



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMA HASTALIĞI
(*Candidatus Phytoplasma mali*)'NİN BİYOLOJİK
MÜCADELESİNDE ENDOFİTİK FUNGUSLARIN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şefika YAVUZ

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**HATAY
ARALIK-2019**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMA HASTALIĞI
(*Candidatus Phytoplasma mali*)'NİN BİYOLOJİK
MÜCADELESİNDE ENDOFİTİK FUNGUSLARIN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞEFİKA YAVUZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
ARALIK-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMA HASTALIĞI (*Candidatus* Phytoplasma
mali)'NİN BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİTİK FUNGUSLARIN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Şefika YAVUZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Mona GAZEL ve Dr. Öğretim Üyesi Fatih Mehmet TOK danışmanlığında hazırlanan bu tez **05/12/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mona GAZEL
Başkan

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Üye

Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE
Üye

Prof. Dr. Emine Mine SOYLU
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Diğdem OKSAL
Üye

Kod No: 1223

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

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

05.12.2019

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Şefika YAVUZ

ÖZET

ELMA ÇOKLU SÜRGÜN FİTOPLAZMA HASTALIĞI ('*Candidatus Phytoplasma mali*')'NİN BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİTİK FUNGUSLARIN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma Hastalığı (*Candidatus Phytoplasma mali*)'nın biyolojik mücadelesinde endofitik fungusların etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece pratikte kimyasal mücadele olanağı olmayan hastalık etmenine karşı farklı kontrol stratejileri geliştirilebilme olanağının sağlanması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında İçel, Adana, Niğde, Isparta, Hatay ve Karaman illerinde elma üretim alanlarında simptomolojik olarak Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma (EÇSF) hastalığına benzeyen belirtiler gösteren elma örnekleri PCR analizleriyle testlenmiş ve enfeksiyon oranı % 8,05 olarak bulunmuştur. *Ca. P. mali* ile enfeksiyon oranı en yüksek bulunan İçel ili başta olmak üzere Adana ve Niğde illeri elma bahçelerindeki sağlıklı ve enfekteli elma ağaçlarından endofit fungus türleri izole edilmiş, bu fungusların morfolojik ve moleküler tanısı ile birlikte patojenisite çalışmaları yapılmıştır. Sağlıklı elma ağaçlarından en yaygın olarak izole edilen endofit funguslardan *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Ulocladium consortiale*'nin EÇSF hastalığına karşı etkinlikleri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda incelenmiştir. Her bir fungus izolatının EÇSF hastalık yoğunluğunu farklı düzeylerde etkilediği, en yüksek etkinin *A. pullulans*'a ait olduğu ve EÇSF hastalık yoğunluğunu uygulama sonrası %34,18 etki değeri ile azalttığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile biyolojik mücadele etmeni olan endofit fungusların elmalarda EÇSF hastalığı üzerine etkileri Türkiye'de ilk kez araştırılmış ve hastalığın kontrol stratejilerinin oluşturulmasında önemli ön bulgular elde edilmiştir.

2019, 103 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Malus domestica*, fitoplazma, endofit fungus, kontrol

ABSTRACT

INVESTIGATION ON EFFICIENCY OF ENDOPHYTIC FUNGI IN BIOLOGICAL CONTROL OF APPLE PROLIFERATION (*Candidatus Phytoplasma mali*) PHYTOPLASMA DISEASE

The aim of this study was to determine the efficiency of endophytic fungi in biological control of Apple Proliferation Phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma mali*). Thus, it is aimed to provide the possibility of developing different strategies against this disease which can not be controlled by chemicals. In this study, apple samples that showing similar symptoms to Apple Proliferation (AP) disease were tested with PCR analyses and average infection rate was found to be 8.05% in apple production areas in İçel, Adana, Niğde, Isparta, Hatay and Karaman provinces. Endophyte fungi species were isolated from healthy and phytoplasma infected apple trees in apple orchards of Adana and Niğde provinces, especially in the province of İçel, which had the highest infection rate with *Ca. P. mali*. Morphological and molecular identifications and pathogenicity of these fungi were performed. The efficiency of *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans* and *Ulocladium consortiale* which were commonly isolated from healthy apple trees were investigated under *in vitro* and *in vivo* conditions against to AP disease. It was determined that each isolate had different effects on the severity of AP disease. *Aureobasidium pullulans* had the highest effect, and decreased the disease intensity with 34,18% effect value after the application.

This is the first study on investigation of the effects of endophyte fungi as a biological control agents for AP disease on apples in Turkey. As a result of the study, important preliminary evidences were obtained for developing control strategies of phytoplasma disease in apples.

2019, 103 pages

Key Words: *Malus domestica*, phytoplasma, endophytic fungi, control

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesi, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı sağlayan saygıdeğer danışman hocalarım Prof. Dr. Mona GAZEL ve Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet TOK'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN, Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE, Öğr. Üyesi. Dr. Hatice Diğdem OKSAL ve Prof. Dr. Emine Mine SOYLU'ya, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan MKÜ Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren TAGEM'e ve tüm çalışmalarımı eksiksiz yürütebilmemde maddi manevi desteklerini esirgemeyen kurumum Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne; emeği geçen yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen, hayatımın her anında yanımda olduklarını bildiğim, varlıklarından güç aldığım sevgili ailem ve Melek'ime sonsuz teşekkürler ...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Dünyada Fitoplazmalar Konusunda Yapılan Çalışmalar	7
2.2. Ülkemizde Fitoplazmalar KonusundaYapılan Çalışmalar	13
2.3. Dünyada Endofitik Funguslar Konusunda Yapılan Çalışmalar	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması Konusunda Yapılan Çalışmalar	19
3.2.1.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Arazi Çalışmaları	19
3.2.1.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Aşı İle Taşınma Etkinliğinin Saptanması.....	20
3.2.1.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Vektör Böceklerle Taşınma Etkinliğinin Saptanması	21
3.2.1.4. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması Konusunda Yapılan Moleküler Çalışmalar	22
3.2.1.4.1. DNA İzolasyonu	22
3.2.1.4.2. PCR Analizleri	23
3.2.1.4.3. Jel Elektropherez	24
3.2.1.4.4. RFLP Analizi	24
3.2.1.4.5. Sekans Analizleri	25
3.2.1.4.6. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)	25
3.2.2. Endofit Funguslar Konusunda Yapılan Çalışmalar.....	26
3.2.2.1. Endofit Funguslar İle İlgili Arazi Çalışmaları	26
3.2.2.2. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofit Funguslar İle İnokulasyonu.....	26
3.2.2.3. Patojenisite Çalışmaları	28
3.2.2.4. Endofit Funguslar İle İlgili Moleküler Çalışmalar	29
3.2.2.4.1. DNA İzolasyonu	29
3.2.2.4.2. PCR Analizi	30
3.2.2.4.3. Jel Elektropherez	31
3.2.2.4.4. Sekans Analizleri	31
3.2.3. Vektör Böcekler İle İlgili Moleküler Çalışmalar	31
3.2.3.1. DNA İzolasyonu	31
3.2.3.2. PCR Analizi	32
3.2.3.3. Jel Elektropherez	32

3.2.4. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Çalışmaları	33
3.2.4.1. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofitik Funguslar ile İnokulasyonu.....	33
3.2.4.2 Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Analiz Sonuçları	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE DEĞERLENDİRME.....	35
4.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	35
4.1.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Arazi Çalışması Bulguları ..	35
4.1.1.1. Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Bulguları.....	35
4.1.1.2. RFLP Analiz Bulguları.....	46
4.1.1.3. Sekans Analizi Bulguları	48
4.1.1.4. Real-time PCR Analizi Bulguları	54
4.1.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Aşı İle Taşınma Etkinliği Bulguları	55
4.1.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Vektör Böcekle Taşınma Etkinliği Bulguları	60
4.2. Endofit Funguslar İle İlgili Yapılan Çalışmalar	65
4.2.1. Endofit Fungusların Arazi Çalışmaları, Örneklenmesi ve İzolasyonu ...	65
4.2.2. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofitik Funguslar ile İnokulasyon Bulguları	72
4.2.3. Re-izolasyon Bulguları	76
4.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması-Endofit Fungusların Etkileşimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	76
4.3.1. Fitoplazma ile Enfekteli Ağaçlara Endofit Fungusların İnokulasyonu Bulguları	76
4.3.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması-Endofit Fungusların Etkileşimi Sonrası Yapılan Real-time PCR Analizi Bulguları	81
4.3.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Analiz Bulguları	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	99
EKLER.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *in vitro* cv. Golden Delicious fidanları (sol) ve Cezayir Menekşeleri (sağ)19
- Şekil 3.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması ile enfekteli bitki materyali temini için örnek toplanan alanlar.....20
- Şekil 3.3. Laboratuvar ortamında endofit fungus izolasyonu için toplanan bitki materyallerinin hazırlanışı27
- Şekil 3.4. Laboratuvar ortamında fitoplazma ile enfekteli ve sağlıklı elma dokularından endofit fungusların izolasyon çalışmaları.....28
- Şekil 3.5. Morfolojik olarak tespit edilemeyen fungal örneklerin patojenite çalışmaları.....29
- Şekil 4.1. İçel-Gülнар'da fitoplazma ile enfekteli bulunan elma ağacı dallarında gözlenen deformasyonlar36
- Şekil 4.2. İçel-Gözne'de fitoplazma ile enfekteli bulunan elma ağacı dallarında görülen çıplaklaşma belirtisi37
- Şekil 4.3. İçel-Arslanköy'de fitoplazma ile enfekteli elma ağacında gözlenen, sürgün uçlarına doğru artan çıplaklaşma belirtileri37
- Şekil 4.4. Elma ağaçlarında gözlenen belirtiler: enfekteli sürgünlerde gözlenen cadı süpürgesi oluşumu ve stipüllerde büyüme belirtisi (solda), sağlıklı sürgün (a) enfekteli sürgün (b) (sağda)38
- Şekil 4.5. Elma ağaçlarından alınan sürgün ve yaprak örneklerinde gözlenen belirtiler; enfekteli sürgünlerin yaprak stipüllerinde görülen anormal büyümeler, (a) enfekteli yaprak, (b) sağlıklı yaprak (solda), enfekteli yapraklarda stipul görüntüsü (sağda).....39
- Şekil 4.6. (a) EÇSF ile enfekteli olarak saptanan elma ağacında gözlenen sürgünlerde çıplaklaşma belirtisi (Kasım 2013), (b) Bir yıl sonra üretici tarafından sökülmüş aynı ağaç (Kasım 2014)40
- Şekil 4.7. İçel Gülнар'dan toplanan 14 elma ağacından elde edilen bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-14: Gülнар elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması; Pozitif kontroller, W: Su kontrol41
- Şekil 4.8. İçel-Mut'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Mut'dan toplanan elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol42
- Şekil 4.9. İçel-Uzuncaburç'dan alınan elma örneklerinin DNA'sının F01/R01 primerleri ile Nested-PCR ile analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-16: Uzuncaburç'tan alınan elma örnekleri AP: Elma Çoklu Sürgün

- Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol.....
.....42
- Şekil 4.10. İçel Gözne ve Adana Havutlu'dan alınan elma örneklerinden elde edilen bitki DNA'larının F01/R01 primer çifti ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), üst jel; 1-16: Adana Havutlu örnekleri, üst jelde sondaki 1-7 ve alt jel 8-24: İçel Gözne örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol.....43
- Şekil 4.11. (a) Pozanti'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Pozanti'dan toplanan elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol (b) Çamardı'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker, 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, W: Su kontrol (c) Çukurova Üniversitesi elma bahçelerinden toplanan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker, 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol.....44
- Şekil 4.12. Niğde Ulukışla'dan alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Ulukışla'ya ait elma örnekleri; AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması Pozitif kontrol, W: Su kontrol.....44
- Şekil 4.13. Isparta'dan toplanan elma örneklerinin DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-14: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol.....
.....45
- Şekil 4.14. İçel-Arslanköy'den alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-11: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol46
- Şekil 4.15. Karaman'dan alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler

- marker (Thermo Scientific SM1331), 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması Pozitif kontrol, W: Su kontrol.....46
- Şekil 4.16. İçel-Gülner'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR ürünlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 6, 1A, 1B, 1, 19, 21: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol47
- Şekil 4.17. İçel-Uzuncaburç'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR ürünlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 7 ve 14: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol .47
- Şekil 4.18. İçel-Gözne'den alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR ürünlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 4, 8, 10, 18, 19, 6: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol.....48
- Şekil 4.19. *Ca. P. mali* ile enfekteli izolatların bazı ülke izolatları ile oluşturulan filogenetik analizi, Dendogram Maximum Likelihood Kimura 2 parameter model 3'e göre oluşturulmuştur, GL: Gülner, G: Gözne, UZ: Uzuncaburç, I: Isparta, A: Arslanköy, K: Karaman, U: Ulukışla izolatlarını temsil etmektedir49
- Şekil 4.20. Ulukışla'dan alınan bitki DNA'larının real-time universal fitoplazma protokolü kullanılarak elde edilen görüntüsü55
- Şekil 4.21. *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan elmalardan alınan aşı gözleri ile Cezayir Menekşelerinin aşılması56
- Şekil 4.22. *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan aşı kalemleri ile elma fidanlarının aşılması.....57
- Şekil 4.23. EÇSF temeni ile aşılana elma fidanlarının genel görünümü57
- Şekil 4.24. *Ca. P. mali* enfekteli ağaçlardan alınan aşı kalemleri ile cv. Golden Delicious elma fidanlarına yapılan göz aşılması sonucu süren elma fidanlarının genel görünümü.....59
- Şekil 4.25. *Ca. P. mali* ile enfekteli elma bahçelerinden darbe yöntemiyle olası vektör böceklerin toplanması.....61
- Şekil 4.26. Elma bahçelerinden toplanan *Cacopsylla* türleri61

Şekil 4.27.	Vektör böcek salımı yapılan Cezayir Menekşesi (<i>Vinca</i> sp.) test bitkileri.....	63
Şekil 4.28.	Vektör böcek salımı yapılan cv. Golden Delicious elma fidanlarının genel görüntüsü.....	64
Şekil 4.29.	Taşıma denemesinde kullanılan psyllidlerin DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: testlenen örnekler, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, pozitif kontroller, W: Su kontrol.....	64
Şekil 4.30.	Taşıma denemesi yapılan bitkilerin DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331)1-21: testlenen örnekler, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, pozitif kontroller, W: Su kontrol.....	65
Şekil 4.31.	Aday endofit fungusların izolasyon çalışmalarında elde edilen fungus cinslerinin morfolojik görünümü.....	67
Şekil 4.32.	Morfolojik olarak endofit olduğu düşünülen izolatlar.....	68
Şekil 4.33.	Morfolojik olarak tespit edilemeyen aday endofit örneklerin patojenite çalışmaları.....	69
Şekil 4.34.	ITS 1/4 primer çifti ile çoğaltılmış DNA örneklerinin jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM0242), 1,8: fungus örnekleri.....	70
Şekil 4.35.	Morfolojik ve moleküler olarak teşhis edilen endofit fungus türleri (a) <i>Epicoccum nigrum</i> , (b) <i>Aureobasidium pullulans</i> ve (c) <i>Ulocladium consortiale</i>	70
Şekil 4.36.	Endofit fungus inokulasyonu için kullanılan spor süspansiyonunun hazırlanışı.....	73
Şekil 4.37.	Elde edilen endofit fungusların spor yapılarına ait mikroskop görüntüsü.....	74
Şekil 4.38.	Endofit fungus inokulasyonu için petrilerden kazıma ile spor süspansiyonu hazırlanışı.....	74
Şekil 4.39.	Endofit fungusların <i>Catharanthus roseus</i> test bitkilerine inokulasyonu.....	75
Şekil 4.40.	Endofit fungusların cv. Golden Delicious elma fidanlarına inokulasyonu.....	76
Şekil 4.41.	Niğde'de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılacak fungus inokulasyonu için spor süspansiyonu hazırlanma aşamaları.....	77
Şekil 4.42.	Niğde'de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılacak fungus inokulasyonu için spor süspansiyonu hazırlanma aşamaları.....	78
Şekil 4.43.	Niğde'de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılan spor süspansiyon uygulaması.....	78
Şekil 4.44.	Niğde'de petrilerden alınan kesitlerin fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine uygulanması.....	79

Şekil 4.45.	Niğde’de fitoplazma pozitif dallara uygulanan fungus inokulasyonu aşamaları	79
Şekil 4.46.	Niğde’den alınan pozitif sürgünler üzerine laboratuvar koşullarında uygulanan fungus inokulasyonu aşamaları	80
Şekil 4.47.	Niğde’de pozitif sürgünler üzerine inokule edilen fungusların rezolasyonları.....	80
Şekil 4.48.	a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen eğriler b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen eğriler	82
Şekil 4.49.	a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq parametreleri b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq parametreleri	82
Şekil 4.50.	a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq değerleri b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq değerleri.....	83
Şekil 4.51.	Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri ile elde edilen % değişim oranları, K: kontrol, E: <i>Epicoccum nigrum</i> izolatu, A: <i>Aureobasidium pullulans</i> izolatu, U: <i>Ulocladium consortiale</i> izolatu	84
Şekil 4.52.	Elde edilen % değişim oranları kullanılarak uygulanan Sun-sheperd formülü ile hesaplanan % etki değerleri, E: <i>Epicoccum nigrum</i> izolatu, A: <i>Aureobasidium pullulans</i> izolatu, U: <i>Ulocladium consortiale</i> izolatu	85
Şekil 4.53.	Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri, turuncu sütunlar: uygulama öncesi alınan değerler, mavi sütunlar: uygulama sonrası alınan değerler, K:kontrol, E: <i>Epicoccum nigrum</i> izolatu, A: <i>Aureobasidium pullulans</i> izolatu, U: <i>Ulocladium consortiale</i> izolatu	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Candidatus Phytoplasma mali'nin teşhisi amacıyla kullanılan üniversal primerlerin dizileri	23
Çizelge 3.2.	Teşhis ve patojen değişimlerini belirlemek amacıyla kullanılan fitoplazma spesifik primer ve prob dizileri.....	25
Çizelge 3.3.	Fitoplazma teşhisi amacıyla yapılan Real-time PCR'da kullanılan karışım içeriği	26
Çizelge 3.4.	Fitoplazma teşhisi amacıyla kullanılan Real-time PCR döngüleri.	26
Çizelge 3.5.	Fungal endofitlerin teşhisi amacıyla kullanılan primer dizileri	31
Çizelge 4.1.	Fitoplazma ile enfekteli bitki materyalinin toplandığı il-ilçeler, gezilen bahçe ve toplanan örnek sayıları	35
Çizelge 4.2.	DNA dizi analizi çalışmalarında fitoplazma ile enfekteli elma izolatlarının alındıkları ilçelere göre yapılan kodlamaları, GL: Gülnar, G: Gözne, UZ: Uzuncaburç, I: Isparta, A: Arslanköy, K: Karaman, U: Ulukışla	50
Çizelge 4.3.	2013-2018 yılları arasında Nested-PCR/RFLP yöntemi ile testlenen elma örneklerinin alındığı il, ilçeler ve <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'nin enfeksiyon oranı	52
Çizelge 4.4.	EÇSF hastalığının elma ağaçlarında dönemsel dağılımının belirlenmesi amacıyla yapılan Nested-PCR ve RFLP çalışmaları sonucu*	54
Çizelge 4.5.	Aşı ile taşınma denemelerinde kullanılan, inokulum verilen/verilmeyen elma fidanı ve Cezayir Menekşesi sayıları (adet)	58
Çizelge 4.6.	İçel ve Hatay illerinde 2017 yılında gidilen elma bahçelerinden toplanan böcek türleri, gözlenen bahçe ve ağaç sayıları	62
Çizelge 4.7.	2013-2016 yılları arasında endofit fungus izolasyonu için farklı illerde gidilen bahçe sayıları, örnekleme yapılan ağaç sayıları ve örneklenen bitki dokularının sayısı.....	66
Çizelge 4.8.	2013-2016 yılları arasında yapılan izolasyonlarda saptanan ve morfolojik teşhisleri yapılan fungus cinsleri	68
Çizelge 4.9.	Fitoplazma ile enfekteli örneklerin endofit funguslarla inokulasyonu öncesi ve sonrası ortalama cq değerleri, % değişimleri ve % etki oranları, K:kontrol, E: <i>Epicoccum nigrum</i> izolatu, A: <i>Aureobasidium pullulans</i> izolatu, U: <i>Ulocladium consortiale</i> izolatu	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Sıcaklık
µl	: Mikrolitre
gr	: Gram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
mM	: Milimolar
pmol	: Pikomol
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
ml	: Mililitre
rpm	: Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
cm	: Santimetre
L	: Litre
dk	: Dakika
pH	: Power of hydrogen

KISALTMALAR

DAPI	: 4-6 diamidino-phenylindole
DNA	: Deoksiribonükleik asit
IRPCM	: Karşılaştırılmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi
PCR	: Polimerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RFUP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
AP	: Apple proliferation
EÇSF	: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması
ASÇS	: Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı
ESFY	: European stone fruit yellows
AY	: Armut yıkımı

PD	: Pear decline
rDNA	: Rekombinant deoksiribonükleik asit
MBO	: Mikoplazma Benzeri Organizmalar
aceF	: Acetyltransferase
pnp	: Polynucleotide phosphorylase
secY	: Membrandan protein geçişini kontrol eden gen
imp	: Immunodominant membran geni
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
TE	: Tris-EDTA
Tris-HCl	: Tris Hydrochloride
KCl	: Potasyum klorit
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
dNTP	: Deoksinükleosid trifosfat
TAE	: Tris asetat
UV	: Ultra viole
PDA	: Patates Dekstroz Agar
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
NaCl	: Sodyum klorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
RNase	: İnhibe edici enzim
bp	: Base pair (baz çifti)
PDB	: Patates Dekstroz Broth
NCBI	: National Library of Medicine
Cq	: Cycle quantification
qPCR	: quantitive PCR
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay

1. GİRİŞ

Türkiye sahip olduğu ekolojik koşullar sayesinde kayısı, elma, erik, badem, kiraz gibi bir çok meyve kültürünün merkezi konumundadır. Bunlar içerisinde elma (*Malus domestica*), ana vatanı Anadolu, Kafkasya ve Türkistan olan, yetiştiriciliğine milattan önceki yıllarda başlanmış olduğu bilinen, besin değeri oldukça yüksek ve birçok farklı çeşidi bulunan bir ılıman iklim meyvesidir. *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Pomoideae* alt familyasına ait olan elma, ülkemizde de uzun yıllardan beri yetiştiriciliği yapılan, üretim ve alan bakımından diğer ılıman iklim meyvelerinin başında yer alan bir meyve türüdür.

Yumuşak çekirdekli meyveler içerisinde kullanım ve yararları açısından önemli bir yeri olan elma, her mevsim farklı çeşit yetiştirilebilme olanağına sahip, besin maddelerince oldukça zengin bir meyvedir. Golden, Fuji, Santana, Amasya, Jonathan, Summer Red, Granny Smith, Arapkızı, Gala, Goldstar, Hanna, Rayka, Starking, Top Red ve Pinova gibi elma çeşitleri gerek yurt dışında gerekse ülkemizde yaygın olarak yetişen elma çeşitleri arasındadır. Elma yetiştiriciliği yapılan ülkelerde taze olarak tüketiminin yanı sıra kurutulmuş meyve, meyve suyu, komposto, marmelat, reçel, tatlı, sirke, şarap, esans ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Günümüzde Türkiye'nin hemen her bölgesinde elma yetiştiriciliği yapılmaktadır. Karadeniz kıyı bölgeleri, Kuzey Anadolu, Doğu ve İç Anadolu yaylaları civarındaki geçit bölgeleri ve Güney bölgesindeki Göller Yöresi elma yetiştiriciliği yapılan başlıca alanlardır. Son yıllarda elde edilen verilere bakıldığında dünya elma üretiminin 5 milyon hektar alanda yapıldığı, Türkiye'nin 171 bin hektar alan ile %3,3'lük üretim alanını kapsadığı bilinmektedir. Üretim miktarlarına bakıldığında ise dünya elma üretiminin 85 milyon ton civarında olduğu ve Türkiye'nin yaklaşık 3 milyon ton üretim ile %3.6'lık paya sahip olduğu görülmektedir (FAO, 2017). Türkiye'de 2018 yılı verilerine göre elma üretimi bir önceki yıla oranla %19 artmış, 1.746.404 dekar alanda 61.288.452 adet meyve veren ağaç sayısı ile 3.625.960 ton değerine ulaşmıştır (TÜİK, 2018).

Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi elma ağaçlarında görülen hastalık ve zararlılar ekonomik anlamda oldukça önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Fungal ve bakteriyel hastalıklar, hastalıkların taşınmasına yardımcı olan

vektör böcekler ve yabancı otlar kimyasal mücadele yapılarak önlenebilmekte, ancak virüs, viroid ve fitoplazma gibi hastalıklarla kimyasal mücadele yapılamamaktadır.

In vitro koşullarda kültüre alınamadığından, son yıllara kadar birçok özelliği bilinmeyen bazı organizmaların son yıllarda ribozomal DNA (rDNA) baz dizileme teknikleri ile büyük bir monofiletik grup oluşturduğu anlaşılmıştır. Simptomatolojik özellikleri, vektör böceklerle taşınabilmeleri ve yayılışları açısından virüslerin neden olduğu düşünülen sarılık benzeri birçok bitki hastalığına aslında hücre duvarı bulunmayan gram pozitif prokaryotların neden olduğu 50 yılı aşkın süredir bilinmektedir. Bu prokaryotların floemde kolonize olduğu ve insan patojeni mikoplazmalara benzediği, ilk kez 1967 yılında yapılan elektron mikroskop çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Doi ve ark., 1967). DAPI boyama ya da elektron mikroskopi yöntemleri ile 20 yıldan fazla bir süredir tanısı yapılan bu patojenlerin son 30 yıldır DNA-temelli teknoloji kullanımı ile prokaryotlar içerisinde farklı moleküler kümelere ait oldukları belirlenmiştir. “Karşılaştırılmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi” (International Research Programme in Comparative Mycoplasma, IRPCM) Bitki Mikoplazmaları Birimi bu patojenlerin dâhil olduğu prokaryotlara ait grubu tanımlamak için ‘fitoplazma’ adını vermiş; ‘*Candidatus Phytoplasma*’ cinsi olarak isimlendirilmesi önerilerek bu prokaryotların resmi sınıflandırılması yapılmaya başlanmıştır (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2004).

Seksenli yılların başından bu yana hastalıkların biyolojisi, ekolojisi, epidemiyolojisi ve vektör böceklerle etkileşimi üzerine yapılan birçok çalışma sonucunda bu hastalıkların fitoplazmalarla ilişkili olduğu anlaşılmıştır.

Fitoplazmalar Mollicutes sınıfında yer alan, düşük Guanin ve Sitozin içeriğine sahip, büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, 1000’den fazla bitki türünde hastalığa neden olan, hücre duvarı bulunmayan polimorfik prokaryotlardır (Lee ve ark., 2000; Bertaccini, 2009). Obligat parazit olduklarından sadece canlı konukçu dokularında yaşayabilmektedirler (Seemüller ve ark., 2002). Bitkilerin floem dokusunda kolonize olan ve vektör böceklerle taşınabilen fitoplazmalar nesilden nesile taşınabilmektedir. Genetik olarak 16S ve 23S ribozomal alanlar arasındaki bölgelerin çoğaltılmasıyla elde edilen DNA parçalarının kullanımı ile insan ve hayvanları enfekte eden mikoplazmalardan ayrılabilirler. Fitoplazma tanılama ve sınıflandırma sistemleri ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bu etmenlerin ayrımlarının Cezayir Menekşesi gibi genel bir konukçudaki

simptom oluşumları, enfekte edebildiği konukçu dizisi, vektör böcek taşınmalarındaki özellikleri esas alınarak yapıldığı görülmüştür.

Son yıllara kadar fitoplazma teşhislerinde sadece serolojik yöntemler veya spesifik klonlanmış DNA problemleri kullanılmakta iken gelişen sistemler ve edinilen yeni bilgiler doğrultusunda fitoplazma teşhislerinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Serolojik tanı yöntemlerinden poliklonal antiserumların kullanımı ile fitoplazma grupları arasında ilk farklılıklar ortaya konulmuş, daha sonra monoklonal antiserumların geliştirilmesi ile daha ileri düzeyde tanılamaların yapılabilmesine olanak sağlanmıştır. Prokaryotların sınıflandırılmasında son yıllarda yaygın olarak moleküler yöntemler kullanılmakta olup filogenetik çalışmalarında yüksek derecede korumalı bölge olan 16S rRNA geni kullanılarak fitoplazma taksonomisinde önemli gelişmeler sağlanmıştır (Martini ve ark. 2007). Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem cins hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu iki bölge arasındaki bölümün çoğaltılması genellikle "internal transcribed spacer (ITS)-PCR olarak tanımlanmaktadır. Böylece 16S-23S rRNA'nın intergenik transkripsiyon bölgesi içindeki polimorfizmler ortaya çıkmakta ve bakteriyal türlerin karakterizasyonunda kullanılabilir (Leblond-Bourget ve ark. 1996).

