.2	-----
FN658498maliimp14/93-1.3	-----
FN658497maliimp14/93-1.5	-----
FN658496maliimp14/93-1.6	-----
FN658495maliimp14/93-1.4	-----
FN658494maliimp17/93-1.1	-----
FN658493maliimp17/93-3.5	-----
FN658492maliimp17/93-3.7	-----
FN658491maliimp17/93-3.9	-----
FN658490maliimp1/93-P4.1	-----
FN658487maliimp1/93-2.14b	-----
FN658486maliimp1/93-2.18	-----
FN658485maliimp1/93-P4.2	-----
FN600729pyriimpPIHRZG1	-----
FN600728pyriimpPIHRKT1	-----
FN600727pyriimpgenePDSPA2	-----
FN600726pyriimpPD	AGTATTTTTTTTATTTTAA-----
FN600725pyriimpPD33lib	-----
FN600724pyriimp121LIB	-----
FN600722pyriimpPD20	-----
FN600721pyriimpPD280-4	-----
-	

EK 2. *Candidatus* Phytoplasma prunorum'un *aceF* geninin gen bankasından sağlanan diğer izolat ve *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. mali* izolatlarının genleri ile çoklu dizi karşılaştırmaları

FN598176prunorumE60-11B	NNNNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598175prunorumYA15	-NNNNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598174prunorumAzer10	-----NTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598173prunorumESFY	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598172prunorum61-04Cr	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598171prunorumB7	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598170prunorum40-04Cr	-----NTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598169prunorumESFYSpa01	NNNNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598168prunorumGSFY2	-NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598167prunorumPsalor	-----NTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598166prunorumWJ3703-30	NNNNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito26	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito27	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito28	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito29	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito30	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito31	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
Fito32	--NNNNNNNNNNNNNTTAAATTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598183pyriTR1	-NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598182pyriPTK7	-NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598181pyriPIHRZG1	-NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598180pyriPHRZG1	NNNNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598179pyriPD2LUCA	-NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598178pyriPD121Lib	--NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598177pyriPD	-NNNNNNNNNNNNNTTAAAGTTGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598189maliNW2	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598188maliTN1	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598187maliAP1LUCA	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598186maliAP032-10	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598185.maliAP13	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598184maliAT	-NNNNNNNNNNNNNTTCAAATCGGTGATAAAGTTAAAGAAGGTGATATT
FN598176prunorumE60-11B	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598175prunorumYA15	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598174prunorumAzer10	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598173prunorumESFY	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598172prunorum61-04Cr	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598171prunorumB7	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598170prunorum40-04Cr	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598169prunorumESFYSpa01	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598168prunorumGSFY2	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598167prunorumPsalor	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598166prunorumWJ3703-30	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito26	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito27	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito28	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito29	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito30	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito31	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
Fito32	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598183pyriTR1	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598182pyriPTK7	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598181pyriPIHRZG1	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598180pyriPHRZG1	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598179pyriPD2LUCA	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598178pyriPD121Lib	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598177pyriPD	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598189maliNW2	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598188maliTN1	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598187maliAP1LUCA	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598186maliAP032-10	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598185.maliAP13	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598184maliAT	TTAGTTACTGTAGAAACAGATAAAGTGAATTCAGACGTATCAGCTCCAAT
FN598176prunorumE60-11B	AAACGGTTTTATTACTAAATTACAAGTTAAAGAAGGTGATGATTTATG
FN598175prunorumYA15	AAACGGTTTTATTACTAAATTACAAGTTAAAGAAGGTGATGATTTATG
FN598174prunorumAzer10	AAACGGTTTTATTACTAAATTAGAAGTTAAAGAAGGTGATGATTTATG
FN598173prunorumESFY	AAACGGTTTTATTACTAAATTACAAGTTAAAGAAGGTGATGATTTATG