Korunmuş ribozomal fitoplazma bölgesi (16S rRNA geni) üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda teşhislerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction: PCR) / Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ve Nested-PCR yöntemleri, Realtime PCR (Gerçek zamanlı PCR) yöntemleri geliştirilerek uygulanmıştır (Marzachi, 2004). Kullanılan bu teşhis yöntemleri fitoplazma hastalıklarının daha hızlı ve güvenilir yollarla saptanabilmesi ve hastalıkların epidemiyolojilerine yönelik önemli bilgilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında zarar yapan ve ekonomik anlamda oldukça önemli kayıplara neden olan fitoplazma hastalıklarının patojenlerin korunmuş genlerini içeren 16S rDNA'sının bazı dizileri tayini ve RFLP analizlerini kapsayan moleküler çalışmalara göre Apple Proliferation (AP) grubuna (16SrX) ait oldukları belirlenmiştir. Bu grup içerisinde yer alan en önemli fitoplazma etmenleri Avrupa Sert

Çekirdekli Meyve Sarılığı Fitoplazması (ASÇSF) (European stone fruit yellows; ESFY), Armut Yıkımı Fitoplazması (AYF) (Pear decline; PD) ve Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF) (Apple Proliferation; AP)'dır. Son yıllarda fitoplazma grubu patojenlerin sınıflandırılması ve bilimsel isimlendirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda EÇSF hastalığı etmeni '*Candidatus* Phytoplasma mali' olarak adlandırılmaktadır (Seemüller ve Schneider, 2004). Etmeni '*Candidatus* Phytoplasma mali' olan Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma (EÇSF) hastalığı elma ağaçlarının en önemli hastalıklarından biri olmasının yanı sıra EPPO'nun karantina listesinde bulunmakta ve ülkemizde Ek-I A grubu patojen listesinde yer alarak potansiyel tehlike olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2011).

EÇSF hastalığına neden olan *Ca. P. mali* Fransa, Almanya, İtalya, Yunanistan, Bulgaristan, İspanya, İsviçre, Belçika, Kanada, Türkiye gibi dünyanın hemen hemen birçok yerinde elma yetiştiriciliği yapılan alanlarda ekonomik anlamda verim ve kalite kayıplarına neden olan önemli bir hastalıktır. Elma ağaçlarında semptomlu ve semptomsuz olarak bulunabilen bu etmen, semptomlu ağaçların yapraklarında kızıldan sarıya kadar değişen renklemelere, büyümede gerilemelere, meyve oluşumunda azalmalara, yaprak stipullerinde anormal büyümelere, rozetleşmelere ve özellikle 'cadı süpürgesi' olarak tabir edilen semptomlara neden olmaktadır (Seemüller ve Schneider, 2007).

EÇSF hastalığı ilk olarak İtalya'da saptanmış (Rui ve ark., 1950), bununla birlikte hastalığın uzun yıllardan bu yana Avrupa kıtasında birçok ülkede elma üretim alanlarında ciddi sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Seemüller ve Schneider, 2004). Ülkemizde ise son yıllarda Akdeniz bölgesinde, Ankara, Yalova ve Niğde'de çalışılan sınırlı sayıdaki örnekte hastalık tespit edilmiştir (Canik ve Ertunç, 2007; Sertkaya ve ark., 2008; Dağtekin, 2009).

EÇSF'nin gerek kök kaynaşması gerekse vektör böceklerle etkin olarak taşınması nedeniyle sertifikalı fidan kullanımı hastalık kontrolünde yeterli olmamaktadır. Ayrıca EÇSF hastalığına karşı dayanıklı çeşit kullanımı ve fitoplazmanın taşınmasında rol oynayan vektör böceklerle kimyasal mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçların yeterli olmaması nedeniyle etmenle etkili bir mücadele yöntemi belirlenememiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda fitoplazma hastalıklarına karşı bakteriyel ve fungal endofitler ile mücadele olanaklarına yönelik çalışmalar başlatılmıştır.

Fungal endofitler bitki dokularında hastalık simptomuna neden olmayan mikroorganizmalardır (Porras-Alfaro ve Bayman, 2011). Daha çok *Ascomycotina* ve *Deuteromycotina* içerisinde yer alan endofit funguslar taksonomik ve ekolojik olarak sınıflandırılabilen heterojen mikroorganizmalardır (Petrini ve ark., 1992). Canlı bitki dokuları içerisinde kolonize olan ve bitkilerde herhangi bir olumsuz etki oluşturmayan grup olarak tanımlanan endofitlerin konukçularında genelde mutualist bir yaşam sürdürdükleri belirtilmiştir (Hirsch ve Braun, 1992). Endofitlerin konukçu bitkileri pozitif yönde etkilediği, otsu yapıları azalttığı, kuraklığa, stres koşullarına ve hastalıklara karşı dayanıklılığı arttırdığı ve bitki gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Rodriguez ve ark., 2008).

Fitoplazma hastalığı ile bulaşık bahçelerde hastalığı tedavi etmeye yönelik herhangi bir mücadele yöntemi bulunmamasıyla birlikte, fitoplazmaların taşınmasında etkili rol oynayan vektör böcekleri kontrol altına alacak kimyasal mücadele yöntemleri ile fitoplazma bulaşmaları önlenmeye çalışılmaktadır. Günümüzde endofit mikroorganizmalarla yapılan çalışmaların fitoplazma hastalıklarına karşı alternatif bir mücadele stratejisi sağlayabileceği düşünülmektedir. Fungal endofitlerin bulunduğu bağ alanları ve elma bahçelerinde 'recovery' olarak adlandırılan bitkilerin kendilerini tolere ederek yineleyebildiği bir durumun gözlemlendiği, hatta *Epicoccum nigrum* ve *Aureobasidium pullulans* gibi endofit fungus türlerinin biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir (Martini ve ark., 2009). Yapılan son çalışmalarda *Ca. P. mali* ile enfekteli Cezayir Menekşesi (*Catharanthus roseus*) test bitkilerine inokule edilen *E. nigrum*'un fitoplazma simptom şiddetini ve fitoplazmanın bulunduğu konukçu dokularda fitoplazma yoğunluğunu azalttığı bildirilmiştir (Musetti ve ark., 2011).

Ülkemizde farklı illerde yetiştirilen elma ağaçlarındaki fitoplazmaların PCR/RFLP yöntemleriyle tanılanması ve endofitik bakterilerle etkileşimleri konusunda çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, endofitik fungusların fitoplazmalara karşı etkileri konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bunun yanı sıra EÇSF'ye karşı dayanıklı elma çeşitlerinin olmaması nedeniyle hastalığın kontrolünde eradikasyon ve vektör mücadelesi dışında etkin bir yöntem bulunmamaktadır. Son yıllarda çevreyle dost mücadele yöntemlerinin daha fazla önem kazanmasıyla birlikte bitkilerin savunma mekanizmalarını teşvik etmek amacıyla endofit mikroorganizmaların kullanımı gibi uygulamalar yaygınlaşmaya başlamıştır.

Yapılan bu çalışma ülkemizde elma fidanlarında fungal endofitlerin EÇSF'ye etkileri ile ilgili ilk çalışmadır. Planlanan bu çalışma ile elma ağaçlarında EÇSF hastalığına neden olan '*Candidatus Phytoplasma mali*'nin moleküler testlerle belirlenerek karakterizasyonunun yapılması, elma sürgün ve yapraklarından izole edilen fungal endofitlerin hem elmada hem de model bitki Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*)'nde EÇSF hastalığına karşı biyolojik mücadele etkinliğinin saptanması ve böylece fitoplazma hastalıklarına karşı mücadele olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Dünyada Fitoplazmalar Konusunda Yapılan Çalışmalar

Bitki virüs hastalıklarının neden olduğu semptomlara benzer belirtilere sahip olan, hücreler arası dokularda ve daha çok floemde bulunup, yapraklarda küçülme, sararma ve çalı formunda yapılara neden olan etmen yapılan ilk çalışmalarda MBO (Mikoplazma Benzeri Organizmalar) olarak tanımlanmıştır. Ancak yıllar içerisinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda fitoplazma olarak adlandırılmıştır (Doi ve ark., 1967; IRPCM, 2004).

Fitoplazmalar büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, hücre duvarsız prokaryotlar olup polimorfik yapıda ve sadece canlı konukçu dokularında yaşayabilen obligat parazit canlılardır. Ayrıca bitkilerin sadece floem dokularında yer alan, dönemsel olarak çok düşük konsantrasyonlarda bulunabilen ve bitki içerisindeki dağılımı düzensiz olan bu patojenlerin yaklaşık 1000 kadar bitki türünde hastalık yaptığı bildirilmiştir (Lee ve ark. 2000; Seemüller ve ark., 2002).

Dünya genelinde fitoplazmalar içerisinde Apple Proliferation (AP) grubu (16Sr X) meyve ağaçlarında en çok gözlenen fitoplazma hastalık grubudur. Enfekteli ağaçlarda önemli verim ve kalite kayıplarına ve hatta şiddetli enfeksiyonlarda ağaç ölümüne neden olan AP grubu fitoplazmalar ekonomik açıdan da oldukça önemlidir. Bu grup içinde, *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation, AP - Elma çoklu sürgün fitoplazması, EÇSF), *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline, PD - Armut yıkım fitoplazması, AYF) ve *Candidatus Phytoplasma prunorum* (European stone fruit yellows, ESFY - Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması, ASÇSF) yer alır (Lee ve ark., 1998).

AP grubuna dahil olan patojenlerin filogenetik analizleri sonucunda 16Sr DNA dizileri arasında oldukça yüksek oranda benzerlikler olduğu ve %1-1,5 arasında nükleotid farklılıkları ile birbirlerinden ayrıldıkları ve '*Candidatus*' olarak sınıflandırıldıkları bildirilmiştir (Seemüller ve Schneider., 2004)

AP grubu hastalıklarından EÇSF'nin EPPO'nun A2 karantina listesinde bulunan ve ülkemizde henüz bir karantina patojeni olarak kabul edilmemesine rağmen Ek-I A grubu patojen listesinde yer alarak potansiyel tehlike olarak kabul edilen yıkıcı bir fitoplazma hastalığı olduğu rapor edilmiştir (OEPP\EPPO, 1978, Anonim, 2009).

EÇSF hastalığının ana konukçusu elma ağaçlarıdır. Çeşitlerin hastalığa karşı reaksiyonlarında farklılıklar olmasına rağmen birçok elma çeşidi EÇSF'ye karşı duyarlıdır. Belle de Boskoop, Gravenstein, Starking, Golden Delicious ve Winter Banana en hassas çeşitler olarak bilinirken Roja de Benejama çeşidinin hastalığa karşı daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (EPPO Data Sheet, 2012).

Fitoplazmaların tespiti ve teşhisi için gerçekleştirilen bir çalışmada farklı çeşitler üzerinde gözlemler yapılmış, Bohnapfel, Braeburn, Damasonski kosmaè, Elstar, Florina, Gala, Gloster, Golden Delicious, Golden Winter, Idared, Jonagold, Lord Lambourne, Rootstock M11, Rootstock M9, Majda, Melrose, Mutsu, Peinischer Krummstiel, Prima, Red Belle de Boskoop, Reinette du Canada, Steirischer Maschanzler ve White transparent gibi 33 farklı çeşit incelenmiş, yapılan ELISA ve PCR analizleri sonucunda 'Golden Delicious' elma çeşidinin hastalığa karşı diğer çeşitlere göre çok daha hassas olduğu saptanmıştır (Brzin ve ark., 2003).

EÇSF hastalığının en önemli belirtileri bodurlaşma, verimsizleşme, gövdede kırmızı-kahverengi kabuk oluşumları ve ağaç üzerindeki bu renkli bölgelerin zamanla nekrotik bir görünüm alması sonucu bazı dalların solmasıdır. Sürgünlerde rozet yaprak oluşumu oldukça tipik bir simptomdur ve aşırı yan dallanma sonucu "cadı süpürgesi" olarak tabir edilen belirtiler oluşur. Yaprakların yan kulakçıklarında anormal büyümeler meydana gelir. Bahar aylarında hafif kloroz, yaz aylarının sonuna doğru ise erken yaprak kızarması görülür. Enfekteli ağaçlarda erken dönemde meydana gelen yapraklar küçük ve düzensiz oluşmaktadır. Çiçeklenmede azalma, meyvelerde küçülme ve meyve dökümleri görülür. Hastalık nedeniyle çok sayıda zayıf kök oluşumu meydana gelebilir. Şiddetli enfeksiyonlarda hastalıklı ağaçlarda ölümler görülebilmektedir. EÇSF'nin tüm elma çeşitlerini etkilediği ve meyve boyutunda %50'ye varan oranda küçülmelere, ağırlığında ise % 63-74'e varan azalmalara neden olduğu ortaya konulmuştur (Blumer ve Bovey, 1957; Bovey, 1963; 1972).

EÇSF ile enfekteli ağaçların özellikle elma küllemesine (*Podosphaera leucotricha*) hassasiyet gösterdiği, bu ağaçlarda gelişimin zayıf olduğu ve bazen kabuk dokusunda uzunlamasına kırmızımsı kahverengi yivler olduğu gözlenmiştir (Bovey, 1963; 1972).

Hastalık etmeninin elma ağacında dağılımının yıl boyunca sabit kalmayıp mevsimlere bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Kış aylarında patojenin

bulunduğu iletim demetlerinin dejenere olması nedeniyle patojen kök bölgesinde yoğunlaşmaktadır. Nisan-Mayıs aylarında havalarda tekrar ısınmasıyla patojenin köklerden gövdeye doğru yayıldığı ve yaz sonu ile erken sonbahar dönemlerinde hastalığın en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1984).

EÇSF'nin yayılmasında enfekteli aşı gözü kullanımı ve kök kaynaşmaları önemli rol oynamaktadır (Ciccotti ve ark., 2008). Bunun yanında bazı psillidlerin de bu hastalığın yayılmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Seemüller, 1990). Hastalığın bilinen en etkin vektörleri *Cacopsylla picta* ve *Cacopsylla melanoneura*'dır (Jaraush ve ark., 2003). Ayrıca *Fieberiella florii* yaprak piresi EÇSF hastalığının diğer bir vektörü olarak bildirilmiştir (Krczal ve ark. 1989; Tedeschi ve Alma, 2006). Aynı zamanda yapılan çalışmalar doğrultusunda polen ve tohumla taşınmadıkları bilinmektedir. Bunun yanı sıra hastalık etmeni *Cuscuta* spp. (küksüt) kullanılarak enfekteli elma ağaçlarından *Vinca rosea* L. test bitkisine taşınabilmiştir (Marwitz ve ark., 1974; Heintz, 1986).

Hastalık yapay olarak inoküle edildiğinde hastalık belirtilerinin ilk olarak inoküle edilmiş dallarda kendini gösterdiği, belirgin semptomların ikinci yıldan sonra ortaya çıktığı saptanmış, (Morvan ve Castelain, 1975) elma anaç ve çeşitlerinin büyük bir çoğunun hastalığa karşı hassas olduğu ve etmenle etkili bir mücadele yönteminin olmadığı ortaya konulmuştur (Loi ve ark., 1995).

İtalya'nın kuzeyinde meyve yetiştiriciliği yapılan Trentino bölgesinde '*Candidatus* Phytoplasma mali'nin 1990'lardan sonra şiddetli epidemiyi yaptığı ve hastalığı taşıyan vektör böceklerin varlığı nedeniyle hastalık yayılmasını kontrol etmenin oldukça zor olduğu bildirilmiştir (Frisinghelli ve ark., 2000; Tedeschi ve ark., 2002; Jarausch ve ark., 2003).

Kuzey Romanya'da yapılan bir çalışmada 'Florina, Generos ve Aura' çeşidi elma ağaçlarından 2012 yılı güz döneminde fitoplazma semptomları gösteren örnekler toplanmıştır. Yapılan DAS-ELISA ve Nested-PCR analizleri sonucunda DAS-ELISA ile sadece 3 örnekte pozitif sonuç alındığı ancak Nested-PCR yöntemi ile testlenen tüm örneklerde *Ca. P. mali*'nin tespit edildiği belirtilmiştir (Zagrai ve Zagrai, 2013).

Fitoplazmaların deneysel olarak taşınması ile ilgili çalışmalara bakıldığında kültüre alınamayan mikroorganizmalar olmalarından dolayı hastalık teşhisi için en basit yöntemin biyolojik indeksleme yöntemi olduğu bildirilmiş ve "*Candidatus* Phytoplasma mali" inokülasyonu için 4 farklı teknik kullanarak biyolojik indeksleme çalışmaları

karşılaştırılmıştır. Elma ve Cezayir menekşesi üzerine yarma aşısı, kabuk aşısı, göz aşısı ve yonga aşısı olmak üzere dört farklı aşılama tekniği denenmiştir. Yarma ve kabuk aşısının dokuların inceliği ve kırılabilirliğinden dolayı Cezayir Menekşesi için uygun olmadığı ve sadece yonga aşısının tuttuğu, elma ağaçlarında ise en iyi ve en kısa sürede bulaşmaların yonga ve kabuk aşısından elde edildiği belirlenmiştir. Elma fidanlarında ilk fitoplazma simptomlarının aşılamadan 3 ay sonra yarma ve kabuk aşılarında ortaya çıktığı, göz ve yonga aşıda ise belirtilerin daha geç gözlemlendiği bildirilmiştir. Cezayir Menekşesinden Cezayir Menekşesine fitoplazma inokulasyonunun en başarılı şekilde yonga aşısı ile gerçekleştirildiği ve belirtilerin de inokulasyondan sonraki ikinci ayda görüldüğü belirtilmiştir. Enfekteli elmalardan Cezayir Menekşesine yonga aşısı ile fitoplazma inokulasyonunun daha düşük oranlarda olduğu ve belirtilerin ortaya çıkışından önceki latent sürenin daha uzun olduğu belirtilmiş ve biyolojik indeksleme için elma ağacının Cezayir Menekşesinden daha uygun olduğu saptanmıştır (Aldaghi ve ark., 2007a).

2004 yılında yapılan bir çalışmada yeni bir fenomen olan, yeniden iyileşme olarak tabir edilen 'recovery' durumunun gözlemlendiği ağaçlarda fitoplazma varlığına bakılmıştır. EÇSF simptomu gösteren ve göstermeyen ağaçlar üzerinde yapılan serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda iyileşme gösteren ağaçların sürgün ve yapraklarında fitoplazmaların saptanamadığı, ancak kök bölgelerinde etmenin saptandığı bildirilmiştir. 12 yıl boyunca yapılan testlemelerde EÇSF simptomu göstermeyen bu ağaçların köklerinde fitoplazma varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca hem simptomlu hem de iyileşme görülen ağaçların kök ve sürgünlerinden alınan örneklerle aşılama çalışmaları yapılmış, ancak her iki durumda da hastalığın aşısı ile taşınmadığı belirtilmiş ve bu ağaçların köklerinde kolonize olan fitoplazmalar ile ilgili daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Carraro ve ark., 2004).

EÇSF ve AYF' nin neden olduğu fitoplazma hastalıklarının aşısı yoluyla taşınma durumunun belirlendiği bir çalışmada fitoplazmaların kış dönemi boyunca ağaçlardaki varlığı incelenmiştir. EÇSF'nin gövde aşılması yoluyla sadece Şubat döneminde %11 oranında taşındığı, Mart ayında ise uygulanan tüm kalem aşılarının taşınmada etkili olduğu belirlenmiştir. AYF' nin ise Şubat döneminde aşılama yoluyla sadece %1,8 oranında taşınabildiği, Mart döneminde ise tüm denemelerin başarısız olduğu belirtilmiştir. Fitoplazmaların yıl boyunca genellikle köklerde daha yoğun bulunduğu, Nisan ve Mayıs gibi tekrar kökten gövdeye hareket ettiği bildirilmiştir. Ağaçlarda en

yüksek fitoplazma yoğunluğunun yaz sonu ve sonbahar başlarında oluştuğu, dejenerasyonun ise Aralık ayında gerçekleştiği saptanmıştır. Fitoplazma ile enfekteli elma ağaçlarında oluşan dejenerasyonun 13-24°C sıcaklıklar arasında çok yavaş meydana geldiği bildirilmiştir (Seemüller ve ark., 1984).

EÇSF ile enfekteli Cezayir Menekşeleri ve genç elma fidanlarıyla sera ortamında kurulan bir denemelerde fitoplazma ile enfekteli ve sağlıklı test bitkilerinin sıcaklık ile ilişkisi araştırılmıştır. Yapılan DAPI testlemeleri sonucu 21-24°C arasında iyi simptom oluşturan test bitkilerinin yaprak petiollerinde ve kök kılcallarında fitoplazmaya rastlanmış, 29-32°C arasında simptom oluşturmeyen test bitkilerinin sadece köklerinde fitoplazma olduğu saptanmıştır (Ducroquet ve ark., 1986).

In vitro ortamda yapılan bir çalışmada sağlıklı *Malus pumila* elma anaçlarına MM106'den alınan AP ile bulaşık kalemlerden aşilar yapılmıştır. Üç aylık gözlem ve bekleme periyodunun ardından aşı tutma oranının %58-79 arasında değiştiği, doğru zamanda yapılan testlemeler sonucunda AP ile bulaşıklığın %80'den %97'ye kadar çıkabileceği bildirilmiştir (Jarausch ve ark., 1999).

EÇSF hastalığının enfekteli bir ağaçtan sağlıklı başka bir ağaca aşılama sayesinde taşınabildiği bildirilmiştir. Fitoplazmanın taşınmasında enfekteli küçük doku parçalarının kullanımından çok, kalem aşısı uygulamalarının daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca fitoplazma ile enfekteli olduğu bilinen simptom göstermeyen ağaçlardan alınan örneklerde fitoplazma varlığı tespitinde gövde yerine kökten örnek alınmasının daha doğru olduğu, fakat yıl içerisinde fitoplazmaların ağaçların kök kısmından başka kısımlara hareket edebileceği bildirilmiştir (Seemüller ve ark., 2011).

1999-2001 yılları arasında yapılan bir çalışmada EÇSF'nin *Cacopsylla melanoneura* ile sağlıklı elma fidanlarına taşınması araştırılmıştır. EÇSF ile enfekteli olduğu düşünülen psyllidler toplanmış, enfekteli olan psyllidlerin hangi gelişim döneminde taşımaya gerçekleştireceği belirlenmeye çalışılmıştır. Denemeler sonunda kışlayan ergin psyllidlerin etkili bir şekilde hastalığı taşıdığı saptanmıştır. Enfekteli psyllid nimflerinin ve ilkbahar dönemindeki ergin psyllidlerin çok az bir kısmının hastalığı kısa inokulasyon periyodunda taşıyabildiği gözlemlenmiştir. Fitoplazmayı en etkili şekilde *C. melanoneura*'nın kışlayan erginlerinin taşıdığı saptanmıştır (Tedeschi ve Alma, 2004).

Darbe yöntemi kullanılarak vektör böceklerin toplandığı bir çalışmada ‘*Ca. P. mali*’ ve ‘*Ca. P. prunorum*’ un neden olduğu fitoplazma hastalıklarının 2 psyllid türü olan *Cacopsylla melanoneura* ve *Cacopsylla pruni*’ nin farklı gelişim dönemlerindeki varlığı araştırılmıştır. *C. melanoneura*’ nın hiçbir döneminde *Ca. P. mali*’ varlığına rastlanmazken, *C. pruni*’nin yumurta, nimf ve erginlerinde *Ca. P. prunorum*’un varlığı belirlenmiştir. *C. pruni*’ nin nimf ve yeni erginleri üzerinde yapılan denemeler sonucunda dişi bireylerin *Ca. P. prunorum*’u kalıtsal olarak hastalıklı ağaçlardan sağlıklı ağaçlara taşıyabileceği belirtilmiştir (Tedeschi ve ark., 2006).

EÇSF’nin Avrupa’da birçok elma bahçesinde şiddetli enfeksiyonlara neden olduğu, bu hastalığın aşı materyalleri, kök kaynaşmaları ve bitki özsuynunu emen vektör böceklerle taşınabildiği bildirilmiştir. 2006 yılında Kuzey İtalya’da elma bahçelerinde yapılan çalışmada Mart-Haziran aylarında iki psyllid türü *Cacopsylla picta* ve *C. melanoneura*’nın hastalığı yayan önemli türler olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda hastalığın *C. melanoneura* ile taşınma oranı %1’in altında bulunurken, *C. picta* ile taşınma oranının %11-33 arasında değiştiği saptanmıştır (Baric ve ark., 2010).

2012-2013 yıllarında Hırvatistan’da yürütülen bir çalışmada yabani elma ve armut bahçelerinde fitoplazma varlığına bakılmış ve farklı 3 lokasyonda SrX, SrI ve SrIII grubuna giren fitoplazmalar olduğu tespit edilmiştir. Yabani elma bahçelerinden toplanan örnekler ile yapılan Nested-PCR, RFLP ve sekans analizleri sonucunda 2 izolattan birinin Apple Proliferation (SrX) grubu ile diğerinin ise X-diseases (SrIII) grup ile benzerlik gösterdiğini ilk kez belirlemişlerdir (Jezic ve ark., 2016).

2016 yılında yapılan bir başka çalışmada farklı boyalar ve proplar kullanılarak 16SrX grubu fitoplazmalar için real-time PCR protokolleri denenmiş ve hassaslık, spesifiklik açısından Nested-PCR analizleri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına bakıldığında real-time protokollerinin 10-100 defa daha hassas olduğu bir kez daha ortaya konmuştur (Kiss ve ark., 2016)

Hırvatistan’da 2011-2014 yılları arasında elma ağaçları ve vektör psillidler üzerinde yapılan bir çalışmada *Ca. P. mali* varlığı ilk kez belirlenmiş ve karakterizasyonu ortaya konulmuştur. *aceF* gen bölgesi ile gerçekleştirdikleri filogenetik analizler sonucunda Hırvatistan izolatlarının daha önce tanımlanmış fitoplazma izolatlarının *aceF* genleri ile benzerlik gösterdiği ve kayıt altına alınmamış yeni bir *aceF* gen bölgesi belirlendiği belirtilmiştir (Krizanac ve ark., 2017)

Slovenya’da 2012-2015 yılları arasında elma ve kayısı bahçelerinden toplanan örnekler ile yapılan bir çalışmada AP grubu içerisine giren *Ca. P. mali* ve *Ca. P. prunorum* etmenlerinin moleküler çeşitliliği ortaya konmuştur. *aceF*, *pnp*, *secY* ve *imp* gen bölgeleri kullanılarak yapılan çalışmada *Ca. P. mali* için *imp* geninin en değişken gen bölgesi olduğu belirlenmiştir (Dermastica ve ark., 2018).

2.2. Ülkemizde Fitoplazmalar Konusunda Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de 1966-1969 yılları arasında Ankara, Afyon, Eskişehir, Kayseri, Konya, Kırşehir, Nevşehir ve Niğde’de yapılan bir survey çalışmasında meyve bahçeleri ile fidanlıklarda *Pyrus malus* L. Amasya, Golden Delicious, Starking Delicious, Kanada Reinette İngiliz, Hüryemez, Bodur ve Ferik elma çeşitlerinde Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma hastalığı ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda görülen semptomlara bakılarak hastalığın sadece Ankara’da Ayaş meyve fidanlığında Rome beauty ve Golden Delicious meyve fidanı çeşitlerinde olabileceği bildirilmiştir (Özkan ve Kurçman, 1976).

2005-2006 yılları arasında Mayıs ve Kasım aylarında yürütülen bir survey çalışmasında Isparta, Yalova ve Ankara illerindeki elma bahçelerinden fitoplazma varlığı şüphesiyle toplanan 334 adet örnek fitoplazma enfeksiyonları açısından incelenmiştir. Yapılan DAPI boyama, DAS ELISA, Nested PCR ve RFLP analizleri sonucunda Isparta ve Ankara illerinden toplanan 9 adet elma örneğinde ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ tespit etmiştir. *RsaI* ve *SspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri sayesinde RFLP ile izolatların karakterizasyonu ve benzerlik dizi analizleri ile akrabalık durumları belirlenmiştir (Canik, 2007).

2004 yılında Ağustos ve Eylül ayları arasında yapılan bir survey çalışmasında 17 farklı bahçeden 10 farklı elma çeşidinden 28 semptom gösteren ve 3 semptom göstermeyen elma ağacının sürgün ve yapraklarından örnekler toplanarak testlenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda Adana ve Niğde illerinden toplanan 6 örneğin ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2008).

2008 yılı Ağustos-Ekim ayları arasında Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Merkezi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakùltesi, Isparta ile Osmaniye’deki bazı

bahçelerden şüpheli sürgün örnekleri toplanmış, Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemiyle EÇSF (*Candidatus Phytoplasma mali*) varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. 28 bahçeden toplanan 150 bitkiden sadece dört tanesinde EÇSF saptanmıştır. Fitoplazma ile bulaşık dört örneğin üç tanesinin DNA dizilemesi yapılmış, referans izolatlarla karşılaştırmış ve %94-99 oranında benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Dağtekin, 2009).

Hatay'da kurulan bir denemede EÇSF (*Candidatus Phytoplasma mali*) ile enfekteli ağaçlardan alınan aşı gözleri sağlıklı fidanlara aktarılarak EÇSF'nin aşıyla taşınma etkinliği belirlenmiştir. Sera şartlarında 100 adet zerdali anacına daha önce pozitif bulunan referans EÇSF izolatı inokule edilmiştir. Aşılamaların ardından yapılan testlemeler sonucunda fitoplazmanın aşı ile taşınma oranı %12,76 olarak belirlenmiştir (Gültekin, 2011).

Türkiye'de ilk kez yapılan bir çalışmada yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında hastalığa neden olan fitoplazmaların önemli vektörlerinin psyllidler olduğu bildirilmiştir. 2010-2011 yılları boyunca yabani ve kültür formda çeşitli yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından potansiyel vektör olabilecek psyllid türleri toplanarak, *Candidatus Phytoplasma mali* ile enfekteli olma durumu ortaya konmuştur. Toplanan psyllidlerin morfolojik özelliklerine bakılarak bu vektör böceklerin *Cacopsylla picta*, *C. melanoneura* ve *C. affinis* karışımı, *C. crataegi*, *C. pyrisuga*, *C. pyri*, *C. pyricola* ve *Cacopsylla* türleri olduğu saptanmıştır. Fitoplazma ile enfekte oranı en yüksek psyllid türünün *C. picta* (%4,36) olduğu, sırasıyla ardından gelen türler *C. pyri* (%3,84), *C. melanoneura* ve *C. affinis* karışımı (%2,77) ve *C. crataegi* (%1,67) olarak belirlenmiştir. *C. pyrisuga*, *C. pyricola* ve bazı *Cacopsylla* türlerinde fitoplazma saptanamamış, *C. picta*, *C. melanoneura*-*C. affinis* karışımı ve *C. pyri* türlerinde hem *Ca. P. mali* hem de *Ca. P. pyri* belirlenirken, *C. crataegi*'de sadece *C. pyri* varlığına rastlanmıştır (Kaya ve ark., 2016).

Ankara ve Isparta illerini kapsayan bir çalışmada elma, armut ve kayısı ağaçlarından örnekler toplanmış, universal ve grup spesifik primerler kullanılmış, *TruI*, *RsaI*, *SSpI* enzimleri ile RFLP analizleri yapılmıştır. Kayısı ağaçlarında 16SrX grubu karışık enfeksiyonların olduğunu belirlemişlerdir. Armut ağaçlarından alınan örneklerin 16SrX-A ve C ile enfekteli olduğunu, elma ağaçlarından alınan örneklerin ise 16SrX-A ile enfekteli olduğunu ortaya koymuşlardır (Canik ve ark., 2019).

2.3. Dünyada Endofitik Funguslar Konusunda Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda fitoplazmalara karşı endofitik funguslarla biyolojik mücadele çalışmaları başlamış olup, ümit-var sonuçlar elde edilmiştir (Musetti ve ark., 2011).

Endofitler yaşamlarının tümünde veya belli bir kısmında canlı bitki dokularını istila eden ve bitki dokularının tamamında belirgin olmayan simptomsuz enfeksiyonlara neden olan ancak hiçbir hastalık oluşturmeyen fungus veya bakteriler olarak tanımlanmıştır (Wilson, 1995).

Konukçu bitkilerinin canlı dokularında hiçbir semptom oluşturmada yaşam döngülerini geçiren endofitik funguslar bitkileri patojenik funguslar, bakteriler, böcekler ve nematodlara karşı koruyan etmenlerdir. Yapılan araştırmalarda biyolojileri ve etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmasına rağmen bu fungusların hastalıkların kontrolünde kullanılan antibiyotikler gibi önemli ikincil metabolitler ve biyoteknolojik ajanlar olduğu belirtilmiştir (Gimenez ve ark., 2007).

Simptom oluşturmeyen endofitler ilk olarak 1898 yılında *Lolium temulentum* tohumlarından izole edilmiş ve kültüre alınmıştır (Vogl, 1898).

Endofitlerin yaşamları boyunca konukçuları ile yakın ilişkiler içinde gelişmekte oldukları, konukçuya veya dokuya özelleşmiş oldukları ortaya konulmuştur (Zhou ve Hyde, 2001; Tao ve ark., 2008).

Endofit varlığının konukçu bileşenine bağlı olduğunun düşünülmesinin yanında saprofitik organizmalar ile konukçu arasındaki özgünlüğün de bitki içerisindeki endofitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Paulus ve ark., 2006).

Yapraklardaki ve odun dokularındaki endofitlerin konukçuya, konukçu cinsi veya konukçu familyasına spesifik olduğu belirtilmiştir (Arnold, 2007). Bu özgünlüğün baştaki endofit kolonizasyonuna veya yaprak yada odun kısmındaki maddelere bağlı olduğu bildirilmiştir (Paulus ve ark., 2006; Hyde ve ark., 2007).

Endofitik fungusların latent patojenler olduğu (Brown ve ark., 1998; Jumpponen, 2001; Photita ve ark., 2004), mikoriza fungusları (Sieber, 2002) veya saprofitik organizmalar (Gardes, 2002; Promputtha ve ark., 2007) gibi ortak yaşama uyumlu oldukları ve konukçu dokularında saptanabildikleri ortaya koyulmuştur (Mostert ve ark., 2000; Schulz ve Boyle, 2005).

Fungal endofitlerin ekosistemde ayrışmalarda ve besin döngüsünde önemli yere sahip oldukları ve birçok bitkinin kökünde simbiyotik yaşamları sonucu faydalar sağladıkları bildirilmiştir (Christensen, 1989).

Endofitik mikroorganizmaların birçoğunun antibiyotikler ve antitümöral ilaçlara benzer biyoteknolojik bileşimler üretebilme yeteneğinde oldukları belirlenmiştir (Schulz ve ark., 2002).

Fungal endofitlerin yapısal ve fonksiyonel olarak konukçu bileşenlerine benzer metabolitler geliştirdiği bilinmektedir (Strobel, 2002). Ayrıca fungal endofitlerin gibberellinler gibi bitki büyüme hormonlarını da üretebilme yeteneğinde oldukları saptanmıştır (MacMillan, 2002).

Endofit organizmalarının ekolojik rolü tam olarak belirlenememekle birlikte bu organizmaların birçoğunun konukçularını pozitif etkilediği bilinmektedir. Bu organizmaların bitki gelişimini teşvik ettiği, stres koşullarına karşı bitkilerde dayanıklılık geliştirdiği ve konukçularını hastalık ve zararlılara karşı koruduğu belirlenmiştir (Rodriguez ve ark., 2008).

Fitoplazmaların neden olduğu hastalıkların iyileşmesi olarak isimlendirilen oluşum (recovery phenomen) üzerine son zamanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında biyokontrol ajanlarının fitoplazma hastalıklarının mücadelesindeki rolleri araştırılmaya başlanmıştır. Endofitler olarak tanımlanan kontrol ajanlarının sağlıklı ve fitoplazma ile enfekteli bitkiler üzerine uygulanması sonucu fitoplazma ile ilişkili hastalıkların semptomlarında azalmaların görüldüğü belirtilmiştir (Bianco ve ark., 2013).

Aurebasidium pullulans (de Bary) Arnoud ve *Epicoccum nigrum* Link her yerde bulunabilen mikrofunguslardandır ve birçok üründe endofit olarak saptanmışlardır (Musetti ve ark., 2005; Rodolfi ve ark., 2006; Prasongsuk ve ark., 2005). Her iki fungusun antibiyotik üretebildiği ve fitopatogenik funguslara karşı antagonistik etki gösterebildiği saptanmıştır (Madrigal ve ark., 1991). Aynı zamanda bu fungusların hasat öncesi ve sonrası oluşan bazı hastalıklara karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Elmer ve ark., 2001; Schena ve ark., 2003).

Fitoplazma hastalıklarının mücadelesine yönelik yapılan çalışmalarda bağ alanlarında enfekteli, sağlıklı ve iyileşme gösteren bitki bünyelerinde fungal edofitlerin varlığı belirlenmiştir. Belirlenen bu endofitlerin biyokontrol ajanları olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Grisan ve ark., 2011).

EÇSF ile enfekteli bitkilerde belirtilerin doğal olarak azalması iyileşme olarak adlandırılmaktadır. İyileşme belirtisi gösteren bitkilerde fizyolojik ve moleküler temellere dayanan çalışılmalar yapılmış (Musetti ve ark., 2004; 2010) ve bu durumun bitkilerde sistemik kazanılmış dayanıklılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (Musetti ve ark., 2004). Endofit mikroorganizmaların ise konukçularında meydana getirdikleri dayanıklılıkta rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Martini ve ark., 2009).

Son zamanlarda ortaya konulan hipoteze göre iyileşme belirtisi gösterme olarak adlandırılan belirtilerde beklenmedik azalmaların S.A.R (Systemic Acquired Resistance, sistemik kazanılmış dayanıklılık) mekanizması ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Fitoplazma enfeksiyonlarına karşı savunma mekanizmasının artırılmasında endofitik mikroorganizmaların aktif rol oynadığı düşünülmektedir (Musetti ve ark., 2011).

Endofit fungusların bazı fungal, bakteriyel hastalıklar ve EÇSF gibi fitoplazma hastalıklarına karşı etkileri son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır. İtalya'da deneysel konukçu Cezayir Menekşesinde (*Catharanthus roseus*) EÇSF ile endofitik fungus *Epicoccum nigrum* arasındaki ilişkiler araştırılmış, EÇSF aşılınmış ve *Epicoccum nigrum* ile muamele edilmiş bitkilerde belirtil şiddetinde bir azalma gözlenmiş, Real-time PCR sonuçlarına göre de fitoplazma konsantrasyonu sağlıklı bitkilere oranla 2-8 kat daha düşük bulunmuştur (Musetti ve ark., 2011).

Epicoccum nigrum'un ürettiği antibiyotiklerin *Monilia laxa*'ya etkili olduğu bildirilmiştir. Bu etmenin bağlarda *Plasmopara viticola* ve *Botrytis cinera* (Kortekamp, 1997; Fowler ve ark., 1999) pamukta ise *Pythium* türlerini (Hashem ve Ali, 2004) inhibe edici özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Endofit mikroorganizmalar üzerine yapılan farklı bir çalışmada ise *Ca. P. mali* ile enfekteli ağaçlardaki bakteriyel endofit durumuna bakılmış, farklı ağaçlardan farklı türler izole edilmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen bakteriyel endofitlerin bazılarının farklı bitki patojenlerine karşı biyokontrol ajanı olduğunu; fitoplazma hastalıklarına karşı vektör böcek mücadelesi dışında sürdürülebilir kontrol yöntemlerinin mümkün olabileceğini belirtmişlerdir (Bulgari ve ark., 2012).

Ülkemizde *Ca. P. mali* varlığı saptanmasına rağmen temene karşı endofitik fungusların etkileri konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma 2013-2018 yıllarında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ve Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Biyoteknoloji ve Mikoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmada kullanılacak olan Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF) belirtisi gösteren bitki materyalleri İçel, Adana, Niğde, Isparta; Hatay, Karaman illeri elma yetiştirilen alanlarda fitoplazma benzeri simptom gözlenen elma ağaçlarından alınmıştır. İçel'de Gülnar, Gözne, Mut, Uzuncaburç ve Arslanköy'den; Adana'da Havutlu, Pozantı ve Sarıçam'dan; Niğde'de Çamardı ve Ulukışla'dan; Isparta'da Eğirdir'den; Hatay'da İskenderun'dan ve Karaman merkezde bulunan simptomlu elma ağaçlarından sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Aynı bahçelerde gerek sağlıklı gerekse hastalık belirtisi gösteren elma ağaçlarından endofit fungusların teşhisi için de örnekler alınmıştır. DNA izolasyonları ve PCR analizlerinde tampon çözeltiler, primerler, agaroz jel ve jel görüntüleme sistemleri kullanılmıştır. Endofit fungusların izolasyonunda patates dekstroz agar (Difco) ve patates dekstroz broth (Difco) besi ortamları, antibiyotikler, petri kapları kullanılmıştır. Patojenisite testlerinde torf ve perlit gibi bitkisel üretim malzemeleri saksılar ve test bitkileri kullanılmıştır.

Fitoplazma gruplarını temsil eden izolatların (+) DNA örnekleri Xavier Foissac (INRA, Fransa) ve Prof. Dr. Assunta Bertaccini (İtalya)'dan temin edilmiştir. Sağlıklı GF305 şeftali yaprakları negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca model bitki olan Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) 22-25°C gündüz sıcaklığı, 12-16°C gece sıcaklığı %40-80 nem ve 16h fotoperiyot koşullarındaki serada tohumdan yetiştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *in vitro* cv. Golden Delicious elma fidanları ticari olarak üretim yapan firmalardan satın alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *in vitro* cv. Golden Delicious fidanları (sol) ve Cezayir Menekşeleri (sağ)

EÇSF hastalığı ile enfekteli ağaçlardan alınan gözler ile cv. Golden Delicious elma fidanlarına ve Cezayir Menekşelerine aşılama çalışmaları yapılmış; söz konusu etmen karantina Ek-I A grubu patojen listesinde yer alarak potansiyel tehlike olarak kabul edildiğinden tüm çalışmalar böcek geçirmeyen tel seralarda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması Konusunda Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Arazi Çalışmaları

İçel ve Adana illerinde daha önce EÇSF hastalığı tespit edilmiş olan elma bahçelerinden örnekleme yapılarak çalışılmaya başlanmıştır (Ulubaş Serçe, TÜBİTAK 109O448, yayınlanmamış veriler). 2013-2014 yıllarında Adana ve İçel illerinde elma yetiştiriciliği yapılan yerlerde periyodik olarak iki ayda bir olacak şekilde yıl boyunca arazi çıkışları yapılmıştır. 2013 ve 2014 yıllarında aşı kalemi temini için yapılan arazi çıkışlarında fitoplazma pozitif bulunan ağaçların sökülmesi olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle 2015-2018 yılları arasında EÇSF'nin daha önce rapor edildiği Niğde, Hatay, Isparta ve Karaman illerine arazi çıkışları yapılarak aşırı sürgün oluşumu, gelişme geriliği ve stipüllerde büyüme simptomu gösteren elma ağaçlarından örnekler toplanmıştır (Şekil 3.2).

Örnekleme elma yetiştirilen bahçelerin %1'ini temsil edecek şekilde gerçekleştirilmekle birlikte ev bahçelerinden de örnekler alınmıştır. Her ilde EÇSF ile enfekteli olabileceği düşünülen şüpheli ağaçların her birinden, ağacı temsil edecek

şekilde dört yanından sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler polietilen torbalara ayrı ayrı konulmuş, etiketlenmiş ve testlenmek üzere Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Biyoteknoloji Laboratuvarına soğutuculu termoslar içerisinde getirilmiştir. Getirilen örneklerden fotoğraflamalar yapılmış, kayıtları tutulmuş, DNA izolasyonları ve iki aşamalı Nested-PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması ile enfekteli bitki materyali temini için örnek toplanan alanlar

3.2.1.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Aşı İle Taşınma Etkinliğinin Saptanması

EÇSF'nin inokulum kaynağı olarak tutulması için gerçekleştirilen çalışmalarda aşı ile taşınma denemeleri kurulmuştur. 2013-2018 yılları arasında gerçekleştirilen arazi çalışmaları sırasında toplanarak Nested-PCR ve RLFP analizleri tamamlanıp *Ca. P. mali* ile enfekteli olduğu belirlenen elma ağaçlarından alınan aşı kalemleri hem cv. Golden Delicious elma fidanlarına hem de test bitkisi olarak kullanılan Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*)'lerine göz ve kabuk aşısı ile aşılanmıştır. Aşılama çalışmalarında fitoplazma pozitif bulunan her bitki için 3 tekerrür olacak şekilde deneme kurulmuş, toplamda 2 bitki negatif kontrol olarak bırakılmıştır. Pozitif olduğu bilinen sürgünlerden hem kabuk hem de durgun göz aşısı yapılmıştır. Aşılamalar fitoplazma konsantrasyonunun en yüksek olduğu Ekim-Kasım aylarında yapılmıştır. Aşılanan tüm

bitkiler böcek girişinin engellendiği tel seralarda kontrollü koşullar altında muhafaza edilmiş ve bakımları düzenli olarak yapılmıştır. Aşılama yapılan bitkilerde aşı bölgesinin nemli tutulabilmesi için bitkilerin üzerine aşı bölgesini kaplayacak şekilde naylon poşet geçirilmiş ve naylon poşet kademeli olarak açılmıştır.

3.2.1.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Vektör Böcekle Taşınma Etkinliğinin Saptanması

EÇSF'nin vektör böceklerle taşınma etkinliğinin saptanması çalışmaları kapsamında 2017 yılının Mart ve Mayıs ayları arasında hastalığın potansiyel vektörü olduğu bilinen psyllidlerin (*Cacopsylla spp.*) İçel ilindeki enfekteli bahçelerde varlığı gözlenmiştir. Kışlayan erginler Nisan sonu-Mayıs başında görülmüş ve örneklemeler yapılmıştır. Örneklemeler elma bahçelerinde enfekteli olduğu düşünülen ağaçların 4 farklı yönünü temsil edecek şekilde Steiner hunisi kullanılarak, darbe yöntemiyle toplanmıştır. Darbeler sonucu kavanoz içerisine düşen vektör böcekler fırça yardımıyla toplanmış, ağızları tül ile kapatılan falkon tüplere aktarılmış ve buz aküleri içerisinde Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiş ve taşıma çalışmalarında kullanılmıştır. Toplanan psyllidler (*Cacopsylla spp.*) tohumlardan ekim yapılarak yetiştirilen 4-6 aylık test bitkilerine (*Catharanthus sp.*) ve 1,5 yaşında olan elma fidanlarına (Golden delicious) salınmıştır. Deneme kapsamında 10 adet test bitkisine bitki başına 5 ergin, 5 adet elma fidanına bitki başına 10 ergin olacak şekilde salım yapılmıştır.

Böcek aktarılan test bitkileri böcek geçirmeyen tel kafesler içerisine konulmuş ve deneme kontrollü koşullar altında 20-24°C sıcaklıkta iklim odalarında muhafaza edilmiştir. Böcek salımı yapıldıktan 15-20 gün sonra salınan böcekler fırça yardımı ile toplanmış, hem böceklerden hem de bitkilerden DNA ekstraksiyonu ve ardından PCR analizleri yapılmıştır.

3.2.1.4. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması Konusunda Yapılan Moleküler Çalışmalar

3.2.1.4.1. DNA İzolasyonu

Araziden toplanan bitki materyallerinin DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'e göre yapılmış, elde edilen total nükleik asitlerin konsantrasyonu Nanodrop ile ölçülmüştür.

1. Yaprak orta damarı ya da sürgünlerden floem dokusundan alınmış 1gr. taze doku steril havanda sıvı azot ile ezilmiştir.
2. Her bir örneğe 5ml %2.5'lük CTAB eklenmiştir (Bu aşamada CTAB solüsyonuna taze olarak %0.2 oranında 2-mercaptoetanol eklenmiştir).
3. Havanlardaki homojenattan 1 ml alınarak 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
4. Tüpler 30 dakika 65 °C'deki su banyosunda inkübe edilmiştir.
5. Su banyosundan alınan tüpler üzerlerine 1ml 24:1 chloroform:isoamilalkol eklenerek vortexlenmiştir.
6. Tüpler 13.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Oluşan supernatant temiz bir tüpe alınarak üzerine 2/3 hacim soğuk isopropanol eklenmiş ve tüpler 2-3 defa alt üst edilerek hafifçe karıştırılmıştır.
8. Tüpler 13.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Oluşan supernatant dikkatlice dökülerek, pellet üzerine 1ml %70'lik etanol eklenip 5-15 dakika beklenmiştir.
10. Tüpler 11.400 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüjden alınan tüplerdeki etanol dökülerek tüpler 37°C'de kurutulmuştur.
12. Kuruyan tüplere 400 µl TE buffer eklenip oda sıcaklığında 10-30 dakika bekletilmiş, tüplere 1/10 hacim sodyum asetat, 2 hacim %95 soğuk etanol eklenip hafifçe karıştırılmıştır.
13. Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
14. Oluşan supernatant dikkatlice dökülüp, pellet üzerine 1.5ml %70'lik etanol eklenip 5-15 dakika bekletilmiştir.
15. Tüpler 11.400 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

16. Santrifüjden alınan tüplerdeki etanol dökülüp tüpler vakumda 5 dakika kurutulmuştur.
17. Kuruyan tüplere 400 µl TE buffer eklenip oda sıcaklığında 10-30 dakika bekletilmiş, tüplere 1/10 hacim sodyum asetat, 2 hacim %95 soğuk etanol eklenip hafifçe karıştırılmıştır.
18. Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
19. Oluşan supernatant dikkatlice dökülüp, pellet üzerine 1.5ml %70'lik soğuk etanol eklenip 5-15 dakika beklenmiştir.
20. Tüpler 11.400 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
21. Santrifüjden alınan tüplerdeki etanol dökülüp tüpler vakumda 5 dakika kurutulmuş, oluşan supernatant dikkatlice dökülüp, pellet üzerine 1.5ml %80'lik soğuk etanol eklenip 5-15 dakika beklenmiştir.
23. Tüpler 11.400 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
24. Santrifüjden alınan tüplerdeki etanol dökülüp tüpler vakumda 5 dakika kurutulmuştur.
25. Kuruyan tüplere 100 µl TE buffer eklenerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.4.2. PCR Analizleri

Ekstrakte edilen DNA'lardan fitoplazma teşhisi iki aşamalı yöntemle universal primerler kullanılarak yapılmıştır. İlk aşamada (Direkt-PCR) 1800 bp ürün veren P1 (Deng ve Hiruki, 1991) / P7 (Smart ve ark., 1996) primer çiftleri; ikinci aşamada (Nested-PCR) ise 1050 bp ürün veren F01 / R01 (Lorenz ve ark., 1995) primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Candidatus* Phytoplasma mali'nin teşhisi amacıyla kullanılan universal primerlerin dizileri

	Primer	Baz Dizilimi (5'-3')	Referans
Direct-PCR	P1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA	Deng ve Hiruki, 1991
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart ve ark., 1996
Nested-PCR	F01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT	Lorenz ve ark., 1995
	R01	AAGTGCCCAACTAAATGAT	Lorenz ve ark., 1995

Direkt-PCR aşamasında nükleik asitler 1/30 oranında sulandırılarak hazırlanan karışımdan 1 µl alınıp 24 µl'lik reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 2 ünite *Taq* 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 oluşturulmuştur.

Direkt-PCR'dan sonra uygulanan Nested-PCR aşamasında F01/R01 primerleri kullanılmıştır. Direkt-PCR ürünleri 1/30 oranında sulandırıldıktan sonra, karışımdan 1 µl alınarak yeni hazırlanan reaksiyon karışımına eklenmiştir. Nested-PCR'da ise tüpler 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C'de 5 dakika olacak şekilde yapılmıştır (Lee ve ark., 1998).

3.2.1.4.3. Jel Elektroforez

PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla ürünler %1.2'lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez 1XTAE ortamında gerçekleştirilmiş ve jelin hazırlanmasında da yine aynı ortam kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme tamponu ile 12 µl Nested-PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiş ve 120 Voltta 45 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Jelde ürünlerin yürütülme işlemi bittikten sonra jel 1 mg/µl Etidyum bromid içeren 1XTAE ortamında 3-5 dakika süreyle boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jeller UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir (Lee ve ark., 1992).

3.2.1.4.4. RFLP Analizi

PCR ürünlerinin RFLP analizleri amacıyla Nested-PCR sonucu referans izolatlarla aynı seviyede bant oluşturan fitoplazma pozitif örneklerin PCR ürünleri 5-15 µl'si restriksiyon endonükleaz enzimlerinden *RsaI* ve *SspI* ile kesilmiştir. PCR ürünleri *SspI* ve *RsaI* enzimleri ile 37°C'de 1-16 saat kesime tabi tutulmuştur. Kontrol amacı ile farklı fitoplazma gruplarına ait izolatlar da enzim kesimine dahil edilmiştir. Oluşan band

profillerine göre (Lee ve ark., 1998) '*Candidatus Phytoplasma mali*' ile enfekteli bulunan örnekler aşılama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.1.4.5. Sekans Analizleri

PCR ile beklenen seviyede bant veren ve RFLP analizinde pozitif kontrollerle aynı bant profili elde edilen izolatlara ait PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi aşaması ticari firmadan (BM Labosis, Ankara) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Kaba baz dizisi kromotogramları ChromasPro 1.7.6 kromotogram analiz programıyla birleştirilmiş ve düzenlenmiştir. Elde edilen diziler NCBI gen bankası veri tabanında BLAST analizleri ile karşılaştırılmıştır. Veri tabanındaki kayıtlı izolatlarla eşleşme gösterenlerden seçim yapılarak Mega 7 programı ile sekans hizalama ve nükleotit dizilerinin benzerlik oranları belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2016). Filogenetik analizler Maximum Likelihood method Kimura 2 parameter method 3 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kimura, 1980).

3.2.1.4.6. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)

Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA'lardan fitoplazma teşhisi, hedef nükleik asit miktarlarının belirlenmesi ve nükleik asit miktarlarındaki değişimleri belirlemek amacı ile genel fitoplazma tespiti için kullanılan fitoplazma spesifik TaqMan yöntemi kullanılarak Real-time analizleri yapılmıştır (Christensen ve ark., 2004).

Çizelge 3.2. Teşhis ve patojen değişimlerini belirlemek amacıyla kullanılan fitoplazma spesifik primer ve prob dizileri

Primer	Baz Dizilimi (5'-3')	Referans
Fitoplazma F	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	Christensen ve
Fitoplazma R	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA	ark., 2004
Probe FAM-TAMRA	TGACGGGACTCCGCACAAGCG	

Çizelge 3.3. Fitoplazma teşhisi amacıyla yapılan Real-time PCR’da kullanılan karışım içeriği

Roche 480 probes master	10 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Probe (2,5 µM)	0.75 µl
Su	2.25 µl
Genomik DNA	5 µl

Çizelge 3.4. Fitoplazma teşhisi amacıyla kullanılan Real-time PCR döngüleri

Real-time PCR		
95 °C	10 dk	1 döngü
95 °C	10 sn	45 döngü
60 °C’de (okuma açık)	1 dk	

3.2.2. Endofit Funguslar Konusunda Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1. Endofit Funguslar İle İlgili Arazi Çalışmaları

Yapılan Nested-PCR çalışmalarında sağlıklı ve *Ca. P. mali* ile enfekteli olduğu saptanan elma ağaçlarından yeniden örnek toplanmış ve endofit fungus çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla özellikle endofit fungusların daha aktif olduğu sonbahar aylarında, Nested-PCR analizleri ile sağlıklı ve fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanan elma ağaçlarının farklı dallarından iki yıllık sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Örnek alınırken ağaçların dört farklı yönünden ve farklı dallarından örnekleme yapılmasına dikkat edilmiştir. Her bir ağaçtan en az 5 yaprak ve 5 sürgün örneği alınmıştır. Örnekler kese kağıtlarına sarılıp etiketlendikten sonra içinde buz kutuları bulunan termoslar yardımıyla laboratuvara getirilmiş ve izolasyon yapıncaya kadar 4°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofit Funguslar İle İnokulasyonu

Endofit fungus izolasyonu Liu ve ark. (2001)’nin önerdikleri yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda besi ortamı olarak bakteri gelişiminin engellenmesi amacıyla streptomisin ve tetracycline ilave edilmiş Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamı kullanılmış ve kullanılan ortamda herhangi bir gelişme olup olmayacağını gözlemlemek

amacıyla hiçbir ekim yapılmadan ortama saf su ilave edilerek iç kontrol uygulaması yapılmıştır.

Öncelikle bitki örnekleri akmakta olan musluk suyu altında 5 dakika ve ardından %70 etanolde 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dakika bekletilen örnekler 3 kez steril saf su ile durulanmış ve sürgünler 1 cm'lik, yapraklar ise 1 cm²'lik parçalara ayrılmıştır. Son olarak sürgün örnekleri besi ortamına alınmadan önce boyuna 2'ye ayrılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Laboratuvar ortamında endofit fungus izolasyonu için toplanan bitki materyallerinin hazırlanışı

Bu şekilde yüzey sterilizasyonu yapılmış bitki parçalarından en az 10'ar yaprak ve sürgün örneği 350 mg/L streptomisin ilave edilmiş PDA ortamı bulunan petri kaplarına steril kabin içerisinde aktarılmıştır. Petri kapları 25 °C'ye ayarlanmış karanlık bir

inkübatörde 5-7 gün süreyle bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, Barac ve ark. (2004)'nın önerdikleri kriterlere göre funguslar koloni morfolojisi ve miselyumları ile konidiosporlarının mikroskop altında incelenmesiyle cins düzeyinde teşhis edilmiştir. Teşhisi yapılan koloniler daha sonra PDA ortamında alt kültüre alınarak 4°C'ye ayarlanmış soğutucularda saklanmıştır (Şekil 3.4).

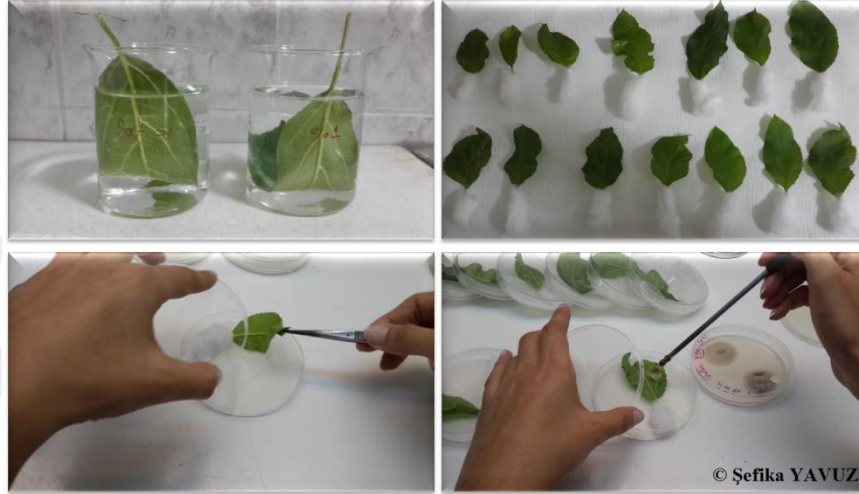


Şekil 3.4. Laboratuvar ortamında fitoplazma ile enfekteli ve sağlıklı elma dokularından endofit fungusların izolasyon çalışmaları

3.2.2.3. Patojenisite Çalışmaları

PDA'da gelişen farklı fungus izolatlarıyla elma fidanlarından alınan yapraklar kullanılarak patojenisite çalışması yapılmıştır. Elma fidanlarından alınan elma yaprakları sodyum hipoklorit ve tween içeren su içerisinde bekletilip saf su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan yaprakların sap kısımlarına pamuk sarılıp ıslatılarak nemli ortamda kalması sağlanmıştır. Nemlendirilen yapraklar nemli kurutma kağıdı

içeren petrilere yerleştirilmiştir. Gelişen funguslardan diskler alınarak nemlendirilen yapraklar üzerine konulmuştur. Kontrol olarak ise temiz PDA'dan alınan diskler yapraklar üzerine yerleştirilmiştir. Petrilere yerleştirilen yapraklar üzerindeki gelişimler 1 haftalık inkübasyon periyodunun ardından gözlemlenmiştir. Yaprak üzerinde oluşan simptomlara bakılarak patojen özelliği olan funguslar elenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Morfolojik olarak tespit edilemeyen fungal örneklerin patojenite çalışmaları

3.2.2.4 Endofit Funguslar İle İlgili Moleküler Çalışmalar

3.2.2.4.1. DNA İzolasyonu

Funguslardan DNA izolasyonu Lecellier ve Silar (1994)'ın önerdikleri yöntemle yapılmıştır. Buna göre;

1. PDA'da geliştirilen fungusların taze kültürlerinden 450 mg miselyum spatula yardımı ile alınmıştır. Miseller 3 ml ekstraksiyon buffer (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl ve 2% SDS) içerisinde steril bir havanda homojenize edilmiştir.
2. Homojenattan 1 ml alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılıp vortexlenmiştir.
3. Vortexlenen tüpler 30 saniye sıvı azotta bekletilip 70°C'lik su banyosunda ısıtılmıştır.
4. Vortexleme ve dondurup ısıtma işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra tüpler 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.