Fito29	TTGAATATGA---AAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAATATGAAGACAA
Fito30	TTGAATATGA---AAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAATATGAAGACAA
Fito31	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
Fito32	TTGAATATGA---AAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAATATGAAGACAA
FN598183pyriTR1	TTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAACACAAAGATAA
FN598182pyriPTK7	TTAAATACTA---AATTATCTGATGAAAATGAATTAACACAAAGATAA
FN598181pyriPIHRZG1	TTAAATACTA---AATTATCTGATGAAAATGAATTAACACAAAGATAA
FN598180pyriPHRZG1	TTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAGATGAATTAACACAAAGATAA
FN598179pyriPD2LUCA	TTAAATACGA---AATTATCTAATGAAAATGAATTAACATAAAGATAA
FN598178pyriPD121Lib	TTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAACACAAAGATAA
FN598177pyriPD	TTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAACACAAAGATAA
FN598189maliNW2	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598188maliTN1	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598187maliAP1LUCA	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598186maliAP032-10	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598185.maliAP13	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598184maliAT	-----T-----GAATTAATAAAGCAGATAA
FN598176prunorumE60-11B	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598175prunorumYA15	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598174prunorumAzer10	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598173prunorumESFY	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598172prunorum61-04Cr	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598171prunorumB7	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598170prunorum40-04Cr	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598169prunorumESFYSpa01	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598168prunorumGSFY2	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598167prunorumPsalor	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598166prunorumWJ3703-30	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito26	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito27	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito28	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito29	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito30	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito31	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
Fito32	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598183pyriTR1	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATCA
FN598182pyriPTK7	AGAAGATAATGCAGGAGTAGTAGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598181pyriPIHRZG1	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTGGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598180pyriPHRZG1	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTGGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATCA
FN598179pyriPD2LUCA	AGAAGATGATGCGGGAGTAGTGGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598178pyriPD121Lib	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTGGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATCA
FN598177pyriPD	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTGGGTGAATTTAGAAAATCTCTCAAATCA
FN598189maliNW2	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTTGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598188maliTN1	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598187maliAP1LUCA	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598186maliAP032-10	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598185.maliAP13	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598184maliAT	AGAAGATGATGCAGGAGTAGTCGGAGATTTAGAAAATCTCTCAAATTA
FN598176prunorumE60-11B	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598175prunorumYA15	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598174prunorumAzer10	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598173prunorumESFY	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598172prunorum61-04Cr	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598171prunorumB7	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598170prunorum40-04Cr	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598169prunorumESFYSpa01	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598168prunorumGSFY2	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598167prunorumPsalor	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598166prunorumWJ3703-30	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito26	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito27	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito28	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito29	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito30	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito31	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
Fito32	TAGAAACATTTGATGATAATCATATTTCAAACGAAATTAATAATTTAAGT
FN598183pyriTR1	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT
FN598182pyriPTK7	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT
FN598181pyriPIHRZG1	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT
FN598180pyriPHRZG1	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT
FN598179pyriPD2LUCA	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT
FN598178pyriPD121Lib	TAGAAACATTTAGTGATAATCATATTTAAACAAAATTA---ATTCAAAT

FN598179pyriPD2LUCA	ATTGTTCCCTACTACTCTATTAAATGAAATAAATATCGATGATTTAGTATT
FN598178pyriPD121Lib	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTAGTATC
FN598177pyriPD	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTAGTATC
FN598189maliNW2	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598188maliTN1	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598187maliAP1LUCA	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598186maliAP032-10	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598185.maliAP13	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598184maliAT	ATTGTTCCCTACTACTTTTATTAAATGAAATAAATATTGATAATTTGATAGC
FN598176prunorumE60-11B	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598175prunorumYA15	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598174prunorumAzer10	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598173prunorumESFY	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598172prunorum61-04Cr	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598171prunorumB7	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598170prunorum40-04Cr	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598169prunorumESFYSpa01	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598168prunorumGSFY2	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598167prunorumPsalor	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598166prunorumWJ3703-30	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito26	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito27	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito28	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito29	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito30	ATTTAGAGAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito31	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
Fito32	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCATATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598183pyriTR1	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATCTGAAGCAGATTATAAAAAATATTAAATTAA
FN598182pyriPTK7	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATCTGAAGCAGATTATAAAAAATATTAAATTAA
FN598181pyriPIHRZG1	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATTTGAAGCAGATTATAAAAAATATTAAATTAA
FN598180pyriPHRZG1	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598179pyriPD2LUCA	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATTTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598178pyriPD121Lib	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATCTGAAGTAGATTATAAAAAATATTAAATTAA
FN598177pyriPD	ATTTAGAAAAAAATTAAAAATCTGAAGCAGATTATAAAAAATATTAAATTAA
FN598189maliNW2	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598188maliTN1	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598187maliAP1LUCA	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598186maliAP032-10	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598185.maliAP13	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA
FN598184maliAT	ATTTAGGAAAAAATTAAAAATTGAAGCAGATTCTAAAAATATTAAATTAA