5. Oluşan supernatant yeni bir tüpe aktarılıp eşit hacimde fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) ile 2 kez yıkama yapılmış, ardından 8.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Yeni tüpe alınan supernatant eşit hacimde kloroform:isoamilalkol (24:1) ile 1 kez yıkanmıştır.
7. Tüpler 8.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Elde edilen supernatant yeni bir tüpe aktarılıp üzerine 2/3 hacim soğuk isopropanol eklenip hafifçe karıştırılmıştır.
9. Tüpler 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
10. Oluşan pellet 0.5 ml %70 soğuk etanol ile yıkanmıştır.
11. Tüpler 12.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant dökülmüştür.
12. Pellet kuruduktan sonra üzerine 400 µl TE buffer, 1/10 hacim 3M sodyum asetat ve 2 hacim % 95 soğuk etanol eklenip hafifçe karıştırılmıştır.
13. Tüpler 14.000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlenip oluşan supernatant dökülmüştür.
14. Oluşan pellet 1 ml %70'lik etanol ile 2 kez, 1 ml %80'lik etanol ile 1 kez yıkandıktan sonra kurutulmuştur.
15. Kuruyan pellet üzerine 100 µl TE buffer eklenmiştir.
16. Son adımda örnekler RNase ile muamele edilip 1 saat süreyle 37 °C'de bekletilmiştir. DNA konsantrasyonları spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.2.4.2. PCR Analizi

Ekstrakte edilen DNA'lardan endofit teşhisi yaklaşık 500-600 bp ürün veren ITS1/ITS4 primer çifti kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 3.5). PCR aşamasında nükleik asitlerden 1µl alınıp 24 µl'lik reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'ler, 0.4 µM primerler, 0.625 ünite *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. PCR döngüsü; 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 54°C'de 1 dakika ve 72 °C'de 1 dakikadan oluşan 38 döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikadan oluşmuştur.

Çizelge 3.5. Fungal endofitlerin teşhisi amacıyla kullanılan primer dizileri

Primer	Baz Dizilimi	Referans
ITS1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	(Gardes ve Bruns, 1993)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	(Gardes ve Bruns, 1993)

3.2.2.4.3. Jel Elektroforez

PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi 3.2.1.4.3.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. (Lee ve ark., 1992).

3.2.2.4.4. Sekans Analizleri

PCR ile çoğaltılan her bir izolata ait PCR ürününün DNA dizilerinin belirlenmesi amacıyla ticari firmadan (İontek, İstanbul) hizmet alımı yapılmış ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Sekans analizleri 3.2.1.4.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.3. Vektör Böcekler İle İlgili Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

Toplanan böceklerin alkol ve saf su kullanılarak yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra DNA izolasyonları Thermo Fisher Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak yapılmıştır.

1. Araziden toplanan vektör böcekler alkol ve saf su ile steril edildikten sonra her bir birey 1 örnek kabul edilerek eppendorf tüp içerisine alınmış ve ezme çubuğu ile ezilmiştir.
2. Her tüpe 180 µl Digestion Solution eklenerek ezme çubuğu ile karıştırılmış ve üzerine 20 µl Proteinase K eklenerek tüpler alt üst edilmiştir.
3. Tüpler 400 rpm'de 56°C'de 45 dk inkübasyona tabi tutulmuştur.
4. Tüpler içerisine 20 µl RNase A Solution eklenir, arada bir çalkalanarak oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.

5. Bekleme süresinin ardından tüplere 200 µl Lysis Solution eklenerek vortexlenmiştir.
6. Her tüpe 400 µl %50 Ethanol eklenerek karıştırılmıştır.
7. Elde edilen solüsyon filtrelili tüplerden geçirilmiştir.
8. Filtrelili tüpler 8000 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
9. Altta biriken sıvı kısım atılmış, filtrelili kısım yeni toplama tüpüne alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer I eklenmiştir.
10. Tüpler 9230 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
11. Filtrelili tüplere 500 µl Wash Buffer II eklenerek ile aynı işlem tekrarlanmıştır.
12. Tüpler 11500 rpm’de 3 dk santrifüjlenmiştir.
13. Genomik DNA’nın toplanabilmesi için 100 µl Elution Buffer eklenerek aynı işlem 1,5 ml’lik steril toplama tüpü kullanılarak yapılmıştır.
14. Tüpler 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından 9500 rpm’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
15. Steril toplama tüpü içerisinde biriken sıvı -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. PCR Analizi

İzolasyon sonrası elde edilen DNA’lardan fitoplazma teşhisi P1/P7-F01/R01 primer çiftleri kullanılarak iki aşamalı Nested-PCR ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1) (Tedeschi ve Alma, 2004).

Vektör böcekler için kullanılan PCR döngüleri 3.2.1.4.2’de anlatıldığı gibi Lee ve ark. (1998)’nin yaptığı çalışma doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. Jel Elektroforez

Vektör böceklerin bünyesindeki fitoplazmayı saptamak için yapılan PCR işleminin ardından ürünler 3.2.2.4.3.’de anlatıldığı gibi görsel hale getirilmiştir (Çizelge 3.1)

3.2.4. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Çalışmaları

3.2.4.1. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofitik Funguslar ile İnokulasyonu

Çalışma kapsamında elde edilen tüm izolatların etkinliği araştırılacağından daha düşük etkiye sahip fungal izolatların gözden kaçırılmaması için yapılacak tüm aşamalar fidanlardan daha hassas olan model bitki Cezayir Menekşesinde de uygulanmıştır. İnokulasyonlar 1-1.5 yaşında elma fidanları ve 90 günlük Cezayir Menekşelerine uygulanmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm bitkiler inokulasyonlardan önce fitoplazma ve endofit funguslar yönünden testlenmiş ve çalışmada sağlıklı bitkiler kullanılmıştır.

Tür teşhisi yapılan endofitik fungusların *Ca. P. mali*'ye karşı etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla elma fidanlarına ve Cezayir Menekşesine öncelikle endofitik funguslar inokule edilmiştir.

İnokulum hazırlamak için her bir izolattan birer disk alınarak içinde 100 ml steril PDB (Patates Dekstroz Broth) bulunan 300 ml'lik erlenlere atılarak ve 25°C'de 120 rpm'de bir çalkalayıcıda 5 gün gelişmeye bırakılmıştır. 5 gün sonra her bir erlendeki kültür 4 kat tülbentten geçirilerek miselyal kitle uzaklaştırılmıştır. Tülbentten geçen sıvı, tüplere koyularak 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, üst sıvı uzaklaştırılmış, dibe çöken tortu ise steril saf su ile sulandırılmış ve spor yoğunluğu, thoma lamı kullanılarak 10^6 spor/ml'ye ayarlanmıştır.

Toprağa sulama yoluyla verilen inokulum, tohumdan geliştirilen Cezayir Menekşesi bitkilerine her saksıya 30 ml, elma fidanlarına ise her saksıya 100 ml olacak şekilde uygulanmıştır (E+: Endofit fungus uygulanmış). Ayrıca endofit fungus uygulanmayıp sadece steril saf su verilmiş bitkiler de kontrol olarak kullanılmıştır (E-: Endofit fungus uygulanmamış). Her bir fungus izolatu için 20'şer bitki kullanılmıştır.

İnokulasyon yapılan bitkiler 25°C gündüz sıcaklık, %40-80 nem koşullarındaki serada gelişmeye bırakılmıştır. Fitoplazma ile aşılama çalışmalarında inokulum kaynağı olarak kullanılan bitkilerden tekerrürlü sonuçlar alınamadığından fitoplazma inokulasyonu aşamasına geçilememiş; fungal endofit inokulasyonu ve etkinliği çalışmalarına *Ca. P. mali* ile enfekteli ağaçlar üzerinde devam edilmiştir.

3.2.4.2 Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Analiz Sonuçları

Yapılan Real-time PCR analizleri sonucunda endofit fungus uygulama öncesi ve sonrası elde edilen döngü eşik değerlerinin (Cq) ortalamaları alınmıştır. Alınan ortalamalar kullanılarak uygulama öncesi ve sonrası değerler ile kontrol değerlerinin % değişim değerleri belirlenmiştir. Ayrıca % değişim değerleri kullanılarak uygulama yapılan izolatların % etki değerleri Sun-sheperd formülü ile hesaplanmıştır (Karman, 1971).

Veri analizlerinin hesaplanmasında SPSS (Version 23) paket programı kullanılarak elde edilen ortalama verilere ANOVA tek etken varyans analizi uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki olası farklılıklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Karman, 1971).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE DEĞERLENDİRME

4.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması İle İlgili Arazi Çalışması Bulguları

4.1.1.1. Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Bulguları

Fitoplazma ile enfekteli bitki materyali temini için arazi çalışmaları 2013-2018 yılları arasında yürütülmüştür. Arazi çıkışlarına Eylül 2013’de başlanmıştır. Yapılan çalışmada İçel ve Adana illeri başta olmak üzere Hatay, Konya, Niğde ve Isparta illerinden örnekler çalışılmıştır. Toplam 50 farklı bahçe gezilerek 360 adet bitki örneği toplanmıştır. (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Fitoplazma ile enfekteli bitki materyalinin toplandığı il-ilçeler, bahçe ve toplanan örnek sayıları

Örnek alınan yer	Örnek alınan bahçe sayısı	Toplam örnek sayısı
İçel -Gülнар	5	14
İçel-Gözne	8	24
İçel-Mut	4	22
İçel-Uzuncaburç	5	20
		18
		20
İçel-Arslanköy	5	24
		16
İçel	27	158
Adana-Havutlu	4	16
Adana-Pozantı	7	48
Adana-Sarıçam	1	12
Adana	12	76
Niğde-Çamardı	4	24
Niğde-Ulukışla	2	20
Niğde	6	44
		18
Isparta-Eğirdir	2	14
Isparta	2	32
Hatay-İskenderun	2	20
Hatay	2	20
		6
Karaman-Merkez	1	24
Karaman	1	30
Toplam	50	360

Çalışma kapsamında İçel ilinde Gülnar, Gözne, Mut, Uzuncaburç ve Arslanköy'e gidilmiş toplam 27 farklı bahçe gezilmiş ve 158 örnek toplanmış; Adana ilinde Havutlu, Pozantı, ve Çukurova Üniversitesi'ne gidilmiş toplam 12 farklı bahçeden 76 örnek alınmış; Niğde ilinde Çamardı ve Ulukışla'ya gidilerek 6 farklı bahçeden 44 örnek toplanmış; Hatay ilinde 2 farklı bahçeden toplam 20 örnek alınmış; Karaman ilinden 30 örnek ve Isparta ilinde 2 farklı bahçeden 32 örnek alınmış; toplam 360 adet örnek toplanmıştır.

Örneklerin toplandığı farklı elma bahçelerinde yapılan simptomatolojik gözlemler sonucunda ağaçların genel görünümünde dallarda çıplaklaşmaların olduğu, sürgün uçlarına doğru bu belirtilerin yoğunlaşabildiği ilk göze çarpan belirtiler olmuştur (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.1. İçel-Gülnar'da fitoplazma ile enfekteli bulunan elma ağacı dallarında gözlenen deformasyonlar



Şekil 4.2. İçel-Gözne’de fitoplazma ile enfekteli bulunan elma ağacı dallarında görölen çıplaklaşma belirtisi



Şekil 4.3. İçel-Arslanköy’de fitoplazma ile enfekteli elma ağacında gözlenen, sürgün uçlarına doğru artan çıplaklaşma belirtileri

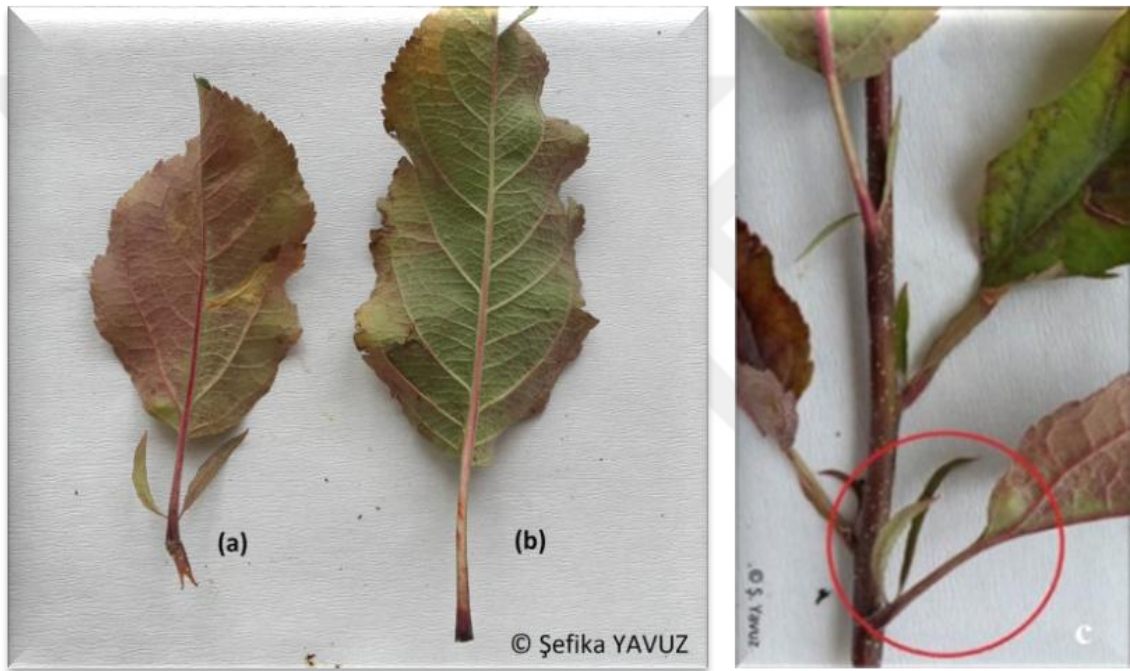
Muthaiyan (2009)'a göre EÇSF ile enfekteli ağaçlarda yaprakların erken dönemde oluşmaya başladığı, ilerleyen süreçlerde yapraklarda kloroz ve kızarmaların görüldüğü, yaprak uçlarında testere benzeri dişli yapıların oluştuğu, düzensiz ve küçük olan yaprakların erken dönemde dökülmesi ile sürgünlerde çıplaklaşmaların görüldüğü belirtilmiştir. Bunun yanı sıra bazı ağaçlarda çok erken dönemlerde meyve dökümleri gözlemlendiği bildirilmiştir.

Sürgünlerde oluşan boğum aralarındaki kısaltmalar sonucu sağlıklı ağaçlara oranla sürgünlerin daha kısa olduğu göze çarpmıştır (Şekil 4.4). Boğum araları kısalan sürgünlerde aşırı yan dallanmaların meydana geldiği görülmüştür. Bovey'in 1963 yılında yapmış olduğu çalışmasında elmalarda 'proliferation' diye adlandırılan hastalığın karakteristik belirtisinin genç sürgünlerdeki gözlerin erken sürmesi sonucu oluştuğunu ve fidanlarda cadı süpürgesine benzeyen bodurlaşma, çalılışma, yaprakların küçülmesi ve sürgünlerde boğum aralarının kısaltması ile tabir edildiğini bildirmiştir.



Şekil 4.4. Elma ağaçlarında gözlenen semptomlar: enfekteli sürgünlerde gözlenen cadı süpürgesi oluşumu ve stipüllerde büyüme semptomu (solda), sağlıklı sürgün (a) enfekteli sürgün (b) (sağda).

Bazı ağaçlardan alınan örnekler üzerindeki yaprakların yan kulakçıklarının normalden büyük olduğu ve yaprak büyüklüklerinin de sağlıklı yapraklara oranla daha az olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Elma bahçelerinde Zagrai ve Zagrai (2013) yaptıkları çalışmada hastalıklı ağaçların yapraklarında yan kulakçıklarda büyümeler olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde Davies ve ark. (1986) 2 yıl boyunca yürüttükleri çalışmalar esnasında enfekteli ağaçların sürgünlerinde meydana gelen 'proliferation' oluşumuna neden olan küçük yaprakların stipullerinde büyümeler olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.5. Elma ağaçlarından alınan sürgün ve yaprak örneklerinde gözlenen belirtiler; enfekteli sürgünlerin yaprak stipullerinde görülen anormal büyümeler, (a) enfekteli yaprak, (b) sağlıklı yaprak (solda), enfekteli yapraklarda stipul görüntüsü (sağda)

Fitoplazma pozitif bulunan ağaçları daha sonraki dönemlerde yeniden testlemek amacıyla yapılan arazi çıkışları esnasında şiddetli enfeksiyona sahip bazı ağaçların kurduğu hatta ağaçların sökümlerinin yapılmış olduğu gözlenmiştir. Benzer çalışmalar doğrultusunda karşılaşılan belirtilere bakıldığında fitoplazma ile enfekteli ağaçlarda genel anlamda geriye doğru ölümlerin görüldüğü ve hastalığın ağaçların tamamen kurmasına neden olduğu belirtilmiştir (Musetti, 2008).

Hastalığın genel simptomlarına bakıldığında EPPO (2017)'da belirtildiği üzere *Ca. P. mali*'nin en tipik simptomunun cadı süpürgesi oluşumu olduğu, bunun yanında yapraklarda ve meyvelerde küçülmeler görüldüğü ve yapraklardaki yan kulakçıkların normalden büyük olduğu saptanmıştır.

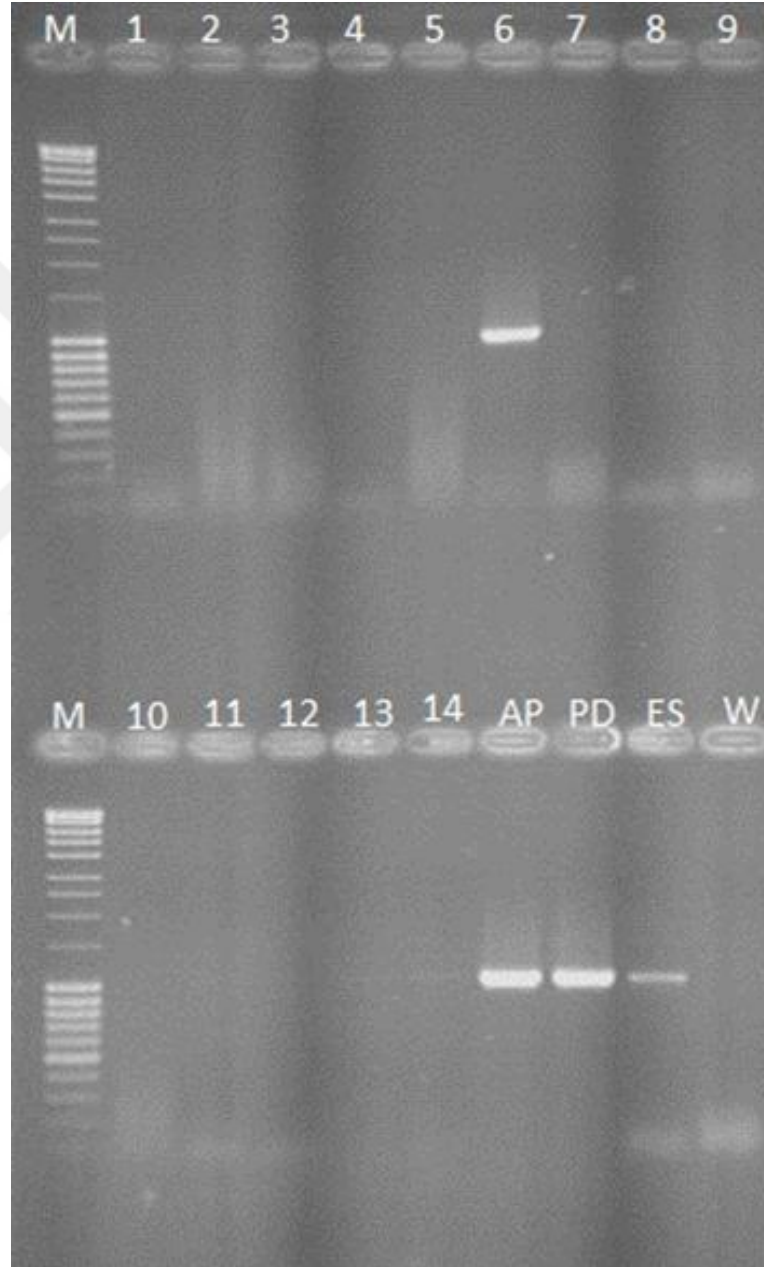
EÇSF ile enfekteli olarak saptanan elma ağaçlarından aşı kalemleri alınarak aşılama çalışmaları başlatılmıştır. EÇSF pozitif olan bazı örneklerin kuruduğu bazı bahçelerin ise sökülmüş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. (a) Fitoplazma ile enfekteli elma ağacında gözlenen sürgünlerde çıplaklaşma simptomu (Kasım 2013), (b) Bir yıl sonra üretici tarafından sökülmüş yapılan aynı ağaç (Kasım 2014)

Fitoplazma ile enfekteli bitki materyali temini için 2013-2017 yılları arasında yapılan arazi çalışmalarında toplanan 360 adet bitki örneğinin DNA izolasyonları ve Nested-PCR analizleri tamamlanmıştır.

Yapılan Nested-PCR analizlerine göre İçel Gülnar'dan Eylül 2013'te toplanan 14 elma örneğinden sadece 1 tanesi fitoplazma pozitif bulunmuştur (Şekil 4.7)



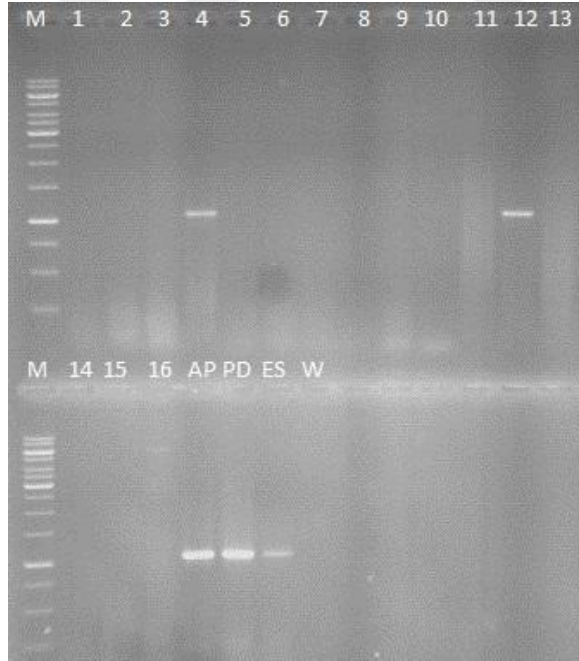
Şekil 4.7. İçel Gülnar'dan toplanan 14 elma ağacından elde edilen bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-14:Gülnar elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması; Pozitif kontroller, W: Su kontrol

İçel-Mut'a yapılan arazi çıkışlarında gezilen 4 bahçeden toplanan 22 örnek fitoplazma testlemelerinde negatif çıkmıştır (Şekil 4.8).



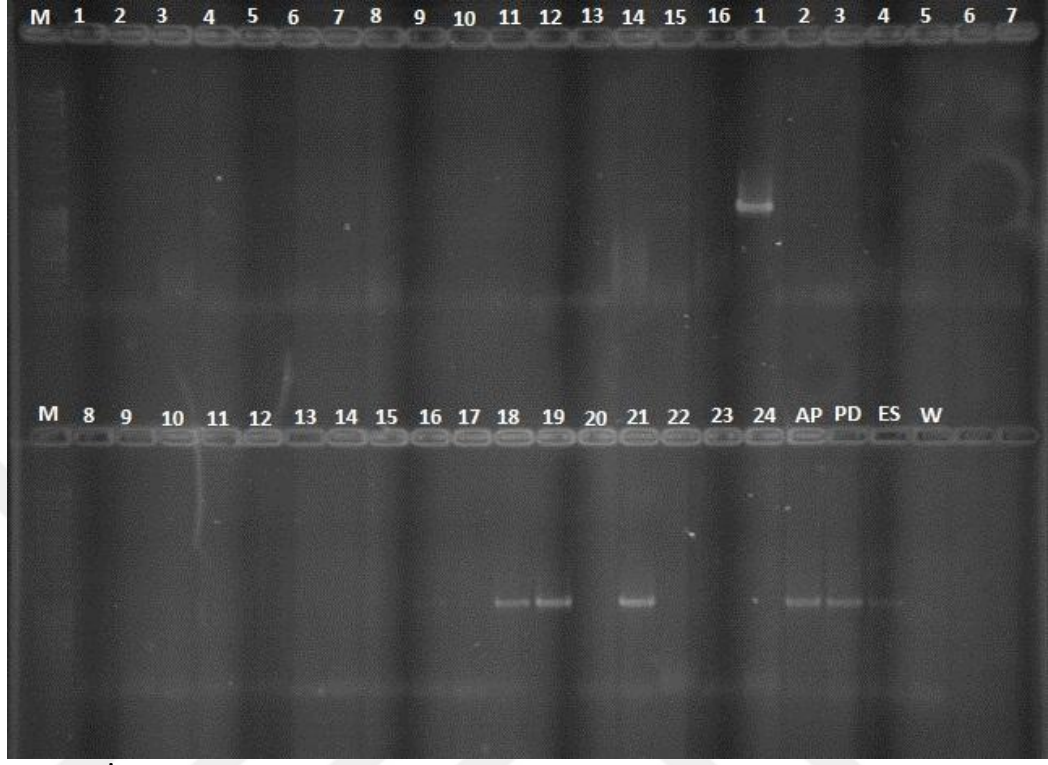
Şekil 4.8. İçel-Mut'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Mut'dan toplanan elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol

İçel-Uzuncaburç'dan 5 farklı alandan toplanan 38 elma ağacının Nested-PCR ile testlenmesi sonucunda 2 örneğin fitoplazma ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. İçel-Uzuncaburç'dan alınan elma örneklerinin DNA'sının F01/R01 primerleri ile Nested-PCR ile analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-16: Uzuncaburç'tan alınan elma örnekleri AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol

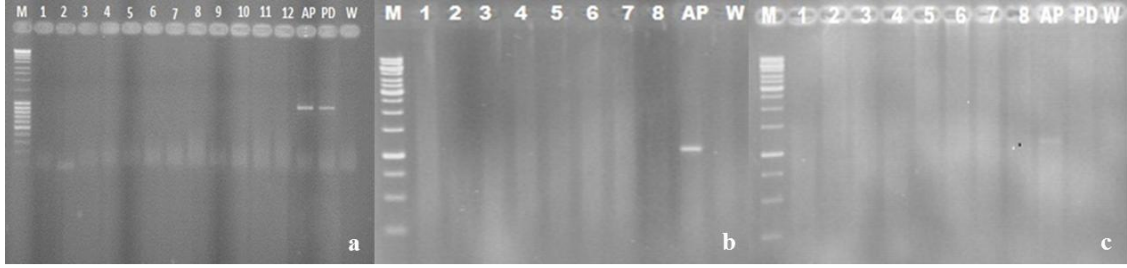
İçel Gözne'den toplanan 24 örneğin Nested-PCR ile testlenmesi sonucu 4 örnek fitoplazma pozitif bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. İçel Gözne ve Adana Havutlu'dan alınan elma örneklerinden elde edilen bitki DNA'larının F01/R01 primer çifti ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), üst jel; 1-16: Adana Havutlu örnekleri, üst jelde sondaki 1-7 ve alt jel 8-24: İçel Gözne örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol

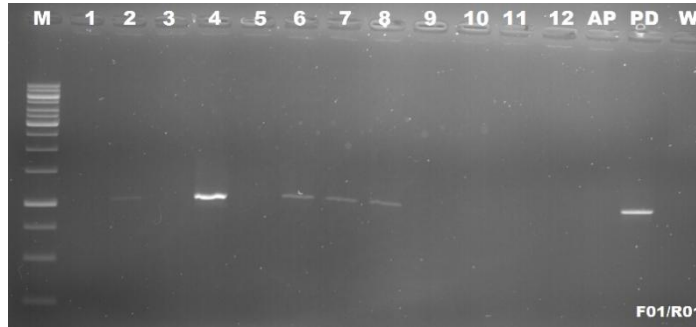
Adana-Havutlu'dan toplanan 16 elma örneğinin Nested-PCR analizleri sonucunda fitoplazma ile enfekteli olmadıkları belirlenmiştir. (Şekil 4.11)

Adana Pozantı'dan 48, Çamardı'ndan 24 ve Çukurova Üniversitesi arazilerinden 12 olmak üzere toplanan 84 elma örneğinden yapılan Nested-PCR analizleri sonucunda bu örneklerin fitoplazma ile enfekteli olmadıkları belirlenmiştir. (Şekil 4.11).



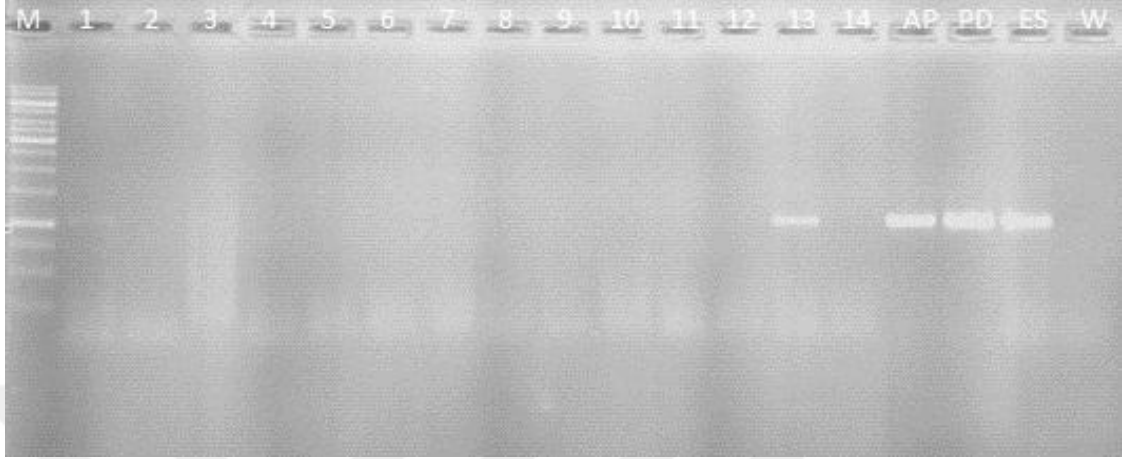
Şekil 4.11. (a) Pozanti'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Pozanti'dan toplanan elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol (b) Çamardı'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker, 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, W: Su kontrol (c) Çukurova Üniversitesi elma bahçelerinden toplanan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker, 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Niğde, Ulukışla'da fitoplazmaların daha yoğun bulunduğu sonbahar aylarında 2 farklı alandan 20 adet örnek toplanmış, yapılan Nested-PCR analizlerinde 5 adet örneğin fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).



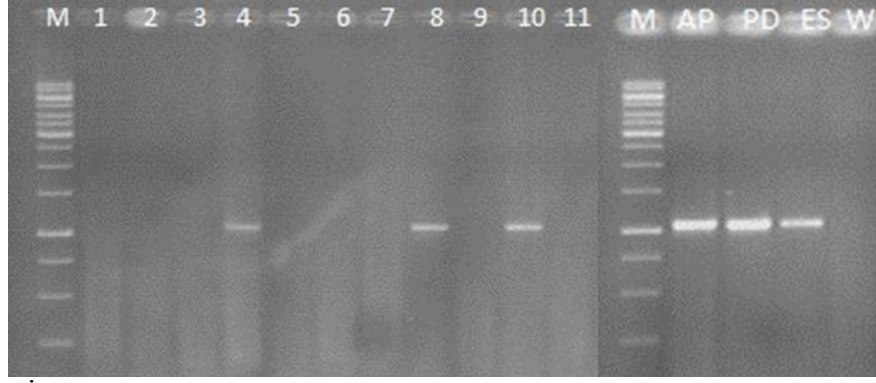
Şekil 4.12. Niğde Ulukışla'dan alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: Ulukışla'ya ait elma örnekleri; AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması Pozitif kontrol, W: Su kontrol

Isparta ilinde elma yetiştirilen 2 farklı alandan alınarak Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilen 32 adet elma örneğinden 6 tanesi fitoplazma pozitif bulunmuştur (Şekil 4.13).

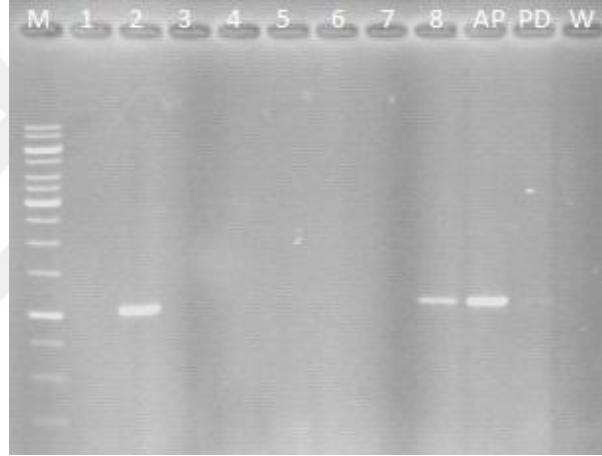


Şekil 4.13. Isparta'dan toplanan elma örneklerinin DNA'larının F01\R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-14: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Fitoplazma ile enfekteli bahçelerin gerek sökülmesi, gerek ağaçların imha edilmesi ya da kuruması nedeni ile mevcut kaynakların kaybedilmesi sonucu özellikle enfekteli örneklerin daha sık rastlandığı İçel iline arazi çıkışlarına devam edilmiştir. Bunun yanı sıra Karaman'dan Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen farklı örnekler de çalışmaya dahil edilmiş ve gerekli testlemeler yapılmıştır. Arslanköy'e yapılan arazi çıkışlarında elma yetiştiriciliği yapılan 5 farklı alana gidilmiş ve toplam 60 adet örnek alınmıştır. Alınan örneklerde yapılan Nested-PCR analizleri sonucunda 7 adet örnek fitoplazma pozitif bulunmuştur. (Şekil 4.14) Karaman'a ait örnekler ile yapılan çalışmada ise 30 örnekten 4 tanesi fitoplazma ile enfekteli olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



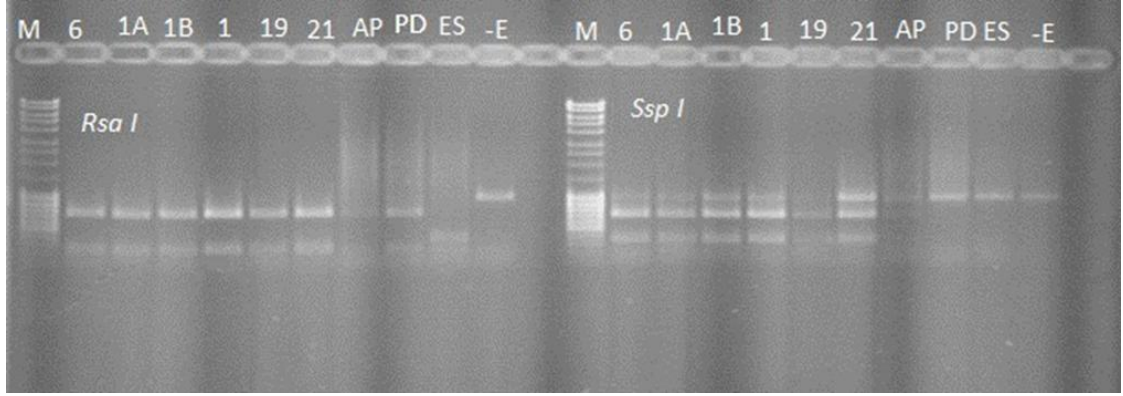
Şekil 4.14. İçel-Arslanköy'den alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-11: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol



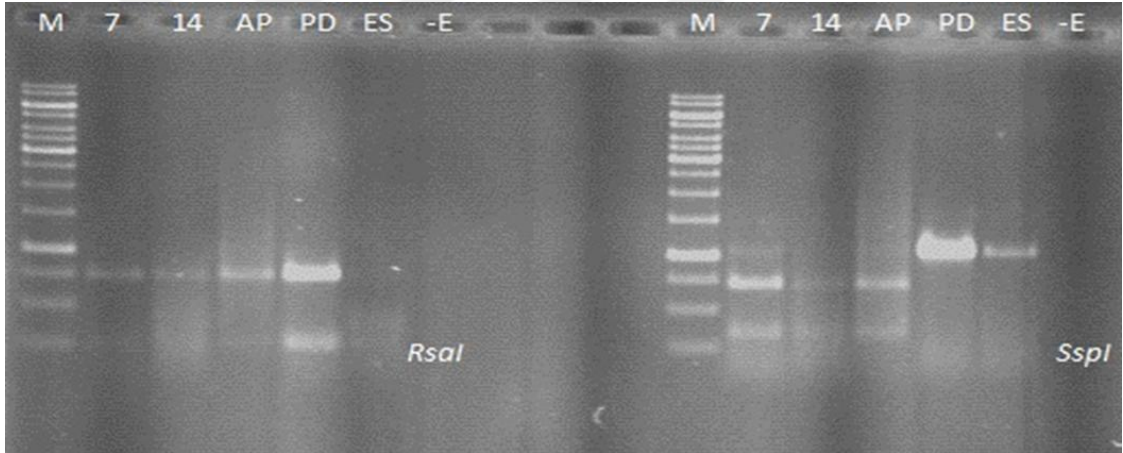
Şekil 4.15. Karaman'dan alınan bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-8: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması Pozitif kontrol, W: Su kontrol

4.1.1.2. RFLP Analizi Bulguları

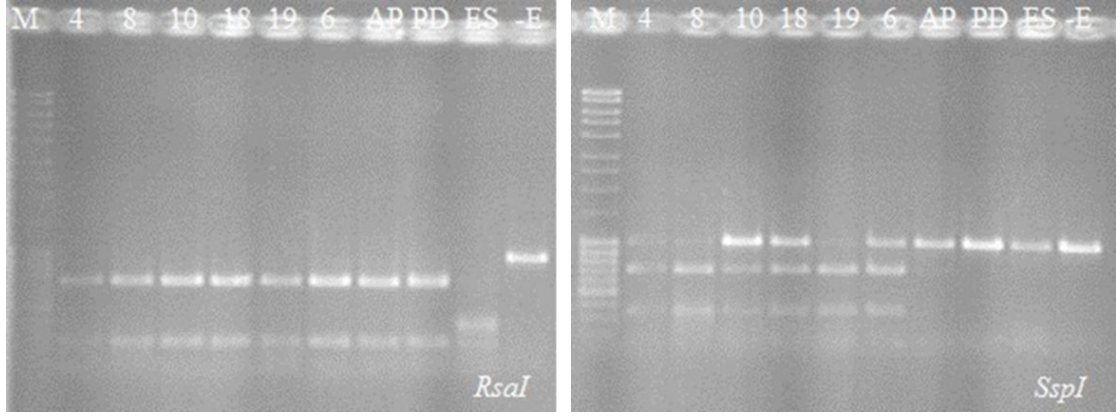
Nested-PCR analizleri ile testlenen elma örnekleri arasında fitoplazma pozitif bulunan örneklerin RFLP analizleri için örnekler yeniden Nested-PCR ile çoğaltılarak *RsaI* ve *SspI* kesim enzimleri ile kesime tabi tutulmuştur. Enzim kesimi sonucunda fitoplazma pozitif bulunan örneklerin AP pozitif kontrolü ile aynı bant profiline sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18).



Şekil 4.16. İçel-Gülnar'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR rnlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 6, 1A, 1B, 1, 19, 21: testlenen elma rnekleri, AP: Elma oklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert ekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontrolller, W: Su kontrol



Şekil 4.17. İçel-Uzuncabuş'dan alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR rnlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 7 ve 14: testlenen elma rnekleri, AP: Elma oklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert ekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontrolller, W: Su kontrol



Şekil 4.18. İçel-Gözne'den alınan elma örneklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PCR ürünlerinin *SspI* (Thermo Scientific FD0774) ve *RsaI* (Thermo Scientific FD1124) enzimleri ile kesilmesinden sonra agaroz jelde oluşan bant profilleri. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 4, 8, 10, 18, 19, 6: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Yapılan çalışmalarda fitoplazmaların PCR ile çoğaltılan 16S rDNA'ların RFLP analizleri ile sınıflandırılabilirdiği; bu yöntemle yapılan sınıflandırmaların kolay olduğu ve sonuca hızlıca ulaşılabilirdiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 1998). *Ca. P. mali* üzerine yapılan bazı çalışmalarda analiz sonuçlarına bakıldığında RFLP analizlerinde *RsaI* ve *SspI* enzimleri kullanılarak yapılan kesimlerde bu çalışmada elde edilen bant profillerine paralel sonuçlar elde edildiği ve söz konusu iki enzim kullanılarak EÇSF hastalık etmeninin *Ca. P. mali* olarak belirlenebildiği bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2016).

4.1.1.3. Sekans Analizi Bulguları

Ca. P. mali için yapılan DNA dizi analizleri çalışmalarında fitoplazma ile enfekteli elma izolatları alındıkları ilçelere göre kodlanarak kullanılmıştır (GL: Gülnar, G: Gözne, UZ: Uzuncaburç, I: Isparta, A: Arslanköy, K: Karaman, U: Ulukışla). Kullanılan bu izolatlar NCBI veri bankasında kayıtlı olan dünya izolatları ile karşılaştırılarak soy ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.19).

Filogenetik analiz sonucu oluşan gruplara bakıldığında 1. grup içerisindeki izolatların U6, A1; 2. grup içerisindeki izolatın K9, 3. grup içerisindeki izolatların A8, I13; 4. grup içerisindeki izolatların G21, U4, K24; 5. grup içerisindeki izolatların ise GL6, A10, A3, U8, U7, A4, G19, I3, K8, K2, A12, I14, G1, G18, A6 ve U2 olduğu belirlenmiştir. Kendi içerisinde 5 alt gruba ayrılan 5. ana grup izolatlarının A12, I14, G1, G18, A6, U2 1. alt grup; K2, 2. alt grup; G19, I3, K8, 3. alt grup; U8, U7, A4, 4. alt grup; GL6, A10, A3, 5. alt grubu oluşturacak şekilde sıralandığı görülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. DNA dizi analizi çalışmalarında fitoplazma ile enfekteli elma izolatlarının alındıkları ilçelere göre yapılan kodlamaları, GL: Gülnar, G: Gözne, UZ: Uzuncaburç, I: Isparta, A: Arslanköy, K: Karaman, U: Ulukışla

Gruplar		İzolatlar
1. ana grup		U6, A1
2. ana grup		K9
3. ana grup		A8, I13
4. ana grup		G21, U4, K24
5. ana grup	1. alt grup	A12, I14, G1, G18, A6, U2
	2. alt grup	K2
	3. alt grup	G19, I3, K8
	4. alt grup	U8, U7, A4
	5. alt grup	GL6, A10, A3

Birinci ana grupta bulunan U6 ve A1 izolatlarının en az değişim göstererek evrime göre ortak ataya en yakın izolatlar olduğu belirlenirken en çok değişime uğrayarak ortak ataya en uzak gruba giren izolatların ise 5. ana grubun 1. alt grubunda bulunan G1, G18, A6, U2 izolatları olduğu gözlemlenmiştir. En ileri seviyede değişim göstermiş olan bu 4 izolatın Kanada'da 2018 yılında çalışılan izolat ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Birinci ana grupta bulunan U6 ve A1 izolatları 2016 yılında Çek Cumhuriyeti, 2009 yılında ise Belçika'da çalışılan izolatla aynı grupta yer almıştır. 2. ana grupta bulunan K9 izolatının 2007 yılında İtalya'da, 2001 yılında Çek Cumhuriyeti'nde ve 2003 yılında ise Polonya'da çalışılan izolatla aynı grupta yer aldığı görülmüştür. I13, A8 izolatları 2006 yılında İtalya'da ve 2004 yılında Hırvatistan'da çalışılan izolatla aynı gruba girerek 3. ana grubu oluşturmuştur. 2011 yılında Tunus'da çalışılmış olan izolat ile G21, U4, K24 izolatları 4. ana grubu oluşturan izolatlar olmuştur. Kendi içerisinde 5 alt gruba ayrılan 5. ana grubu U2, A6, G18, G1, I14, A12, K2, K8, I3, G19, A4, U7, U8, A3, A10 ve GL6 izolatları olmuştur.

En çok değişim göstererek ortak ataya en uzak olan U2, A6, G18, G2, I14, A12 izolatları ile 2015 yılında ek Cumhuriyeti'nde çalışılan bir izolat 1. alt grubu oluşturmuştur. 2017 yılında İtalya'da çalışılan izolat K2 ile 2. alt grubu, 2004 yılında ek Cumhuriyeti'nde çalışılan izolat K8, I3 ve G19 izolatları ile 3. alt grubu, 2017 yılında Amerika'da çalışılan izolat A4, U7, U8 ile 4. alt grubu ve son olarak 2006 yılında Slovenya'da çalışılan izolat da A3, A10, GL6 izolatları ile 5. alt grubu oluşturmuştur.

Yapılan alışmalar doğrultusunda 2013-2018 yılları arasında toplanan örneklerden alınan sonuçlara bakıldığında şüpheli örneklerin daha çok olduğu gözlemlenen İçel ilinden alınan toplam 158 adet örneğin 14 tanesi fitoplazma pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda İçel ilinde fitoplazma enfeksiyon oranının %8.86 olduğu saptanmıştır. Sırası ile ilçelere bakıldığında en fazla enfeksiyon oranının %16.67 ile Gözne'de olduğu belirlenirken, bu oranın Araslanky'de %11,67, Gülnar'da %7,14, Uzuncaburç'da %5,26 olduğu saptanmış, Mut ilçesinde ise herhangi bir hastalık tespit edilemediği belirlenmiştir. Benzer şekilde Adana ilinde toplam 76 adet elma ağacı testlenmiş ve testlenen tüm örnekler fitoplazma açısından negatif bulunmuştur. Niğde'de ise 44 ağacın testlenmesi sonucunda enfeksiyon oranı %11,36 bulunurken, Hatay ilinde 20 ağaç testlemiş ve fitoplazma etmenine rastlanmamıştır. Isparta (Eğirdir) ve Karaman'dan şüpheli olduğu düşünülen ağaçlardan alınıp Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilen sırasıyla 32 örnekten 6 tanesi; 30 örnekten 4 tanesi pozitif bulunmuş, enfeksiyon oranları ise %18,75 ve %13,33 olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında 50 farklı bahçeden toplanan 360 adet elma ağacının Nested-PCR/RFLP yöntemleri ile testlenmesi sonucunda 29 tanesinin *Ca. P. mali* ile enfekteli olduğu ve enfeksiyon oranının %8,05 olduğu ortaya konmuştur (izelge 4.3).

Çizelge 4.3. 2013-2018 yılları arasında Nested-PCR/RFLP yöntemi ile testlenen elma örneklerinin alındığı il, ilçeler ve *Candidatus* Phytoplasma mali'nin enfeksiyon oranı

İl	İlçeler	Bahçe sayısı	Fitoplazma pozitif bulunan ağaç sayısı	Testlenen ağaç sayısı	Enfeksiyon oranı (%)
İçel	Gülнар	5	1	14	7,14
	Gözne	8	4	24	16,67
	Mut	4	0	22	0
	Uzuncaburç	5	2	38	5,26
	Arslanköy	5	7	60	11,67
	Toplam	27	14	158	8,86
Adana	Havutlu	4	0	16	0
	Pozantı	7	0	48	0
	Sarıçam	1	0	12	0
	Toplam	12	0	76	0
Niğde	Çamardı	4	0	24	0
	Ulukışla	2	5	20	25
	Toplam	6	5	44	11,36
Isparta	Eğirdir	2	6	32	18,75
Hatay	İskenderun	2	0	20	0
Karaman	Merkez	1	4	30	13,33
TOPLAM		50	29	360	8,05

Çalışma kapsamında yapılan periyodik olmayan çıkışlar sonucunda 2013-2018 yılları arasında fitoplazma varlığının tespiti için gidilen bahçelerde fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenen ağaçlarda hastalığın yıl içerisindeki dağılımını gözlemleyebilmek için çıkışlar Bahar (Mart-Ağustos) ve Güz (Eylül-Şubat) olmak üzere 2 farklı dönem olarak belirlenmiş, örnekler alınmış ve çalışmalar yapılmıştır.

En fazla bulaşıklığın tespit edildiği İçel ilinde Gülнар, Gözne, Uzuncaburç ve Arslanköy ile Niğde, Ulukışla'dan toplanan örneklerde güz dönemlerinde gidilen bahçelerde hastalık tespit edilirken, fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenen ağaçlarda ilkbahar dönemlerinde yeniden yapılan testlemelerde sonuçların negatif çıktığı görülmüştür. Adana ve Hatay illerinde farklı bahçelerde her 2 dönem içerisinde de yapılan çalışmalarda sonuçların negatif çıktığı saptanmış, bu illerde herhangi bir enfeksiyona rastlanılmadığı belirlenmiştir. Isparta'dan temin edilen örnekler benzer şekilde testlenmiş ve her 2 dönemde de fitoplazma ile enfekteli bulunmuştur. Ancak Karaman'dan temin edilen örneklerde 2016 bahar döneminde fitoplazma varlığına rastlanılmasına rağmen 2016 güz ve 2017 bahar dönemlerinde aynı örneklerde yapılan çalışmalarda sonuçların negatif çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.4).

Seemüller ve ark., (1984) yaptıkları çalışmada da fitoplazma popülasyonlarının meyve ağaçlarının gövde ve kök kısımlarında kış boyunca ağaçlarda dejenerasyonlara neden olduğunu, en yüksek fitoplazma yoğunluğunun yaz sonu ve sonbahar başlarında oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yıl boyunca köklerde daha yoğun bulunan fitoplazmaların Nisan ve Mayıs aylarında kökten gövdeye doğru hareket ettiğini saptamışlardır.

Fitoplazma varlığının tespiti için belirlenen dönemler içerisinde testleme çalışmaları yapılmış ve yıl içerisinde farklı dönemlerde fitoplazma etmeni varlığının değişkenlik gösterdiği ortaya konmuştur. Fitoplazma varlığının yıl içerisindeki durumunun belirlenmesi amacıyla sıcaklıkların farklı olduğu ilkbahar ve sonbahar dönemini içeren 6 aylık periyotlar içerisinde toplanan ve testlenen örneklerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda fitoplazmaların Eylül-Şubat ayları arasında kapsayan zaman diliminde saptanabildiği belirlenmiştir. Ancak Mart-Ağustos aylarını kapsayan dönem içerisinde toplanan örneklerden bir çoğunda hastalık tespit edilememiştir. Bu gözlemler doğrultusunda fitoplazma varlığının güz döneminde saptanabildiği, sıcaklıkların artmaya başladığı bahar döneminde ise varlığının tespit edilemediği sonucuna ulaşılmıştır. Benzer şekilde yumuşak çekirdeklielerde yapılan bir çalışmada Garcia-Chapa ve ark. (2003) fitoplazma ile bulaşıklık oranının Aralık ayında en yüksek oranlara ulaştığını ve bulaşıklığın kış dönemi boyunca devam ettiğini bildirmişlerdir. İlkbahar döneminde ise ağaçlarda yeni filizler sürdüğünde ve bitki özü oluştuğunda, fitoplazma ile bulaşıklığın azaldığını saptamışlardır.

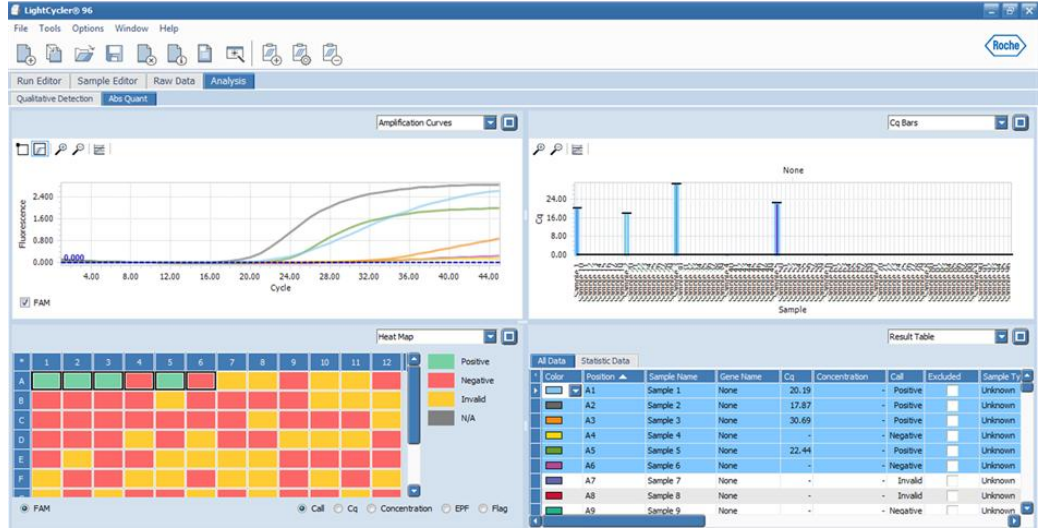
Çizelge 4.4. EÇSF hastalığının elma ağaçlarında dönemsel dağılımının belirlenmesi amacıyla yapılan Nested-PCR ve RFLP çalışmaları sonucu*

İller	İlçeler	2013		2014		2015		2016		2017		2018	
		Güz	Bahar	Güz	Bahar	Güz	Bahar	Güz	Bahar	Güz	Bahar	Güz	Bahar
İçel	Gülnar	+	-	+	-								
	Gözne	+	-	+	-	+	-	+					
	Mut	-	-										
	Uzuncaburç			+	-	+	-	-	-				
	Arslanköy					+	-	-	-	-			
Adana	Havutlu	-	-										
	Pozantı	-	-										
	Sarıçam					-	-						
Niğde	Çamardı			-	-								
	Ulukışla											-	+
Isparta	Eğirdir			+	+			-					
Hatay	İskenderun										-	-	
Karaman	Merkez							+	-	-			

*Tablo içerisinde güz ve bahar dönemlerinde fitoplazma varlığı (+) ve (-) sembolleri kullanılarak belirtilmiş, (-) sonuçların alındığı bahçelerde arazi çıkışı yapılmayan sonraki dönemler koyu renk ile ifade edilmiştir.

4.1.1.4. Real-time PCR Analizi Bulguları

Niğde Ulukışla'dan alınan örnekler Nested-PCR analizlerinin yanı sıra real-time universal fitoplazma analizi ile testlenmiş ve elde edilen sonuçlar Nested-PCR analizleriyle benzerlik göstermiştir. Nested-PCR analizlerinde *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan örneklerin qPCR analizleri sonucunda elde edilen döngü eşik değerleri (Cq)'ne ve oluşan eğrilere bakıldığında sonuçların örtüştüğü görülmüştür. *Ca. P. mali* ile enfekteli örneklerden elde edilen Cq değerleri baz alınarak hedef patojen yoğunlukları belirlenmiştir. Yapılan qPCR analizleri sonucunda hedef patojenin ilk miktarı ile bağlantılı olan döngü eşik değerleri kullanılarak analizler yorumlanmıştır.



Şekil 4.20. Ulukışla'dan alınan bitki DNA'larının real-time universal fitoplazma protokolü kullanılarak elde edilen görüntüsü

4.1.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Aşı İle Taşınma Etkinliği Bulguları

2013-2018 yılları arasında yapılan survey çalışmalarında toplanan elma örneklerinden yapılan Nested-PCR ve RLFP analizlerinde EÇSF pozitif bulunan ağaçlardan alınan aşı kalemleri ile cv. Golden Delicious elma fidanları ve fitoplazmaların biyolojik indeksleme denemelerinde test bitkisi olan Cezayir Menekşeleri göz ve kabuk aşısı ile aşılanmış ve EÇSF'nin aşı ile taşınma etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 4.20). Aşı kalemi temini için çıkılan arazilerde EÇSF pozitif ağaçların bazılarının söküldüğü gözlenmiş ve çalışmalar yeni ağaçlar bulunmak üzere tekrarlanmıştır.

Brzin ve ark., (2003) 33 farklı çeşit ile gerçekleştirdikleri çalışmada yaptıkları ELISA ve PCR analizleri sonucunda cv. Golden Delicious çeşidinin çok hassas olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.21. *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan elmalardan alınan aşı gözleri ile Cezayir Menekşelerinin aşılması

Aşılama çalışmalarında testlenerek *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan sürgünler kullanılmıştır. Aldaghi ve ark (2007a) fitoplazmaların tespitinde 4 farklı aşı tekniğiyle biyolojik indeksleme çalışmaları gerçekleştirmiş, elma ağaçlarında en uygun tekniğin çentik ve kabuk aşısı olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle pozitif olduğu bilinen sürgünlerden hem kabuk hem de durgun göz aşısı yapılmıştır. Aşılama pozitif bulunan dönemlerde gerçekleştirilmekle birlikte en yoğun aşılama sonbahar döneminde yapılmıştır.



Şekil 4.22. *Ca. P. mali* ile enfekteli bulunan aşı kalemleri ile elma fidanlarının aşılınması



Şekil 4.23. EÇSF temeni ile aşılınan elma fidanlarının genel görünümü

Aşı ile taşınma denemelerinde İçel ilinde tespit edilen pozitif ağaçlardan 6 tanesi aşılama çalışmalarında kullanılabilmiştir. Gülnar'dan 1, Gözne'den 2, Uzuncaburç'dan 1 ve Arslanköy'den 2 olmak üzere toplam 6 örnek ile gerçekleştirilen aşılama her pozitif ağaç için 3 tekerrür olacak şekilde yapılmış toplamda 18 adet elma fidanı ve 18 adet Cezayir Menekşesi test bitkisi olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde Isparta ve Karaman illerinden alınan ikişer ağaç için 6 adet elma fidanı ve 6 adet cezayir menekşesi test bitkisi aşılanmıştır. Her aşamada 2 adet bitki kontrol olarak bırakılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Aşı ile taşınma denemelerinde kullanılan, inokulum verilen/verilmeyen elma fidanı ve Cezayir Menekşesi sayıları (adet)

İller	Aşı kalemi alınan pozitif ağaç sayısı (adet)	Elmadan Cezayir menekşesine aşılama		Elmadan elmaya aşılama		Fitoplazma pozitif bulunan/Tutan aşı sayısı	
		İnokulum verilen	İnokulum verilmeyen	İnokulum verilen	İnokulum verilmeyen	Cezayir Menekşesi	Elma fidanı
İçel	6	18	2	18	2	0/4	2/10
Isparta	2	6	2	6	2	0/2	0/4
Karaman	2	6	2	6	2	0/2	1/4
Toplam	10	30	6	30	6	0/8	3/18

Yapılan gözlemler sonucunda alınan örneklerle yapılan aşılama çalışmalarında İçel iline ait 10 adet, Isparta ve Karaman illerine ait 4'er adet elma fidanında aşılamanın tuttuğu görülmüştür (Şekil 4.24). 6 aylık bekleme periyodunun ardından aşılamanın tuttuğu fidanlarda yapılan Nested-PCR analizleri sonucunda İçel örneklerinden 2, Karaman örneklerinden ise sadece 1 adet EÇSF ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Isparta iline ait örnekler ise negatif sonuç vermiştir. Cezayir menekşesi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında inokulum verilen 30 adet test bitkisinin 8 tanesinde aşılamanın tuttuğu saptanırken analizler sonucunda tüm bitkilerin negatif sonuç verdiği belirlenmiştir (Çizelge). Bu durumun Lee ve ark. (2000) yaptığı bir çalışmada belirtildiği üzere bitkilerin sadece floeminde bulunan fitoplazmaların dönemsel olarak hareket ettiği, bitkilerdeki dağılımının düzensiz olduğu ve aşılama esnasında test bitkilerine mekanik yolla inokule edilecek enfekteli bitki parçasına ait özsuyun fitoplazma ile bulaşık olması gerektiği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.24. *Ca. P mali* ile enfekteli ağaçlardan alınan aşı kalemleri ile cv. Golden Delicious elma fidanlarına yapılan göz aşılması sonucu süren elma fidanlarının genel görünümü

EÇSF'nin deneysel olarak aşı ile taşınması denemelerinde etmenin aşıyla taşınma oranının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonucun daha önce yapılan çalışmalarla benzer olduğu görülmüştür. Gültekin (2011) yaptığı çalışmada Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF) ("*Candidatus* Phytoplasma mali")'nın arazi koşullarında enfekteli aşı gözü kullanımı ve kök kaynaşması yoluyla taşınma etkinliğini araştırması sonucunda 100 adet çöğür zerdali anacı üzerinde gerçekleştirilen taşıma çalışmasında EÇSF'nin aşı ile taşınma oranının %12,76 olduğu belirlenmiştir.