EK 3. *Candidatus* Phytoplasma prunorum'un *pnp* geninin gen bankasından sağlanan diğer izolat ve *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. mali* izolatlarının genleri ile çoklu dizi karşılaştırmaları

62_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
63_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
64_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
65_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACCTTTGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
66_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
67_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
68_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
69_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
70_pnp	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598191ESFY	-AAATTAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598190WJ3703-30	-AAGTTAAAGGAATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598204malipnpAP1LUCA	-AAGTTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTGAACAACAGC
FN598203malipnpA32-10	-AAGTTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTGAACAACAGC
FN598202malipnpAP28	-AAGTTAAAGGCATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTGAACAACAGC
FN598201malipnpAP15	-AAATTAAGGCATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTGAACAACAGC
FN598200malipnpAT	-AAATTAAGGCATTACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTGAACAACAGC
FN598199pyripnpPIHRZG1	AAAGTTAAAGGAATAACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598198pyripnpPHRZG1	AAAGTTAAAGGAATAACCTTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598197pyripnpPD2LUCA	AAAGTTAAAGGAATAACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598196pyripnpPD36AZ	AAAGTTAAAGGAATAACGTTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598195pyripnpPD356-1	AAAGTTAAAGGAATAACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598194pyripnpPD84	AAAGTTAAAGGAATAACGTTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598193pyripnpPD121Lib	AAAGTTAAAGGAATAACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC
FN598192pyripnpPD	AAAATTAAGGAATAACATTAGAAATTTTGGAAAAAGTTTAAAAACAAGC

FN598193pyripnpPD121Lib
FN598192pyripnpPD

AAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTGAAGATAGG
AAATTAGAAAATTATAAAGTTGATAAAGTTGAAGATGTTTTGAAGATAGG

EK 4. *Candidatus* Phytoplasma prunorum'un *SecY* geninin gen bankasından sağlanan diğer izolat ve *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. mali* izolatlarının genleri ile çoklu dizi karşılaştırmaları