Ca. P. mali ile yapılan çalışmalara bakıldığında etmenin ağaç içinde dağılımının mevsimlere bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Kış mevsiminde kök bölgesinde yoğunlaşan patojenin havaların ısınması ile bitkinin üst kısımlarına doğru ilerlediği, bu nedenle aşılama esnasında kullanılan sürgünlerde patojen konsantrasyonunun yeterli düzeyde olmaması sonucu aşı ile taşınmanın zorlaştığı ve düşük seviyelerde kaldığı belirtilmiştir (Caglayan ve ark., 2019).

4.1.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması'nın Vektör Böcekle Taşınma Etkinliği Bulguları

Yapılan aşılama çalışmalarının yanı sıra fitoplazma hastalığının deneysel olarak taşınması amacı ile arazi çıkışları yapılan bazı dönemlerde potansiyel vektör böcek olduğu bilinen psyllid varlığı gözlemlenmiş, potansiyel vektörlerin varlığına rastlanılan İçel ve Hatay illerinde farklı 4 bahçeden örnek toplanmıştır. Böcek toplanan bahçelerden bitki numuneleri alınarak fitoplazma açısından da analize tabi tutulmuştur.

EÇSF ile enfekteli bahçelerde hastalığın potansiyel vektörü olduğu bilinen böcekler toplanmıştır. İçel (Arslanköy ve Gözne)'de EÇSF ile enfekteli bahçelere 2017 yılının Mart ve Mayıs ayları arasında arazi çıkışları yapılarak etmenin potansiyel vektörü olarak bilinen psyllidlerin (*Cacopsylla* spp.) Nisan sonu-Mayıs başında kışlayan erginleri toplanmıştır (Tedeschi ve ark., 2006; Baric ve ark., 2010). Kışlaklardan çıkan ergin psyllidlerin enfekteli ağaçlarda beslenmiş olma olasılığı göz önüne alınarak olası vektörler darbe yöntemiyle toplanmıştır (Kaplan ve Turanlı, 2016'ya atfen Steiner, 1962) (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *Ca. P. mali* ile enfekteli elma bahçelerinden darbe yöntemiyle olası vektör böceklerin toplanması

Önceki dönemlerde fitoplazma ile enfekteli olduğu tespit edilen ağaçların yanı sıra aynı bahçelerdeki farklı ağaçlardan da örnekleme yapılmış, toplam 25 ağaçtan psyllid toplanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Elma bahçelerinden toplanan *Cacopsylla* türleri

Yapılan araştırmalarda İtalya'da EÇSF ile bulaşık elma bahçelerinde önemli psyllid türlerinden *Cacopsylla picta*, *C. melanoneura* ve *C. mali*'nin varlığı bildirilmiştir (Baric ve ark., 2010). Benzer şekilde Tedeschi ve ark. (2006) İtalya'da Mart ayının ortalarında fitoplazma ile bulaşık elma bahçelerinde *C. melanoneura* ve *C. pruni* türlerini saptamışlardır. Türkiye'de Kaya ve ark. (2016)'ın yaptığı bir çalışmada Hatay ili İskenderun ilçesinde EÇSF'nin vektörlerinin rapor edildiği türleri toplamak amacıyla 2 farklı lokasyona gidilerek incelemeler yapılmış fakat 2017 yılı itibari ile herhangi bir psyllid varlığına rastlanmamıştır. Planlanan çalışma vektör böceklerle taşınma çalışması

olmayıp inokulum kaynağı elde etmek ve inokulum potansiyelini arttırmak amaçlı olduğundan, alınan negatif sonuçlar sonrası toplanan olası vektörlerin tür teşhisi aşamasına geçilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. İçel ve Hatay illerinde 2017 yılında gidilen elma bahçelerinden toplanan böcek türleri, gözlenen bahçe ve ağaç sayıları

Böcek Türü	İller	İlçeler	Gözlenen bahçe sayısı (adet)	Örneklenen ağaç sayısı (adet)	Örneklenen dönemde ağaçta EÇSF varlığı	Toplanan böcek sayısı (adet)	Böcekte EÇSF enfekte Oranı (%)
<i>Cacopsylla</i> spp.	İçel	Arslanköy	3	15	-	80-100	0
		Gözne	2	10	-	-	0
	Hatay	İskenderun	2	20	-	-	0

İçel Arslanköy'den daha önceki dönemlerde fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenen bahçelerden alınan örnekler negatif sonuç vermiştir. Benzer şekilde Hatay'ın İskenderun ilçesinde 2 farklı yayladan vektör böcek temini için çıkılan arazilerde 20 adet bitki örneği toplanmış ve fitoplazma açısından testlendiğinde yapılan Nested-PCR analizleri sonucunda örnekler negatif bulunmuştur.

Kışlayan erginlerin fitoplazma ile enfekteli olabilme durumu olduğundan İçel ilinden toplanan psyllidler test bitkilerine ve elma fidanlarına salınmış, böcek aktarılan bitkiler böcek geçirmeyen tel kafesler içerisinde muhafaza edilmiştir (Carraro ve ark., 2001) (Şekil 4.27 ve 4.28).

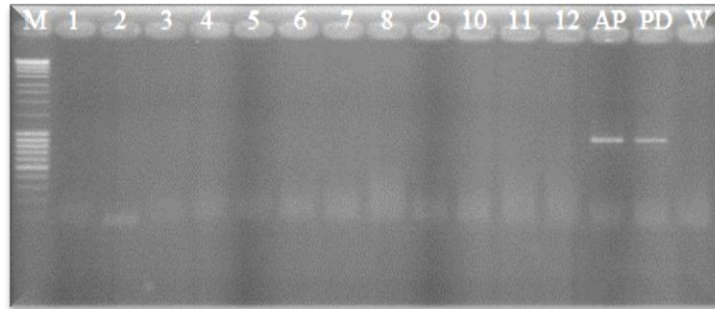


Şekil 4.27. Vektör böcek salımı yapılan Cezayir Menekşesi (*Vinca* sp.) test bitkileri

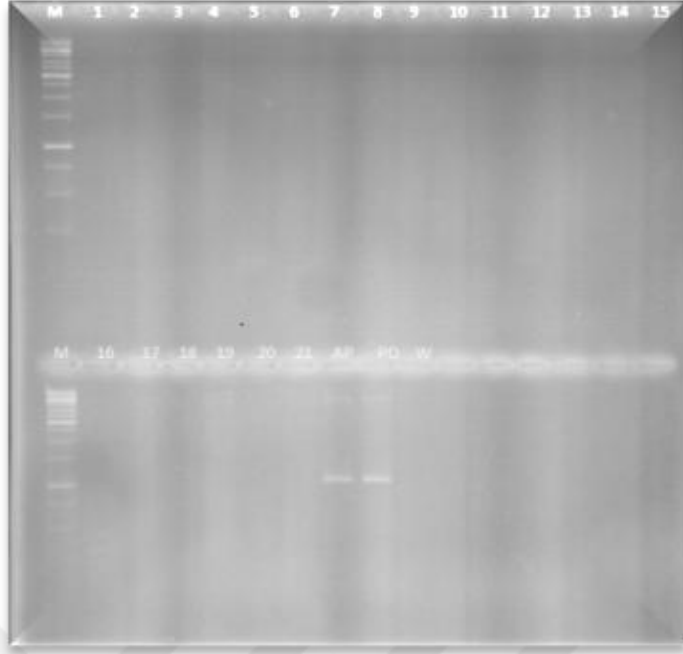


Şekil 4.28. Vektör böcek salımı yapılan cv. Golden Delicious elma fidanlarının genel görüntüsü

Psyllid salımı yapıldıktan 15-20 gün sonra salınan böcekler fırça yardımı ile toplanarak DNA izolasyonları ve PCR analizleri yapılmıştır. Yapılan Nested-PCR analizlerinde gerek salınan böceklerde gerekse taşıma denemesi kurulan bitkilerde fitoplazma saptanamamıştır (Şekil 4.29 ve 4.30).



Şekil 4.29. Taşıma denemesinde kullanılan psyllidlerin DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331), 1-12: testlenen örnekler, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.30. Taşıma denemesi yapılan bitkilerin DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM1331)1-21: testlenen örnekler, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, pozitif kontroller, W: Su kontrol

4.2. Endofit Funguslar İle İlgili Yapılan Çalışmalar

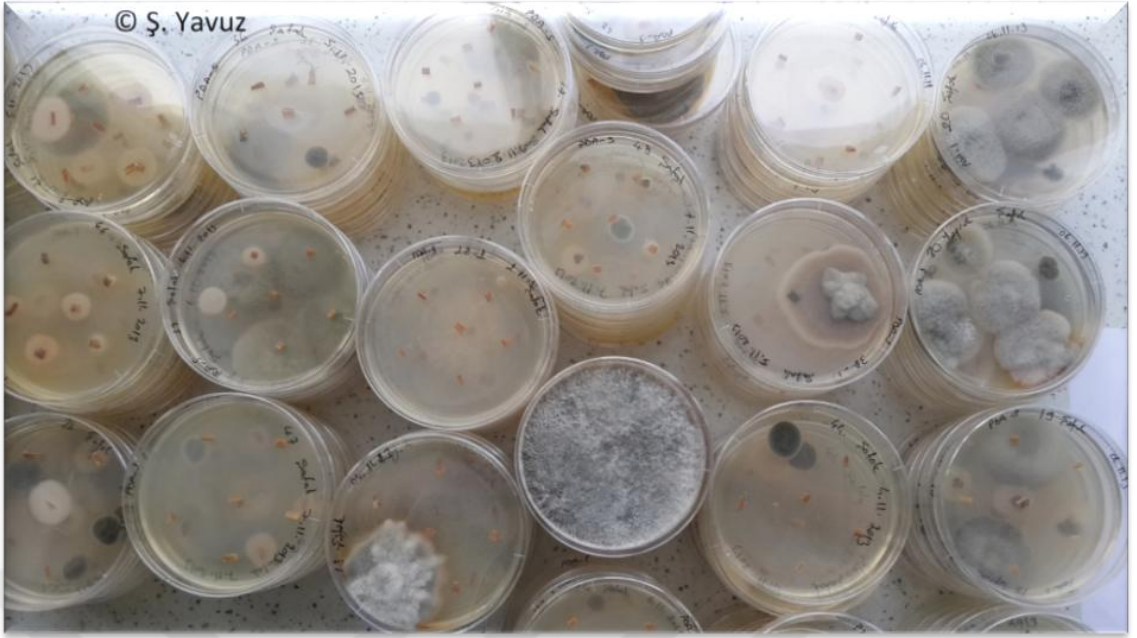
4.2.1. Endofit Fungusların Arazi Çalışması, Örnekleme ve İzolasyon Bulguları

Endofit fungus izolasyonunda çalışmalar fitoplazma ile enfekteli bitki materyali temin etmek için çıkılan arazilerde eş zamanlı olarak yürütülmüştür. EÇSF ile enfekteli bitkilerin yanı sıra hiçbir hastalık belirtisi göstermeyen elma bitkileri de kullanılmıştır. Örnekleme çalışmaları İçel, Adana ve Niğde illerinden toplanan örnekler ile endofit fungus çalışmaları tamamlanmıştır. İçel ilinde Gülnar, Gözne, Mut ve Uzuncaburç'dan 22 farklı alandan 98; Adana ilinde Havutlu, Pozantı ve Sarıçam'dan 12 farklı alandan 76; Niğde ilinde Çamardı'ndan 4 farklı alandan 24 olmak üzere toplam 38 farklı alan gezilerek hem sağlıklı hem de fitoplazma ile enfekteli 198 ağaçtan örnek toplanmıştır. (Çizelge 4.7)

Çizelge 4.7. 2013-2016 yılları arasında endofit fungus izolasyonu için farklı illerde gidilen bahçe sayıları, örnekleme yapılan ağaç sayıları ve örneklenen bitki dokularının sayısı

Lokasyon	Bahçe Sayısı	Örnekleme yapılan ağaç sayısı (adet)	Örnekleme Yapılan Bitki Dokusu
İçel-Gülnar	5	14	
İçel-Gözne	8	24	5 sürgün
İçel-Mut	4	22	5 yaprak
İçel-Uzuncaburç	5	38	
Toplam	22	98	490 sürgün + 490 yaprak
Adana-Havutlu	4	16	
Adana-Pozantı	7	48	5 sürgün
Adana-Sarıçam	1	12	5 yaprak
Toplam	12	76	300 sürgün + 300 yaprak
Niğde-Çamardı	4	24	5 sürgün 5 yaprak
Toplam	4	24	120 sürgün + 120 yaprak
TOPLAM	38	198	910 sürgün + 910 yaprak

Liu ve ark. (2001)'nin önerdikleri yöntemlerle gerçekleştirilen endofit fungus izolasyonu sonucunda elde edilen fungal izolatların cins düzeyinde teşhisleri yapılmıştır (Barac ve ark., 2004). Teşhisi yapılan kolonilerden aday endofit funguslar PDA ortamında alt kültüre alınmış ve 4°C'ye ayarlanmış soğutucularda muhafaza edilmiştir. Morfolojik olarak tür teşhisi yapılan ve patojen olduğu belirlenen funguslar ise çalışmaya dahil edilmeyeceğinden elenmiştir (Şekil 4.31).



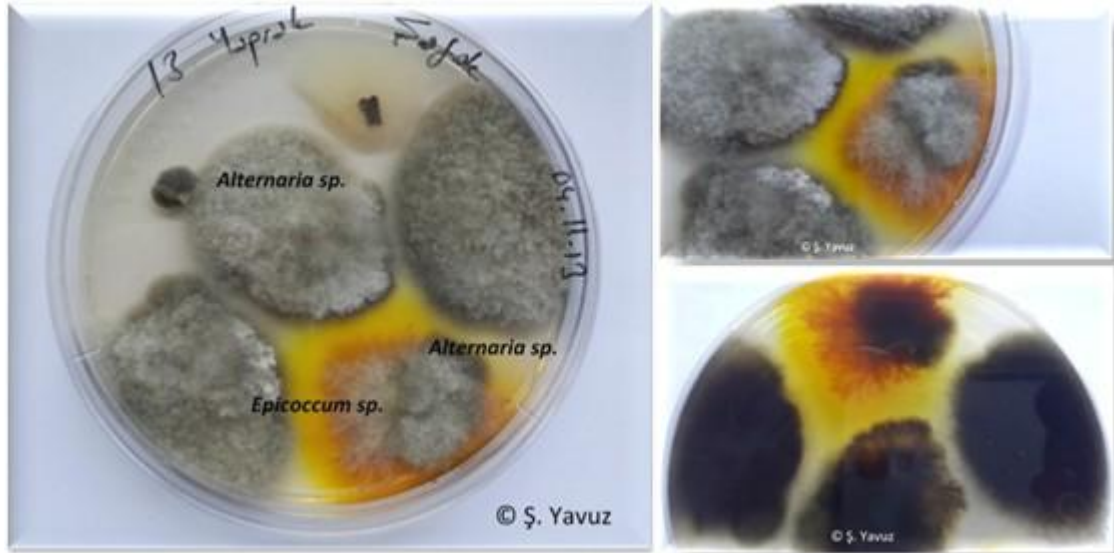
Şekil 4.31. Aday endofit fungusların izolasyon çalışmalarında elde edilen fungus cinslerinin morfolojik görünümü

Koloni morfolojisi için gerekli inkübasyon periyodunun ardından petrilerdeki gelişimler değerlendirilmiş, farklı morfolojik gelişimlere sahip örnekler saflaştırılıp morfolojik düzeyde teşhisleri yapılmak üzere alt kültüre alınmıştır. 1 haftalık inkübasyon periyodunun ardından petrilerdeki gelişimler değerlendirilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda petrilerde genel olarak *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Monilia* sp., *Pappularia* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia* sp., *Trichoderma* sp. ve *Ulocladium* sp. benzeri gelişimlerin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. 2013-2016 yılları arasında yapılan izolasyonlarda saptanan ve morfolojik teşhisleri yapılan fungus cinsleri

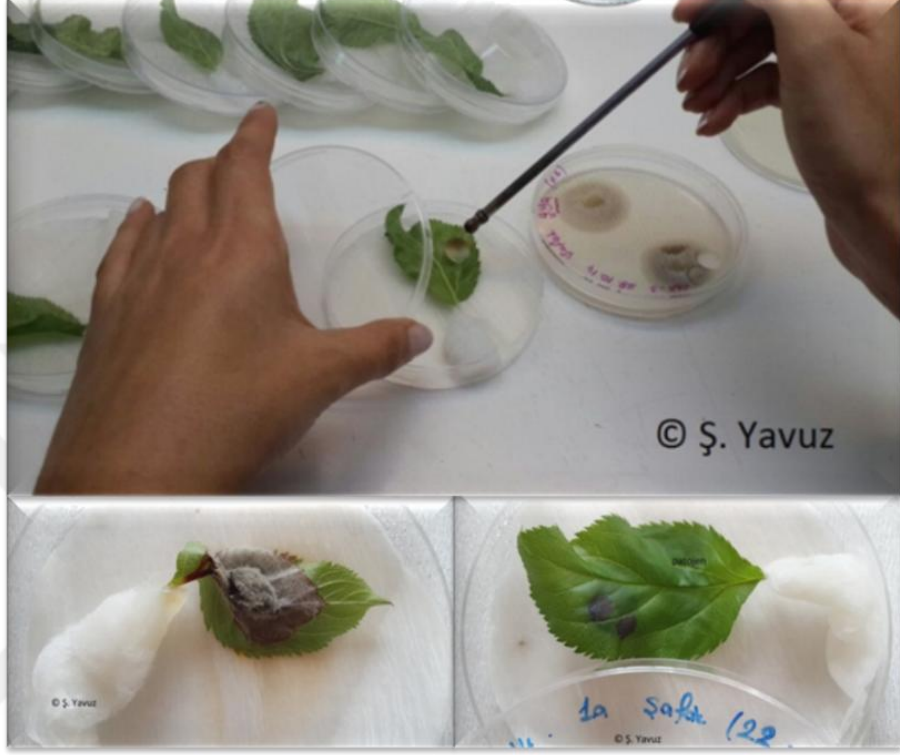
Lokasyon	Örnekleme yapılan ağaç sayısı (adet)	Fungus Türleri
İçel	98	<i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Botrytis</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Epicoccum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.
Adana	60	<i>Monilia</i> sp. <i>Pappularia</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Phytophthora</i> sp. <i>Pythium</i> sp.
Niğde	24	<i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Sclerotinia</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Ulocladium</i> sp.

Endofit olma olasılığı olan aday endofit izolatları patojenite testi için agar ortamına alınarak 4°C’de saklanmıştır (Şekil 4.32).



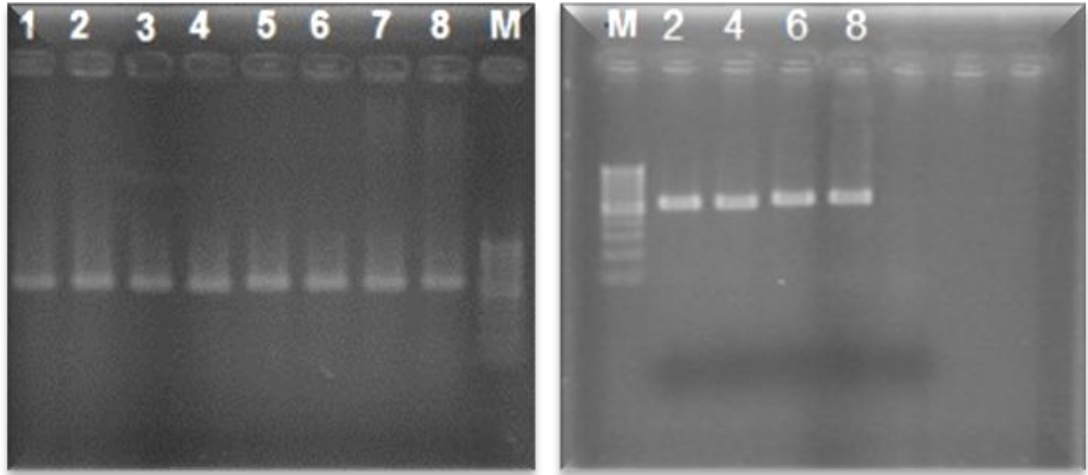
Şekil 4.32. Morfolojik olarak endofit olduğu düşünülen izolatlar

PDA'da gelişen farklı fungus izolatlarıyla elma fidanlarından alınan yapraklar kullanılarak yapılan patojenite çalışmaları sonucunda yapraklar üzerinde oluşan simptomlara bakılarak patojen özelliği olan funguslar elenmiştir (Şekil 4.33).



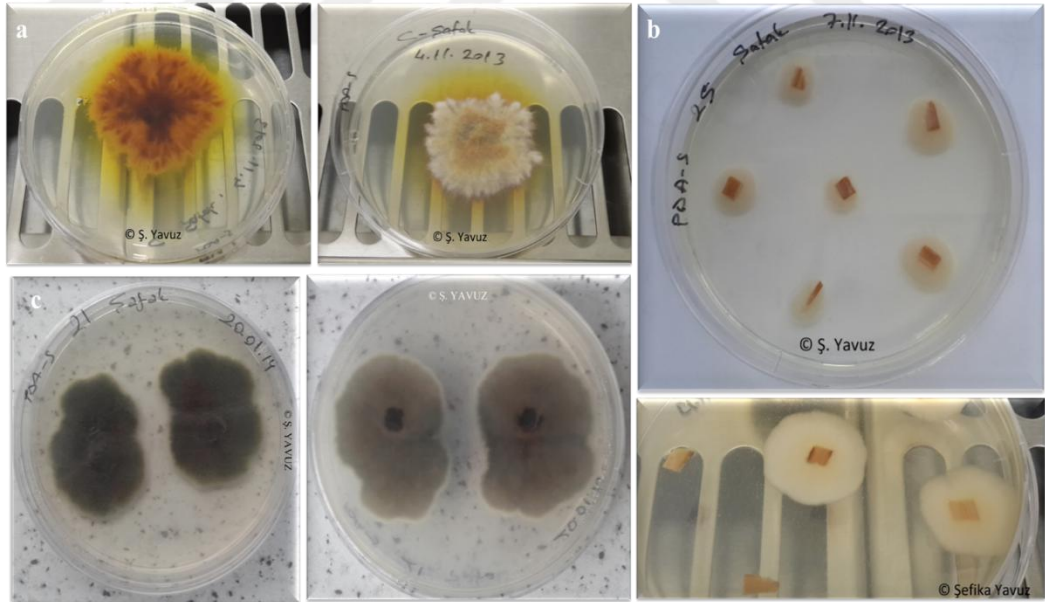
Şekil 4.33. Morfolojik olarak tespit edilemeyen aday endofit örneklerin patojenite çalışmaları

Endofit olduğu düşünülerek çalışmaya devam edilen fungus izolatları için moleküler çalışmalara geçilmiş yapılan DNA izolasyonları ve PCR analizleri sonucunda beklenen seviyede ;(500-600 bp) bant elde edilen örnekler sekans analizi yapan firmaya gönderilmiş böylece 4 farklı izolatın tür teşhisleri tamamlanmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. ITS 1/4 primer çifti ile çoğaltılmış DNA örneklerinin jel görüntüsü. M: Moleküler marker (Thermo Scientific SM0242), 1,8: fungus örnekleri

Sekanstan gelen analiz sonuçlarına ait baz dizilerine göre NCBI'da BLAST analizi yapılmış ve 4 adet izolatın tür teşhisi yapılmıştır. Sonuçlarına bakıldığında elma ağaçlarından elde edilen izolatların *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans* ve *Alternaria consortialis* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Morfolojik ve moleküler olarak teşhis edilen endofit fungus türleri (a) *Epicoccum nigrum*, (b) *Aureobasidium pullulans* ve (c) *Ulocladium consortiale*

Alternaria consortialis 1967 yılında yapılan son isimlendirmede *Ulocladium consortiale* olarak değiştirilmiştir. Elma izolatına ait fungal endofitin türü *Ulocladium consortiale* olarak belirlenmiştir (Simmons,1967).

Ayrıca yapılan tüm çalışmalara BMAE 'ye gelen bir ceviz örneğinden elde edilmiş olan ve *Epicoccum* sp. olduğu düşünülen izolat da dahil edilmiştir. Söz konusu izolat aynı şekilde moleküler analizlere tabi tutulmuş ve ardından sekans analizine gönderilmiş gelen dizilerin BLAST sonuçlarına göre *Epicoccum nigrum* olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak yapılacak tüm çalışmalara 3 adet elma ağacından elde edilen ve teşhisi yapılan endofit, 1 adet ceviz ağacından elde edilerek teşhisi yapılan endofit olmak üzere toplam 4 adet endofit fungus izolatu ile devam edilmiştir.

Sekanstan gelen baz dizilerine göre NCBI'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında :

Epicoccum sp. olduğu düşünülen ceviz izolatının %99-100 oranında *Epicoccum nigrum* olduğu;

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum isolate wb599 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	930	930	99%	0.0	99.81%	AF455395.1
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum sp. G7A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	930	930	99%	0.0	99.81%	EF432273.1
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	930	930	99%	0.0	99.81%	EU232716.2
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain MH193	930	930	99%	0.0	99.81%	FM991735.1

Epicoccum sp. olduğu düşünülen elma izolatının %99-100 oranında *Epicoccum nigrum* olduğu;

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum strain UP_EPC_76 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	939	939	98%	0.0	100.00%	KM434176.1
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum strain UP_EPC_69 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	939	939	98%	0.0	100.00%	KM434170.1
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum strain UP_EPC_02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	939	939	98%	0.0	100.00%	KM434169.1
<input checked="" type="checkbox"/> Epicoccum nigrum strain AS-L-7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	937	937	98%	0.0	99.80%	MK656448.1

Aureobasidium sp. olduğu düşünülen elma izolatının %99-100 oranında *Aureobasidium pullulans* olduğu görülmüştür.

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Aureobasidium pullulans strain YY23 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	983	1196	98%	0.0	99.45%	KR912256.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aureobasidium pullulans clone AB4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	981	1147	98%	0.0	99.27%	MK035874.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aureobasidium pullulans strain KDLYC4-9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	1002	1002	99%	0.0	99.64%	HQ909088.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aureobasidium pullulans strain Y11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	994	994	98%	0.0	99.63%	KC897669.1

Elmadan elde edilen diğere bir izolatin ise *Alternaria consortialis* olduğu tespit edilmiştir. *Alternaria consortialis* 1967 yılında yapılan son isimlendirmede *Ulocladium consortiale* olarak değiştirilmiştir. Elma izolatina ait fungal endofitin türü *Ulocladium consortiale* olarak belirlenmiştir.

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Ulocladium consortiale strain UL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int	961	961	99%	0.0	99.81%	KC577270.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone VT015-C05 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	961	961	99%	0.0	99.81%	JX240408.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Alternaria sp. XG-5-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	961	961	99%	0.0	99.81%	KF438014.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Ulocladium sp. 10a2-1-s 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran	961	961	99%	0.0	99.81%	KT192326.1

4.2.2. Elma Fidanları ve Test Bitkilerinin Endofitik Funguslar ile İnokulasyon Bulguları

Elde edilen izolatlarm etkinliği için yapılan inokulasyonlarda kullanılan 1-1.5 yaşında cv. Golden Delicious elma fidanları ve 90 günlük Cezayir Menekşeleri inokulasyonlardan önce hastalıklar ve endofitler yönünden testlenmiş ve negatif olanlar kullanılmıştır.