HM237295strain	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
FN598207isolate14MY	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATA-----A
FN598206isolateESFY	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
FN598205isolateGSFY2	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito90_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito91_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito92_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito93_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito94_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito95_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
Fito96_	-ATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATGAATA-----A
HM237294maliAP15	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
HM237292maliT3	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
HM237291maliP255	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
HM237290maliV147	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
HM237289maliAT	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTG
HM237293maliT10	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
FN598215maliAP032-10	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
FN598214maliAP4LUCA	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAGTA
HM237296pyriPD	NATTTTATTAGCTTTTTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAAATATAATA
FN598212pyriPD2LUCA	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAAGTAAATTTA
FN598211pyriPD	NATTTTATTAGCTTTGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATA-----A
FN598210pyriPD356-1	NATTTTATTAGCTTTGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATA-----A
FN598209pyriPD36AZ	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATA-----A
FN598208pyriPDSpa2	NATTTTATTAGCTATGTTTCAAAGTTATTTAATGATTAATAGTAAATTTA
HM237295strain	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
FN598207isolate14MY	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
FN598206isolateESFY	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
FN598205isolateGSFY2	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito90_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito91_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito92_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito93_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito94_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito95_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
Fito96_	ATAT-----AATATTGAATTATTTAAAGATAAGATATATATATA
HM237294maliAP15	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
HM237292maliT3	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
HM237291maliP255	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
HM237290maliV147	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
HM237289maliAT	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
HM237293maliT10	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
FN598215maliAP032-10	GTAA-----GATAGATTA--TCCAGACAAGTTATATATATA
FN598214maliAP4LUCA	GTAGT-----GAGATATTGATTCCAGAAAAGTTATATATATA
HM237296pyriPD	TTGA-----ATT---TAAAGACCAGATATATATATA
FN598212pyriPD2LUCA	ACATTTTTAACATT---AATATTGAT---ATTAAAGATAAGATATACATA
FN598211pyriPD	ATAT-----AATATTGAA---TTTAAAGACAAGATATATATATA
FN598210pyriPD356-1	ATAT-----AATATTGAA---TTTAAAGACAAGATATATATATA
FN598209pyriPD36AZ	ATAT-----AATATTGAA---TTTAAAGACAAGATATATATATA
FN598208pyriPDSpa2	ACATTTTTAACATT---AATATTGAT---ATTAAAGATAAGATATACATA
HM237295strain	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
FN598207isolate14MY	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
FN598206isolateESFY	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
FN598205isolateGSFY2	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito90_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito91_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito92_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito93_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito94_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito95_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
Fito96_	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT
HM237294maliAP15	TCGTTTTTTTTAGCTACTGGAACAGCTATTTCTATTTGGTTATCTGATTT

EK 5. Fitoplazma DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**%2'lik CTAB Solüsyonu pH 8.0 (100 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
------------------------	----------------------

CTAB (%2)	2g
NaCl (1.4M)	8.2g
EDTA (0.5M) (ph 8.0)	0.7g
Tris-HCl (1M) (ph 7.4)	6g
*B-mercaptoethanol	% 2

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

TE Tampon Çözeltisi :**Kimyasal**

Tris 10mM
EDTA 1mM

1.4M NaCl (100 ml) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
------------------------	----------------------

NaCl	5.6 g
------	-------

- 5.6 g NaCl 80 ml H₂O' da çözündürülür.
- H₂O eklenerek son hacim 100 ml' ye tamamlanır.
- Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

1M Tris-HCl (100 ml) (ph 7.4) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
-----------------	---------------

Tris base	12.1 g
-----------	--------

- 12.1 g Tris base 80 ml H₂O' da çözündürülür.
- pH' sı konsantre HCl eklenerek ayarlanır. (pH 7.4 için 7 ml HCl)
- H₂O eklenerek son hacim 100 ml' ye tamamlanır.
- Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

0.5 EDTA (100 ml) (ph 8.0) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
-----------------	---------------

EDTA	18.6 g
------	--------

- 18.6 g EDTA 80 ml H₂O' da çözündürülür.
- Magnetik karıştırıcı ile kuvvetli bir şekilde karıştırılır.
- pH' sı NaOH pelletleri ile 8.0' e ayarlanır.
- Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

EK 6. Agarose jel elektroforez çözeltileri ve hazırlanması (Maniatis ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
------------------------	----------------------

Trizma base	24.2 g
EDTA(0.5 M) (ph 8.0)	10 ml
Glacial Acetic Acide	5.71 ml

- Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

Yükleme buffer (6 X Stok için) (15 ml) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
------------------------	----------------------

Bromophenol blue	150mg
Glycerol	18g
TAEX50	6ml

- -20 °C' de saklanır.

Ethidium Bromide Solüsyonu (1 mg / ml) (200 ml) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
------------------------	----------------------

0.5XTAE	200ml
Ethidium Bromide (Sigma E-50) (Son konsantrasyon 1mg/ml)	200 µl

- 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 içinde mikrodalga 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 yüklemesi, 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.