Fungus inokulasyonu morfolojik olarak teşhisleri yapılip sekans sonuçları ile de endofit olduğu tespit edilen 4 izolat ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan test bitkileri ve elma fidanlarına sulama suyu şeklinde verilmesi planlanan fungal endofitlerin PDB ortamındaki gelişimleri takip edilmiş, thoma lamı kullanılarak spor yoğunluğuna bakıldığında herhangi bir spor gelişimi olmadığı görülmüştür (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. Endofit fungus inokulasyonu için kullanılan spor süspansiyonunun hazırlanışı

Kullanılan sıvı kültürlerde spor gelişimi gözlenmediğinden ikinci yol olarak katı kültürlerden sulandırma yapılarak spor gelişimi olup olmadığına bakılmıştır. Eğik agarlarda muhafaza edilen endofitlerden PDA ortamına yapılan ekimlerin ardından petriyer yaklaşık 3 hafta süreyle inkübatörde tutulmuştur. PDA ortamında fungusların spor oluşumu gözlenmiş, spor yapılarının mikroskop ile görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Elde edilen endofit fungusların spor yapılarına ait mikroskop görüntüsü

İnkübatörlerde gelişen ve spor oluşturan endofitler PDA'lardan kazınarak steril saf su içerisine alınmıştır. Denenen bu yöntem sonrasında saf su içerisinde spor varlığına bakılmış ve spor yoğunluğu Thoma lamı ile 10^6 spor/ml'ye ayarlanmıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Endofit fungus inokulasyonu için petrilerden kazıma ile spor süspansiyonu hazırlanışı

Spor yoğunluğu ayarlanan endofit fungus izolatları *Catharanthus roseus* test bitkilerine her saksıya 30 ml ve elma fidanlarına her saksıya 100 ml olmak üzere sulama suyu şeklinde inokule edilmiştir. (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Endofit fungusların *Catharanthus roseus* test bitkilerine inokulasyonu

İnokulasyon yapılan bitkiler 25°C gündüz sıcaklık, %40-80 nem koşullarındaki sera şartlarında inkübe edilmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. Endofit fungusların cv. Golden Delicious elma fidanlarına inokulasyonu

4.2.3. Re-izolasyon Bulguları

Endofit fungus inokulasyonun inkübasyon periyodunun ardından re-izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonu gerçekleştirilen test bitkileri ve elma fidanlarından fungal izolatlar yeniden izole edilebilmiştir. Ancak aşılı ile taşınma çalışmalarında alınan olumsuz sonuçlar nedeni ile fungus inokulasyonu tamamlanan bitkilerin *Ca. P. mali* ile inokulasyonu aşamasına geçilememiştir.

EÇSF ve fungal endofitlerin etkileşimi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar arazi koşullarında *Ca. P. mali* ile enfekteli ağaçlar üzerinde tamamlanmıştır.

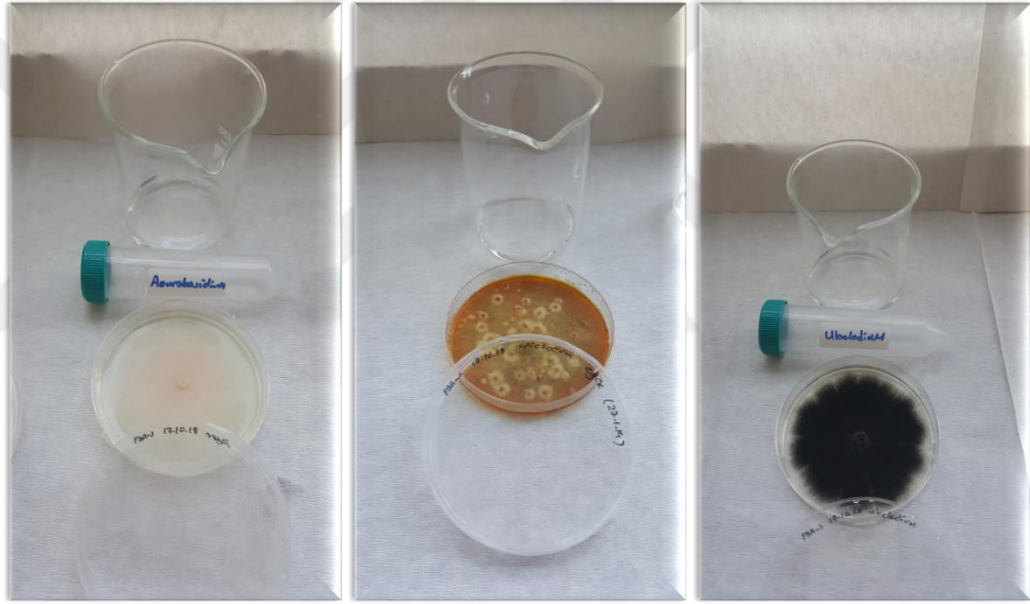
4.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması-Endofit Fungusların Etkileşimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

4.3.1. Fitoplazma ile Enfekteli Ağaçlara Endofit Fungus İnokulasyonu Bulguları

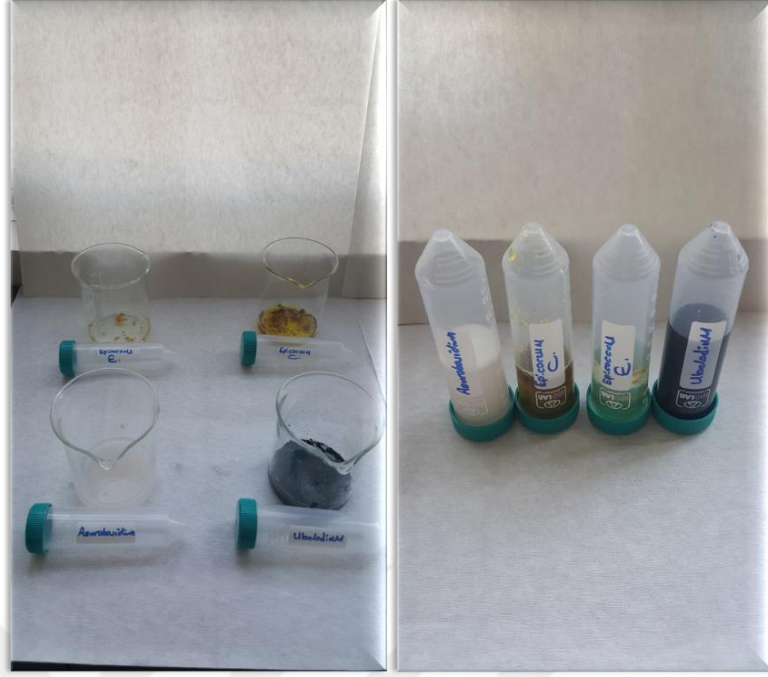
Yapılan çalışmalarda fitoplazma ile enfekteli olarak saptanan ağaçlardan alınan aşılı gözleri ile gerçekleştirilen aşılama çalışmaları sonrasında aşılı tutan ve pozitif sonuç veren 3 bitkide de periyodik olarak pozitif sonuç alınamadığından fungus inokulasyonu aşamasına geçilememiştir. Bu nedenle yeniden arazi çıkışı yapılmıştır. Daha önce aşılama çalışmalarında inokulum kaynağı olarak kullanılan ağaçların bulunduğu bahçelerin sökümü nedeni ile Niğde-Ulukışla'ya gidilmiş ve elma bahçelerinden örnekler alınarak DNA izolasyonları ve Nested-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12). Analizler sonucunda pozitif sonuç veren ağaçların dalları üzerinde ayrı ayrı inceleme yapılmış ve

endofit funguslar ile inokulasyon çalışmaları da enfekteli ağaçlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Pozitif bulunan ağaçlarda dallar tek tek numaralandırılmış ve her ağacın 4 farklı yönünden örnek alınmıştır. Alınan her dal tek bir örnek olarak kabul edilmiş ve izolasyonları yapılmıştır. PCR analizleri sonucunda pozitif sonuç veren dallar üzerine fungus inokulasyonu arazi koşullarında gerçekleştirilmiştir. Önceki dönemlerde izole edilip teşhisi yapılan 3 adet fungus izolatının eğik agarlardan ekimleri yapılmış, gelişimleri takip edilmiş ve 3 haftalık inkubasyon süresinin ardından inokulasyona hazır hale getirilmiştir. Dallar üzerine uygulama yapılmak üzere hem spor süspansiyonları hazırlanmış hem de petrielerde spor gelişimi takip edilmiştir (Şekil 4.41 ve 4.42).



Şekil 4.41. Niğde’de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılacak fungus inokulasyonu için spor süspansiyonu hazırlanma aşamaları



Şekil 4.42. Niğde’de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılacak fungus inokulasyonu için spor süspansiyonu hazırlanma aşamaları

Fitoplazma pozitif sonuç veren dallarda bistürü yardımıyla yaralar açılmış ve spor süspansiyonları dallara fırça yardımı ile bulaştırılmıştır (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Niğde’de fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine yapılan spor süspansiyon uygulaması

Spor süspansiyonu uygulamasının yanı sıra aynı dallarda kabuk dokularında açılan yaralar üzerine petrilerden alınan kesitler yerleştirilerek üzeri nemli pamuk ve parafilm ile kapatılmıştır. Uygulama yapılan dallar tek tek etiketlenmiş, üzeri poşet ile örtülmüş ve poşetlerde delikler açılarak hava alması sağlanmıştır. Pozitif bulunan dallardan bir tanesi kontrol olarak uygulama yapılmadan bırakılmıştır (Şekil 4.44 ve 4.45).

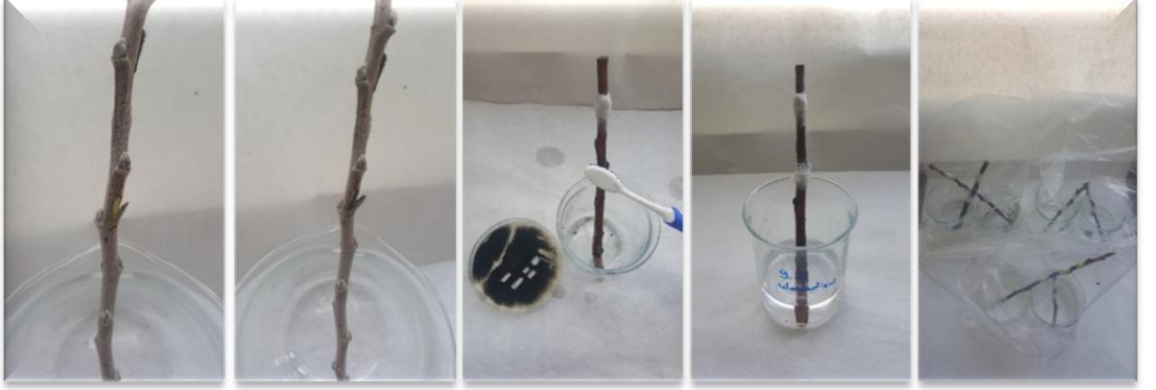


Şekil 4.44. Niğde’de petrilerden alınan kesitlerin fitoplazma pozitif bulunan dallar üzerine uygulanması



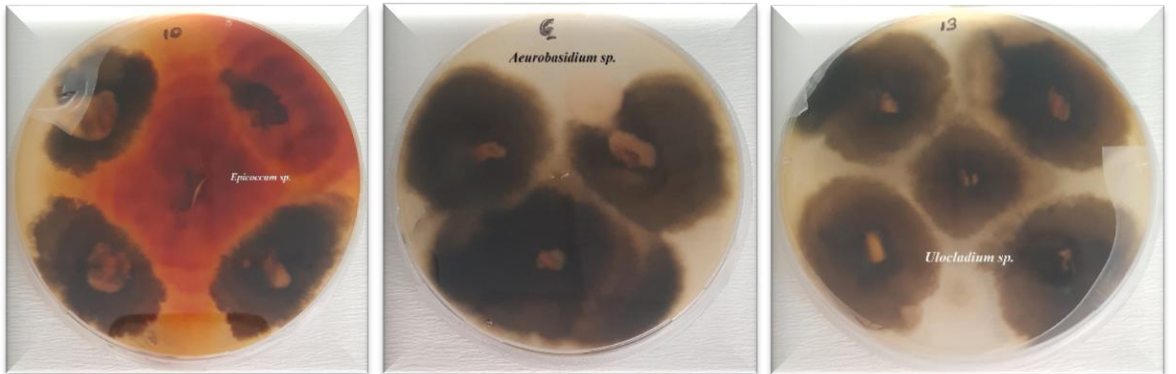
Şekil 4.45. Niğde’de fitoplazma pozitif dallara uygulanan fungus inokulasyonu aşamaları

Bunların yanında araziden alınan ve pozitif bulunan sürgünler üzerine de fungus inokulasyonu yapılmış ve oda sıcaklığında beklemeye alınmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Niğde'den alınan pozitif sürgünler üzerine laboratuvar koşullarında uygulanan fungus inokulasyonu aşamaları

Enfekteli dalların endofit funguslar ile inokulasyonu sonrası 3-4 haftalık inkübasyon süresi beklenmiş ve inokulasyonun gerçekleştirildiği örnekler üzerinde re-izolasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Yapılan re-izolasyonlarda *Aureobasidium* sp., *Epicoccum* sp., *Ulocladium* sp. izolatları izole edilebilmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Niğde'de pozitif sürgünler üzerine inokule edilen fungusların re-izolasyonları

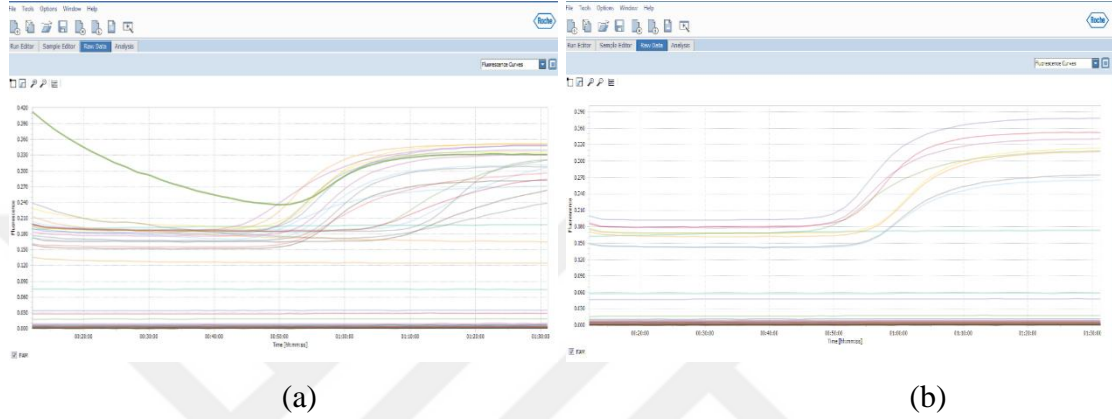
Re-izolasyon çalışmalarının ardından uygulama yapılan dallardan örnekler alınarak DNA izolasyonları ve Nested-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması-Endofit Fungusların Etkileşimi Sonrası Yapılan Real-time PCR Analizi Bulguları

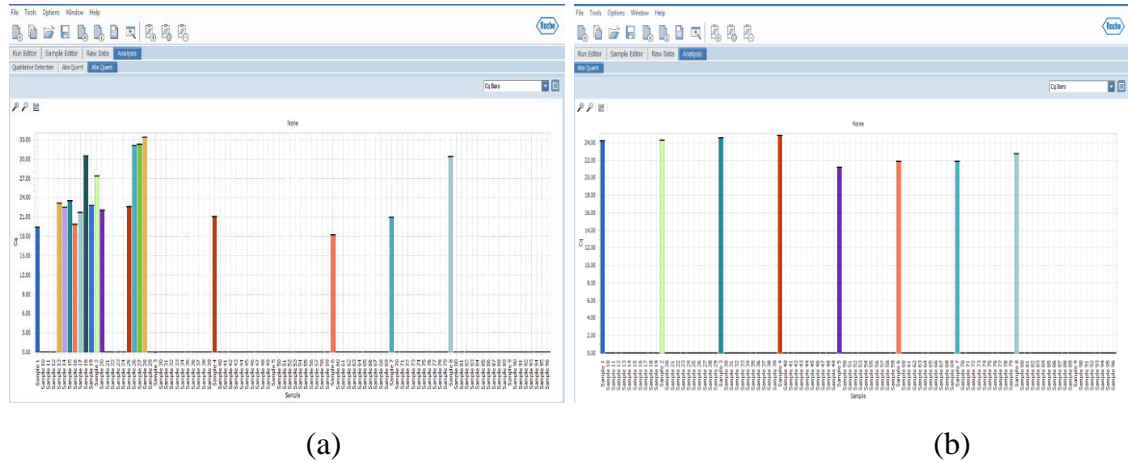
Nested-PCR analizleri ile testlenen elma örnekleri arasında fitoplazma pozitif bulunanlar Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) analizine de tabi tutulmuştur. Yapılan qPCR analizlerinde çalışılan tüm örneklerin son sulandırma konsantrasyonları nanodrop ölçümleri ile birbirine yakın olacak şekilde ayarlanmıştır (210-280ng/2µl). Konsantrasyonları ayarlanmış olan fitoplazma ile enfekteli, endofit fungus uygulanmış ve kontrol olarak bırakılan örneklerin cycle quantification (Cq) değerleri arasında farklılıklar olup olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan qPCR analizleri sonucunda fitoplazma enfekteli örneklerden ve kontrolden elde edilen Cq değerleri ile kullanılan analiz kiti pozitif kontrolünün değerleri alınmıştır. Aynı şekilde endofit fungus inokulasyonu ve re-izolasyon çalışmalarının ardından enfekteli örneklere yeniden qPCR analizleri yapılmış ve oluşan Cq değerleri kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalarda endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrasında elde edilen Cq değerleri arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Endofit inokulasyonundan önce fitoplazma ile enfekteli olduğu bilinen örneklerin Cq değerleri daha düşük çıkmıştır. Fungus inokulasyonu sonrası elde edilen Cq değerlerine bakıldığında ise enfekteli örneklerde replikasyonların bir çoğunun daha geç döngülerde başladığı görülmüştür. Döngü sayılarının başlama noktasındaki bu değişimler analizlerde oluşan replikasyon eğrilerinde de görülmüştür (Şekil 4.47). Cq değerlerinde değişimlere göre endofit fungus inokulasyonu yapılan örneklerin uygulama öncesi ve sonrası değerleri arasında döngü sayısı farklılıkları meydana gelmiştir. Endofit fungus inokulasyonu sonrası Cq değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında kontrol olarak bırakılan örneklerle yapılan analizlere bakıldığında ise fungus inokulasyonu öncesi ve sonrasında eş zamanlı olarak gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonrası yapılan qPCR analizlerindeki Cq değerlerinde yine farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Ancak endofit fungus inokule edilen örneklerin aksine kontrol örneklerindeki Cq değerlerinde artış yerine azalmalar olduğu ve replikasyonların daha erken dönemde başladığı böylece döngü sayılarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.48).

Yapılan analizler sonucunda Cq dögü değerlerindeki değişimler baz alınarak DNA konsantrasyonlarında mevcut patojen yoğunluğunda değişimler meydana geldiği ve endofit fungus inokule edilen örneklerdeki hedef fitoplazma patojen yoğunluğunun azaldığı, bunun yanında hiç uygulama yapılmayan fitoplazma enfekteli örneklerdeki patojen yoğunluğunun arttığı ve bu durumun dögü sayılarını etkilediği kanısına varılmıştır (Şekil 4.50).



Şekil 4.48. a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen eğriler b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen eğriler



Şekil 4.49. a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq parametreleri b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq parametreleri

(a)

(b)

Şekil 4.50. a) Endofit fungus inokulasyonu sonrası fitoplazma enfekteli örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq değerleri b) Kontrol olarak kullanılan örneklerin qPCR analizinde elde edilen Cq değerleri

Tamamlanan qPCR aşamalarının ardından elde edilen Cq döngü sayısı değerlerine istatistiksel analizler uygulanmıştır. Patojen yoğunluğu ile orantılı olarak replikasyonların başlama noktaları arasında meydana gelen değişikliklerin istatistiksel değerlendirmeleri yapılarak uygulamalar arasındaki benzerlik ve farklılıklar ortaya konmuştur.

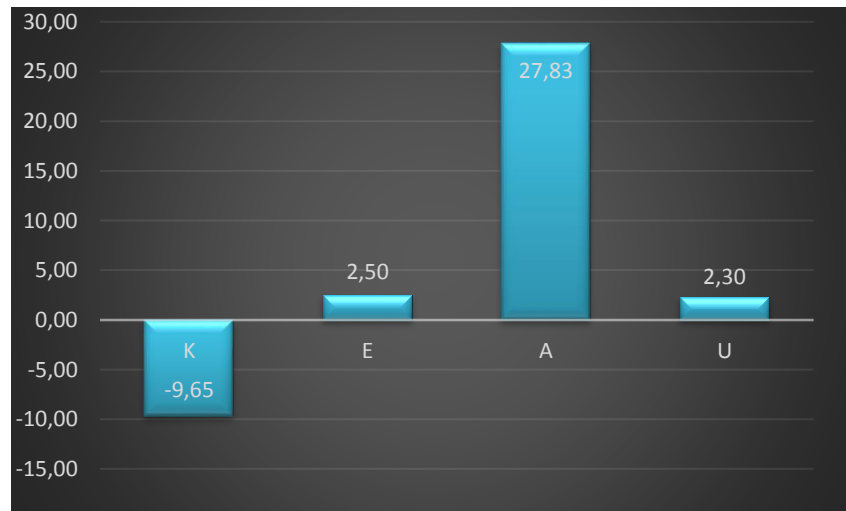
4.3.3. Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması - Endofit Fungus Etkinliği Analiz Bulguları

Yapılan qPCR analizleri sonucunda hedef patojenin ilk miktarı ile bağlantılı olan döngü eşik değerleri (Cq) kullanılarak istatistiksel analizler uygulanmıştır. Endofit fungusların EÇSF enfekteli örneklere inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri arasındaki sayısal farklılıklar analize tabi tutularak uygulama etkilerinin yorumlanması sağlanmıştır. Elde edilen ortalama Cq değerleri üzerinden % değişim, % etki oranları hesaplanmış ve ANOVA tek etken varyans analizi kullanılarak uygulama öncesi ve sonrası oluşan değerler kontrol ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Fitoplazma ile enfekteli örneklerin endofit funguslarla inokulasyonu öncesi ve sonrası ortalama Cq değerleri, % değişimleri ve % etki oranları, K: kontrol, E: *Epicoccum nigrum* izolatı, A: *Aureobasidium pullulans* izolatı, U: *Ulocladium consortiale* izolatı

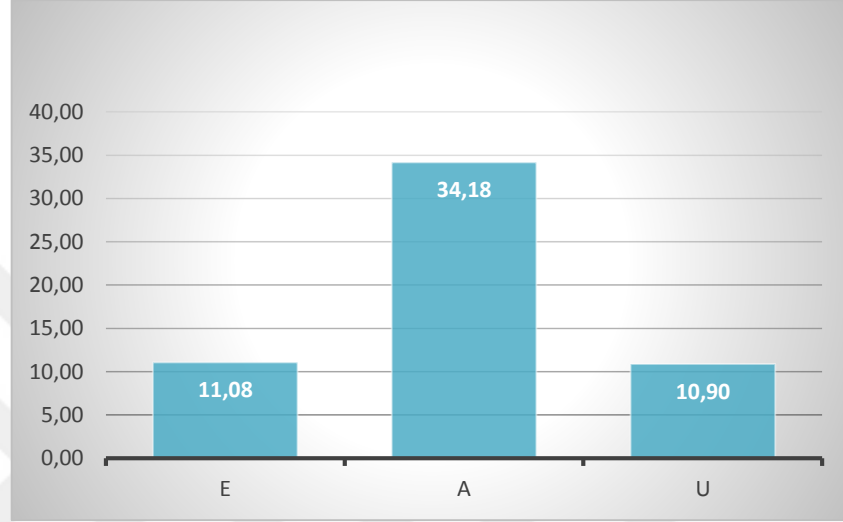
Uygulamalar	Uygulama Öncesi Ortalama Cq Değerleri	Uygulama Sonrası Ortalama Cq Değerleri		% değişim	% etki
K	24,44	21,89	b	-9,65	
E	20,95	21,48	b	2,50	11,08
A	24,10	30,81	a	27,83	34,18
U	23,14	23,68	b	2,30	10,90

Analizler sonucu elde edilen ortalama Cq değerleri kullanılarak % değişim oranları hesaplanmıştır (Karman,1971). Yapılan hesaplamalarda inokulasyonlar sonucunda daha yüksek Cq değerine sahip olan, daha geç dönmeye başlayan eğrilerde eğilim pozitif olarak hesaplanırken daha erken dönmeye başlayan, daha düşük Cq değerlerinde eğilim negatif olarak kabul edilmiştir. Elde edilen oranlara bakıldığında uygulanan endofit fungus izolatlarından A. *pullulans*'ın % değişiminin pozitif eğilim gösterdiği, diğer iki izolata oranla daha yüksek olduğu ve % 27,83'lük değere sahip olduğu görülmüştür. E. *nigrum* ve U. *consortiale* izolatları ile yapılan uygulamalarda ise % değişimlerin pozitif eğilim gösterdiği ve sırasıyla % 2,5 ve 2,30 ile birbirine oldukça yakın ve düşük olduğu görülmüştür. Kontrole bakıldığında ise eğilimin negatif olarak gerçekleştiği ve % 9,65'lik bir değişim oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. : Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri ile elde edilen % değişim oranları, K: kontrol, E: *Epicoccum nigrum* izolatı, A: *Aureobasidium pullulans* izolatı, U: *Ulocladium consortiale* izolatı

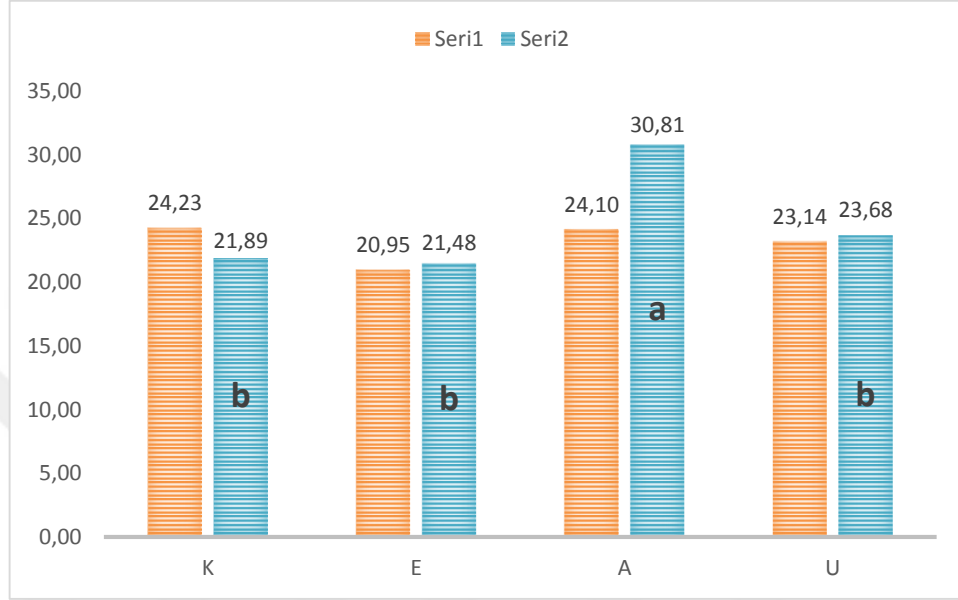
İzolaların % değişim oranları kullanılarak uygulanan Sun-sheperd formülü ile hesaplanan % etki değerlerine bakıldığında ise uygulanan izolatlarda etki oranının *E. nigrum* için % 11,08, *U. consortiale* içinse % 10,90 gibi yakın ve düşük seviyelerde kaldığı görülmüştür. Bunun yanında *A. pullulans* uygulanan örneklerde belirlenen etki oranının ise % 34,18'e ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Elde edilen % değişim oranları kullanılarak uygulanan Sun-sheperd formülü ile hesaplanan % etki değerleri, E:*Epicoccum nigrum* izolatu, A:*Aureobasidium pullulans* izolatu, U:*Ulocladium consortiale* izolatu

Endofit fungus uygulaması öncesi ve sonrası elde edilen ortalama döngü eşik değerlerine bakıldığında hiç fungus inokulasyonu yapılmayarak kontrol olarak bırakılan örneklerdeki ortalama Cq değerlerinin 24,23'den 21,89'a gerilediği görülmüştür. Cq değerlerindeki bu gerilemenin hedef patojenin ilk miktarı ile orantılı olması sonucu patojen yoğunluğunun artmasından dolayı meydana geldiği kanısına varılmıştır. Kontrol olarak elde edilen veriler doğrultusunda yapılan kıyaslamalarda *E. nigrum* ve *U. consortiale* izolatlarında uygulama sonrası döngü sayılarının arttığı görülmüştür. *E. nigrum* için 20,95 olan değerin 21,48'e; *U. consortiale* için 23,14 olan değerin 23,68'e yükseldiği gözlenmiştir. Daha geç dönemde oluşan döngü değişimi ve döngü eşik değerinin artması ile döngü sayılarındaki bu yükselmenin patojen yoğunluğunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

En önemli değişimin *A. pullulans* izolatında olduğu ve uygulama öncesi 24,10 olan ortalama Cq değerinin uygulama sonrası 30,81'e yükseldiği belirlenmiştir. Bu yükselişin kontrol olarak kullanılan örnekteki değişimin tam tersine olacak şekilde hedef patojendeki yoğunluk azalışından olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri, turuncu sütunlar: uygulama öncesi alınan değerler, mavi sütunlar: uygulama sonrası alınan değerler, K:kontrol, E:*Epicoccum nigrum* izolatı, A:*Aureobasidium pullulans* izolatı, U:*Ulocladium consortiale* izolatı

Elde edilen veriler ışığında EÇSF ile enfekteli örneklere inokule edilen fungus izolatlarından *E. nigrum* ve *U. consortiale* endofit izolatların hastalığın yoğunluğuna olan etkilerinin benzer şekilde olduğu, birbirlerine yakın seviyelerde etki değerine sahip oldukları görülmüş; uygulamalarda önemli seviyelerde etkin olamayacakları düşünölmüştür. *A. pullulans* endofit izolatının etkinliğine bakıldığında ise diğer izolatlara oranla farklı bir etkiye sahip olduğu ve daha yüksek oranlarda etki gösterdiği belirlenmiştir.

Musetti ve ark., 2011 yılında *Ca. P.* mali ile enfekteli Cezayir Menekşelerine bağlardan elde ettikleri fungal endofitleri inokule ederek yaptıkları çalışmada kullandıkları endofit izolatlardan *Epicoccum nigrum* inokule edilmiş bitkilerin simptom şiddetinde azalmalar göröldüğünü belirlemişlerdir.

Tamamlanan bu çalışmada elde edilen verilere bakıldığında ise elma ağaçlarından izole edilen fungal endofitler kullanılmış, *Ca. P* mali ile enfekteli ağaçlardaki etkilerine bakılmış ve benzer şekilde *E. nigrum* izolatının hastalık etmeninin yoğunluğunu azaltmasının yanı sıra *A. pullulans* ve *U. consortiale* izolatlarının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Kullanılan endofit izolatları karşılaştırıldığında EÇSF hastalığının biyolojik mücadelesi kapsamında hedef patojen etmenin yoğunluğuna olan etkilerine bakıldığında 3 izolatın da etkili olduğu, *A. pullulans* endofit izolatının diğer izolatlara oranla çalışma kapsamında daha ümit-var sonuçlar verdiği ve hedef patojen yoğunluğunu azaltmada etkinliğinin daha yüksek olduğu kanısına varılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz sahip olduğu ekolojik koşullar sayesinde birçok meyve türünün yetiştirilebildiği önemli bir konumdadır. Sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretiminde önemli bir paya sahip olan yurdumuzda yetiştiricilik aşamalarında hastalık ve zararlılar gibi bazı biyotik etkenlerden dolayı her zaman kaliteli ve verimli ürün elde etmek mümkün olamamaktadır. Virüs, virüs benzeri hastalıklar ve fitoplazma hastalıkları üretimi sınırlandıran etkenlerden bazılarıdır. Bu hastalıklardan özellikle fitoplazma hastalıkları vektör böcekler ile bitkiden bitkiye taşınabilen, yıkıcı etkilere neden olabilen, bulunduğu bitki bünyesinde değişkenlikler gösterebilen ve iklim koşullarından etkilenebilen patojenler olduğundan tanılama ve mücadele aşamalarında önemli sorunlarla karşılaşmaktadır.

Ilıman iklim meyveleri grubunda yer alan elmalarda görülen Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma hastalığı ülkemiz elma yetiştirilen alanlar için de tehdit unsurudur. Patojen değişkenliği nedeni ile teşhisi, kimyasal herhangi bir mücadelesi olmadığı için de kontrol altında tutulması zor ve oldukça önemlidir.

EÇSF varlığına yönelik ülkemizde yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte özellikle Adana ve Mersin illerinde elma yetiştirilen alanlarda hastalığın durumu ile ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda EÇSF' nin teşhisi, tanılması yapılmış ancak mücadelesine yönelik herhangi bir araştırmanın bulunmadığı görülmüştür. Bu çalışma kapsamında önemli fitoplazma hastalıklarından olan EÇSF' nin arazi koşullarındaki varlığının yanı sıra etmen ile enfekteli ağaçlarda ve sağlıklı ağaçlarda bulunan fungal endofitlerin durumuna da bakılmış; söz konusu endofitlerin hastalığa karşı herhangi bir etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

EÇSF ile bulaşık bulunan ağaçlarda dahi etmenin mevsimsel faktörlere bağlı olarak değişkenlikler gösterdiği belirlenmiştir. 6 aylık dönemlerde yapılan kontroller sonrasında hastalığın güz dönemi olarak belirtilen Eylül-Şubat aylarında saptanabildiği görülmüştür. Bunun yanı sıra enfekteli olduğu bilinen ağaçların çoğunda bahar dönemi olarak belirtilen Mart-Ağustos aylarında hastalığın saptanamadığı görülmüştür.

Yapılan arazi çalışmalarında toplanan elma örneklerindeki EÇSF enfeksiyon oranı % 8,05 olarak bulunmuştur. Enfekteli ağaçlardan alınan aşı kalemleri ile yapılan aşılama çalışmalarında aşılardan tutmadığı, tutan aşılarda ise hastalığın aşıyla taşınma

ihtimalinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Hastalığın aşıyla taşınması ile ilgili yaşanan olumsuzluklar nedeni ile vektör böceklerle taşıma çalışmaları yapılmış ancak böcek bünyesinde hastalık etmenine rastlanılmamış böylece taşıma çalışmaları olumsuz sonuçlanmıştır.

Tüm araştırmalar doğrultusunda çalışma kapsamında elde edilen fungal endofitlerin etkinliğinin belirlenebilmesi için *in vitro* koşullarda kurulan denemelerde alınan olumsuz sonuçlar nedeni ile etkinlik çalışmaları arazi koşullarında enfekteli olduğu bilinen ağaçlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Yapılan morfolojik tanılama, patojenisite, moleküler testleme ve teşhislerin ardından endofit olduğu belirlenen *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Ulocladium consortiale*'nin arazi koşullarında EÇSF enfekteli ağaç dallarına inokulasyonu ile hastalığa karşı herhangi bir etkisinin olup olmayacağı araştırılmıştır. Fungus inokulasyonlarının ardından beklenen inkübasyon süreleri sonunda enfekteli ağaçlar yeniden analizlere tabi tutularak fungal endofitlerin hastalığa karşı etkinlik düzeyleri ile ilgili veriler elde edilmiştir. Fungal endofitlerin fitoplazma ile enfekteli olan ağaca inokulasyonundan önce ve sonra ağaçlardaki fitoplazma yoğunlukları yapılan analizlerle sayısal olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

EÇSF ile enfekteli ağaca uygulanan 3 endofit izolatu da olumlu sonuçlar vermiş; elde edilen izolatların etkinliğinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bunlardan *E. nigrum* ve *U. consortiale*'nin uygulama sonrası elde edilen EÇSF konsantrasyonuna ilişkin verilerin birbirine yakın değerler olduğu görülmüştür. Hastalık yoğunluğunu etkilemede söz konusu 2 endofitin benzer seviyelerde kaldığı ve *A. pullulans*'a kıyasla daha düşük oranlarda etki değerine ulaştığı saptanmıştır. 3 fungal endofit kıyaslandığında en yüksek etkinin *A. pullulans*'a ait olduğu, EÇSF hastalık yoğunluğunu uygulama sonrası %34,18 etki değeri ile azalttığı belirlenmiştir.

Yürütülen çalışmalara ayrı ayrı bakıldığında EÇSF hastalığının ülkemizde mevcut olduğu ve elma plantasyonlarında yaygın olarak bulunmadığı bir kez daha belirlenmiştir. Mersin, Niğde, Isparta ve Karaman illerinde hastalık etmeni tespit edilirken Adana ve Hatay'da etmenin varlığına rastlanmadığı ortaya konulmuştur. Yapılan sörvey çalışmalarında etmenin mevsimsel farklılıklar nedeni ile oldukça değişken olabildiği görülmüştür. Etmenin aşıyla taşınma çalışmalarında anaç-kalem uyumsuzluğu, aşı tutmaması ya da tutan aşılarda dahi etmenin taşınmaması gibi olumsuzluklarla

karşılaştığı görülmüştür. Benzer şekilde vektör böceklerle taşıma çalışmalarında etmen böcek bünyesinde saptanamamış ve bu yolla taşınmamıştır. Ayrıca sürveyler boyunca enfekteli ağaçların çoğunun üreticiler tarafından sökümlerinin yapıldığı gözlemlenmiştir.

Söz konusu hastalığın kimyasal mücadelesinin olmayışı ve karantina listelerinde yer alması nedeni ile olası biyolojik mücadele uygulamaları oldukça önem arz etmektedir. Elma ağaçlarından izole edilen fungal endofitlerin hastalık yoğunluğuna olan etkileri bu çalışma kapsamında belirlenmiştir. Böylece endofit funguslar kullanılarak EÇSF hastalığına karşı yapılabilecek olası biyolojik mücadele çalışmaları araştırılmıştır. Enfekteli ağaçlara yapılan fungal endofit inokulasyonu sonrasında *A. pullulans* izolatının etmenin yoğunluğunu azalttığı belirlenmesi hastalıkla mücadele çalışmaları açısından önemli bir adım olmuştur.

Yapılan bu çalışma fungal endofitler ile fitoplazma hastalıkları arasındaki etkileşimler üzerine ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Bunun yanı sıra fitoplazma hastalıklarına karşı biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini de taşımaktadır.

Hem dünyada hem de ülkemizde karantina patojeni olan ve yumuşak çekirdekli ağaçların önemli hastalıklarından olan EÇSF' nin yayılımının önlenmesi özellikle elma yetiştiriciliği yapılan illerimiz açısından oldukça önemlidir. Hiçbir ilaçlı mücadelesi olmayan EÇSF hastalığına karşı ümit-var sonuçların elde edildiği bu çalışma hastalık kontrolü ve yayılımının önlenmesi açısından önemli bir basamak olabilecektir.

İlk adımların atıldığı bu çalışma doğrultusunda yapılabilecek daha ileri düzeyde araştırmalar ile fungal endofitler ile fitoplazma hastalıklarının etkileşimi, hastalığı etkileyen mekanizmaların aydınlatılması ile de fitoplazma hastalıklarına karşı kontrol imkânı doğabilecektir. Böylece ülkemiz açısından önemli bir ürün olan elma yetiştiriciliğinde tehlike arz eden, verim ve kaliteyi önemli ölçüde etkileyen fitoplazma hastalıkları için mücadele olanakları sağlanabilecektir.

Bunun yanı sıra kontrolsüz fidan üretimlerinin önüne geçilerek, gerekli sertifikasyon çalışmaları yapılarak ve enfekteli alanlarda eradikasyon işlemleri uygulanarak hastalık yayılımı engellenebilecektir. Olası durumlarda hastalık ile mücadele olanakları doğabilecek ve hastalığın kontrol edilebilmesi durumunda eradike edilmeksizin etmenin yayılması engellenerek ülke tarımına ve dolayısıyla ekonomisine katkı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aldaghi, M., Massart, S., Roussel, S., Steyer, S., Lateur, M. and Jijakli, M.H., 2007a. Comparison of different techniques for inoculation of “*Candidatus Phytoplasma mali*” on apple and periwinkle in biological indexing procedure. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, 72(4): 779-784.
- Anonim, (2011). Türkiye İstatistik Kurumu, www.tuik.gov.tr
- Anonim, 2009. Yönetmelik: Tarım ve Köyişleri Bakanlığında Zirai Karantina Yönetmeliği, Apple proliferation phytoplasma, Resmi Gazete (Sayı: 27137). <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090210-11.htm>
- Arnold, A.E., 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, 21(2-3): 51-66.
- Barac, T., Taghavi S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L. and Colpaert, J.V., Vangronsveld, J. and Van Der Lei, D., 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**, 22: 583-588.
- Baric, S., Öttl, S. and Dalla Via, J., 2010. Infection rates of natural psyllid populations with ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in South Tyrol (Northern Italy). **21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops**, Julius-Kühn-Archiv, 427.
- Bertaccini, A. and Duduk, B., 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. **Phytopathologia Mediterranea**, 48: 355-378.
- Bianco, P.A., Marzachi, C., Musetti, R. and Naor, V., 2013. Perspectives of endophytes as biocontrol agents in the management of phytoplasma diseases. **Phytopathogenic Mollicutes**, 3(1): 56-59.
- Blumer, S. and Bovey, R., 1957. On apple proliferation virus. **Phytopathologische Zeitschrift**, 30: 237-258.
- Bovey, R., 1963. Apple Proliferation . In: Virus diseases of apples and pears. **Technical Communication, Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops**. 30: 63-67.
- Bovey, R., 1972. Maladie des proliférations (R. Bovey, et. al., Editörler) In: **La defense des plantes cultivees** (6th edition), p. 227-231. Payot, Switzerland.
- Brown, K.B., Hyde, K.D. and Guest, D.I., 1998. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, 1: 27-51.
- Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Loi, N., Ravnkar, M. and Petrovic, N., 2003. Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz Journal of Plant Diseases and Protection*, 110 (5), 476–483, 2003, ISSN 0340-8159.
- Bulgari, D., Bozkurt, A. I., Casati, P., Caglayan, K., Quaglino, F. and Bianco, P. A., 2012. Endophytic bacterial community living in roots of healthy and ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’-infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. **Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology**, DOI 10.1007/s10482-012-9766-3.
- Caglayan, K., Gazel, M. and Skoric, D., 2019. Transmission of Phytoplasmas by Agronomic Practices. **Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – II, Transmission and Management of Phytoplasma – Associated Diseases** (eds.: Bertaccini, A., Weintraub, P. G., Rao, G. P., Mori. N.), Springer, 258s.

- Canik Orel, D., Paltrinieri, S., Ertunç, F. and Bertaccini, A., 2019. Molecular diversity of ‘Candidatus Phytoplasma’ species in pome and stone fruits in Turkey. *Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin*, 2019, 59 (1) : 7-14.
- Canik, D. and Ertunç, F., 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. **Bulletin of Insectology**, 60(2): 335-336.
- Canik, E., 2007. Isparta, Yalova, Ankara illeri ve çevresinde elma ve armut bahçelerinde sorun olan fitoplazma enfeksiyonlarının belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ), 74s.
- Carraro, L., Ermacora, P., Loi, N. and Osler, R., 2004. The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees. **Journal of Plant Pathology**, 86(2): 141-146.
- Carraro, L., Loi, N. and Ermacora, P., 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. **European Journal of Plant Pathology**, 107: 695-700.
- Christensen, M., 1989. A view of fungal ecology. **Mycologia**, 81(1): 1-19.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M, Hansen, M. and Schulz, A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11):1175-84.
- Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Baragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Fornp, F. and Mattedi, M., 2008. Natural and experimental transmission of Candidatus Phtoplasma mali by root bridges. **Acta Horticulturae**, 781: 459-464.
- Dağtekin, Ş., 2009. Akdeniz Bölgesi’ndeki iki elma koleksiyon parselinde elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığının (Candidatus Phytoplasma mali) moleküler yöntemlerle tanınması. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN), 25s.
- Davies, D.L., Stickels J.E. and Adams, A.N., 1986. A single occurrence of apple proliferation disease in England. **Plant Pathology**, 35: 400-402.
- Deng, S. and Huriki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**, 14(1): 53-61.
- Dermastia, M., Dolanc, D., Mlinar, P. and Mehle, N., 2018. Molecular diversity of ‘Candidatus Phytoplasma mali’ and ‘Ca. P. prunorum’ in orchards in Slovenia. **Eur. J. Plant. Pathol.**, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1528-2>.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches broom, aster yellows of paulownia witches broom. **Japanese Journal of Phytopathology**, 33(4): 259-266.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.
- Ducroquet, J.P., Dosba, F., Lansac, M. and Mazy, K., 1986. Effet de la temperature sur l’expression des symptomes de la proliferation du pommier (Effect of temperature on symptom expression of apple proliferation). **Agronomie**, 6(10): 897-903.
- Elmer P.A.G., Alcock E.A. and Parry F., 2001. *Epicoccum nigrum* as a biological control and as a source of antimicrobial metabolites, p. 339. In: Proceedings of the 13th Bienal Conference of Australasian Plant Pathology Society, Cairns, Australia.
- EPPO Data Sheet, 2012. Bacteria, Phytoplasma mali (EPPO quarantine pest, Data Sheets on Quarantine Pests, Apple proliferation phytoplasma), p.1-4. <https://gd.eppo.int/datasheets/>

- EPPO, 2017. European and Mediterranean Plant Protection Organization Diagnostics, PM 7/62 (2) 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum'. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, 47(2): 146-163.
- FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (Erişim tarihi: 1.10.2019)
- Fowler, S.R., Jaspers, M.V., Walter, M. and Stewart, A., 1999. Suppression of overwintering *Botrytis cinerea* inoculum on grape rachii using antagonistic fungi. **New Zealand Plant Protection**, 52: 141-147.
- Frasinghelli, 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. **Journal of Phytopathology**, 148(7-8): 425-431.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Laviña, A. and Batlle, A., 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. **Plant Pathology**, 52: 513-520.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, 2: 113-118.
- Gardes, M., 2002. An orchid-fungus marriage: physical promiscuity, conflict and cheating. **New Phytologist**, 154(1): 4-7.
- Gimenez, C., Cabrera, R., Reina, M. and Gonzales-Coloma, A., 2007. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, 11: 707-720.
- Grisan, S., Martini, M., Musetti, R. and Osler, R., 2011. Development of a molecular approach to describe the diversity of fungal endophytes in either phytoplasma-infected, recovered or healthy grapevines. **Bulletin of Insectology**, 64(Supplement): 207-208.
- Gültekin, H., 2011. Kayıslarda elma çoklu sürgün fitoplazması hastalığının (*Candidatus Phytoplasma mali*) aşısı ve kök kaynaşması yolu ile taşınma etkinliklerinin araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN), 41s.
- Hashem, M. and Ali, E., 2004. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium damping-off* and root-rot of cotton seedlings. **Archives Phytopathology Plant Protection**, 37(4): 283-297.
- Heintz, W., 1986. *Cuscuta odorata*-ein effektiver Überträger für mykoplasmaähnliche Organismen (MLO) (*Cuscuta odorata*- an effective vector for mycoplasma-like organism (MLO)). **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, 38(9): 138-141.
- Hirsch, G. and Braun, U., 1992. Communities of parasitic microfungi. **Fungi in Vegetation Science**, 19(1): 225-250.
- Hyde, K.D., Busabban, B., Paulus, B., Crous, P.W., Lee, S., McKenzie, E.H.C., Photita, W. and Lumyong, S., 2007. Diversity of saprobic fungi. **Biodiversity and Conservation**, 16(1): 7-35.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group, 2004. *Candidatus Phytoplasma*, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54: 1243-1255.
- Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C. and Dosba, F., 1999. Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. **Plant Pathology**, 48: 283-287.

- Jaraush, B., Schwind, N., Jarausch, W., Kirczal, G., Muler, E. and Dickler, E., 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. **Plant Disease**, 87(1): 101.
- Jezic, M., Poljak, I., Idžojtić, M. and Liber, Z., 2016. First Report on Phytoplasmas Infecting Wild Apples and Wild Pears in Croatia. *Plant Disease*, DOI: 10.1094/PDIS-02-15-0184-PDN.
- Jumpponen, A., 2001. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, 11(4): 207-211.
- Kaplan, C. ve Turanlı, T., 2016. İzmir ve Manisa illeri kestane alanlarında saptanan *Coccinellidae* (Coleoptera) türleri. **Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**, 7(1): 65-78.
- Karman, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. **Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, İzmir Bornova**, 279.
- Kaya, K., Serce, Ç.U., Gazel, M., Caglayan, K. and Sauvion, N., 2016. Potential psyllid vectors of *Candidatus* Phytoplasma mali and *Candidatus* Phytoplasma pyri in Turkey. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, 53(2): 383-392.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120.
- Kiss, T., Necas, T. and Necasova, J., 2016. Comparison of real-time PCR protocols in detection and quantification of fruit tree 16SrX group phytoplasmas. **Genetika**, 48(2): 629-642.
- Kortekamp, A., 1997. *Epicoccum nigrum* Link: a biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. Et Curt.) Berl. et De Toni **Vitis**, 36(4): 215-216.
- Krczal, G., Krczal, H. and Kunze, L., 1989. *Fieberiella florii* (Stol), a vector of apple proliferation agent. **Acta Horticulturae**, 235: 99-106.
- Križanac, I., Plavec, J., Budinščak, Ž., Ivic, D., Škoric, D. and Šeruga Music, M., 2017. Apple proliferation disease in croatian orchards: A molecular characterization of ‘*Candidatus* phytoplasma mali’. *Journal of Plant Pathology*, 99(1): 95-101.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016. Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, 33: 1870-1874.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. & Decaris, B., 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. **Int J Syst Bacteriol**, 46, 102–111.
- Lecellier, G. and Silar, P., 1994. Rapid method for nucleic acid extraction from petri dishgrown mycelia. **Current Genetics**, 25: 122-123.
- Lee, I.M., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phtoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, 54: 221-255.
- Lee, I.M., 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., Gundersen, D.E., Davis, R.E. and 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.

- Liu, C.H., Ziu, W.X., Lu, H. and Tan R.X., 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, 88: 77-282.
- Loi, N., Carraro, L., Musetti, R., Pertot, I. and Osler, R., 1995. Dodder transmission of two different MLOs from plum trees affected by 'leptonecrosis'. **Acta Horticulturae**, 386: 465-470.
- 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.
- MacMillan, J., 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, 20(4): 387-442.
- Madrigal, C., Tadeo, J.L. and Melgarejo, P., 1991. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycological Research**, 95(12): 1375-1381.
- 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.
- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., and Osler, R. 2009. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. **Plant Disease**, 93(10): 993-998.
- Marwitz, R., Petzold, H. and Kunze, L., 1974. Investigations on the transfer of the possible causal agent of apple proliferation to herbaceous host. **Phytopathologische Zeitschrift**, 81: 85-91.
- Marzachi, C., 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. **Mediterranea Phytopathol. Mediterr.** 43(2): 228-231.
- Morvan, G. and Castelain, C., 1975. New evidences of the high sensitivity of *Malus dawsioniana* to apple proliferation disease and of its value for testing apple trees. **Acta Horticulturae**, 44: 175-182.
- Mostert, L., Crous, P.W. and Petrini, O., 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera* reference to the Phomosis viticola complex. **Sydowia**, 52: 46-58.
- Musetti, R., 2008. Management and Ecology of Phytoplasma Diseases of Grapevine and Fruit Crops. (A. Ciancio and K.G. Mukerji, Editör). In: **Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria**. Springer Science+Business Media B.V., 3: 43-60, Bari and New Delhi.
- Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Martini, M., Paduano C. and Osler, R., 2011. Interactions between '*Candidatus* Phytoplasma mali' and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. **Journal of Applied Microbiology**, 110: 746-756.
- Musetti, R., Martini, M., Borselli, S. and Osler, R., 2005. Funghi endofiti della vite con possibile implicazione nel recovery da Flavescenza dorata. **Petria**, 15: 141-143.
- Musetti, R., Paolacci, A. R., Ciaffi, M., Tanzarella, O. A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M. and Osler, R., 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. **Phytopathology**, 100(4): 390-399.

- Musetti, R., Sanita di Toppi, L., Ermacora, P. and Favali, M.A., 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. **Phytopathology**, 94(2): 203-208.
- Muthaiyan, M.C., 2009. Plant Quarantine-Importance of Phytoplasma (M.C. Muthaiyan, Editör). In: **Principles and Practices of Plant Quarantine**. Allied Publishers Pvt. Ltd., 8: 394-399, New Delhi.
- OEPP\EPPO, 1978. Apple Proliferation (Mycoplasm). **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, 8(2): 76-81.
- Özkan, M. ve Kurçman, S., 1976. Orta Anadolu elma bahçelerinde görülen virüs hastalıkları. **Bitki Koruma Bülteni**, 16(1): 106-115.
- Paulus, B., Kanowski, J., Gadek, P. and Hyde, K.D., 2006. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. **Mycological Research**, 110(12): 1441-1454.
- Petrini, O., Sieber, T.N., Toti, L. and Viret, O., 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, 1: 185-196.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D., 2004. Are some endophytes from *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, 16: 131-140.
- Porras-Alfaro, A. and Bayman, P., 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, 49:291-315.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R.F., Kuhirun, M., Eveleigh, D.E. and Punnapayak, H., 2005. Thailand habitats as source of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21(4): 393-398.
- Promptutha, L., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D and Jeewon, R., 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, 53(4): 579-590.
- Rodolfi, M., Legler, S.E. and Picco A.M., 2006. Endofiti fungini in *Vitis vinifera* in Oltrepò Pavese. **Micologia Italiana**, 35(3): 25-31.
- Rodriguez, J.R., White Jr., J.F., Arnold A.E. and Redman, R.S., 2008. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, 182(2): 314-330.
- Rui, D., Ciferri, R. and Refatti, E., 1950. La virosi degli "scopazzi del melo" nel Veronese. **Notiziario delle Malattie delle Piante**, 13: 7-11.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., and Ippolito, A., 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Postharvest Biology and Technology**, 30(3): 209-220.
- Schulz, B. and Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. **Mycological Research**, 109(6): 661-687.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S. and Rommert, A.K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106(9): 996-1004.
- Seemüller, E. and Schneider B., 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus *Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent. **Phytopathology**, 97(8): 964-970.
- Seemüller, E. and Schneider, B., 2004. 'Candidatus *Phytoplasma mali*', 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' and 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European Stone fruit yellows,

- respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54: 1217-1226.
- Seemüller, E., 1990. Apple proliferation (H.S. Aldwinckle, A.L. Jones editörler). In: **Compendium of apple and pear diseases**. American Phytopathological Society, pp. 67-68, St. Paul, Minnesota, USA.
- Seemüller, E., Carraro, L., Jarausch, W. and Schneider, B., 2011. Apple proliferation phytoplasma. (A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, and W. Jelkmann, Editör). In: **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**. APS-Press, 15: 67-73, Minnesota.
- Seemüller, E., Garnier, M. and Schneider, B., 2002. Mycoplasmas of plants and insects (S. Razin and R. Herrmann, Editör). In: **Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas**. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 5: 91-116, New York.
- Seemüller, E., Scahaper, U. and Zimbelmann, F., 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Z. PflKrankh. PflSchutz. (Journal of Plant Diseases and Protection)**, 91: 371-382.
- Sertkaya, G., Martini, M. and Osler, R., 2008. First Report of *Candidatus* Phytoplasma mali in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 90 (1): 143-149.
- Sieber, T.N. 2002. Fungal root endophytes (Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi, Editörler). In: **The Hidden Half**, Marcel Dekker, p. 887-917, New York
- Simmons, E. G., 1967. *Ulocladum consortale* (Thüm.). *Mycologia* 59: 84.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz K.H., Seemüller, E. and Kirkpatrick, B.C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 2988–2993.
- Strobel, G.A., 2002. Microbial gifts from the rainforest. **Canadian Journal of Phytopathology**, 24(1): 14-20,
- Tao, G., Liu, Z.Y., Hyde, K.D. and Yu, Z.N., 2008. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). **Fungal Diversity**, 33: 101-122.
- Tedeschi, R. and Alma, A., 2004. Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: *Psyllidae*). **Journal of Economic Entomology**, 97(1): 8-13.
- Tedeschi, R. and Alma, A., 2006. *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’. **Plant Disease**, 90(3): 284-290.
- Tedeschi, R., Bosco, D. and Alma, A., 2002. Population Dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: *Psyllidae*), as a vector of apple proliferation phytoplasma in North western Italy. **Journal of Economic Entomology**, 95(3): 544-551.
- Tedeschi, R., Ferrato, V., Rossi, J. and Alma, A., 2006. Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. **Plant Pathology**, 55: 18-24.
- TÜİK, 2018. Türkiye İstatistik Kurumu, Merkezi Dağıtım Sistemi. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 01.10.2019)
- Vogl, A., 1898. Mehl und die anderen mehlprodukte der cerealien und leguminosen. **Zeitschrift Nahrungsmittle Untersuchung Hyg Warenkunde**, 12: 25-29.
- Wilson, D., 1995. Endophyte – the evolution of a term and clarification of its use and definition. **Oikos**, 73(2): 274-276.

- Zagrai, L.A. and Zagrai, I., 2013. Preliminary survey of the occurrence of apple proliferation in the North of Romania. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*. Vol. LVII.
- Zhou, D.Q. and Hyde, K.D., 2001. Host-specificity, host-exclusivity and host-recurrence in saprobic fungi. ***Mycological Research***, 105(12): 1449-1457.



ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1984 yılında Antakya/HATAY’ da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Antakya’da tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden Ziraat Mühendisi ünvanı ile 2008 yılında mezun oldu. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Fitopatoloji alanından 2011 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. Halen 2012 yılında çalışmaya başladığı Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü/Adana’ Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktadır.



EKLER

EK 1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

(Doyle & Doyle, 1990)

% 2,5 CTAB Buffer (Fitoplazma için DNA izolasyon solüsyonu) (1 LT) :

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
CTAB	25 gr
NaCl (5 M)	81,8 gr
Tris (1 M)	121,1 gr
EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	40 ml
PVP-40 (%1)	10 gr

*Son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

*Kullanım esnasında β -mercaptoethanol taze olarak eklenir.

DNA İzolasyon Buffer (Fungus için DNA izolasyon solüsyonu) (1 LT) :

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

Tris-HCl (10 mM)

EDTA (0.5 M) (pH 8.0)

NaCl (100 mM)

%2 SDS

*Son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

5 M NaCl (100 ml) :

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

NaCl 29.2 gr

*29.2 g NaCl 80 ml H₂O'da çözündürülür.

*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

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

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

Tris base	12.1 gr
-----------	---------

*12.1 g Tris base 80 ml H₂O'da çözüldürülür.

*pH'sı konsantre HCl eklenerek ayarlanır. (pH 7.4 için 7 ml HCl)

*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

0.5 M EDTA (100 ml) (ph 8.0) :

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

EDTA	18,6 gr
------	---------

*80 ml H₂O'da çözüldürülür.

*Magnetik karıştırıcı ile kuvvetli bir şekilde karıştırılır.

*pH'sı NaOH pelletleri ile 8.0'a ayarlanır.

*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

TE Buffer (100 ml) (ph 8.0) :

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

Tris-Cl	1 ml
---------	------

EDTA	200 µl
------	--------

*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

3 M NaOAc (100 ml) (pH 5.22) :

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

NaOAc	24.6 g
-------	--------

*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

%2 SDS (100 ml) :

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

SDS	2 gr
-----	------

*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Ek 2. Agarose Jel Elektroforez Çözeltilerinin Hazırlanışı
(MANIATIS ve ark., 1982)

50 X TAE (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.

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

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

0.5 X TAE 200 ml

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

*Karanlık ortamda ışık almayacak şekilde koyu bir kap içerisinde oda sıcaklığında saklanır.

*Belirli aralıklarla tazelenir.

% 1.2'lik Agorose Jelin Hazırlanması :

*100 ml 1 X TAE içerisine eklenen 1.2 gr agarose mikrodalga fırında eritilir.

*İltilandıktan sonra elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülür.

*Donan jel 1 X TAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilerek örnek yüklemesi yapılır.

Ek 3. Fungus İzolasyonu Çalışmalarında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı

PDA: Potato Dextrose Agar

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

Difco™ Potato Dextrose Agar	39 gr
-----------------------------	-------

*Son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

*121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

PDA: Potato Dextrose Broth

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

Difco™ Potato Dextrose Broth	24 g.
------------------------------	-------

*Son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

*121°C'de 15 dakika otoklavlanır.