



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAHRAMANMARAŞ İLİ KİRAZ BAHÇELERİNDE
FİTOPLAZMALARIN PCR/RFLP ANALİZLERİYLE TANILANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE OLASI VEKTÖRLERİN BELİRLENMESİ**

BAHAR KARAPINAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
AĞUSTOS-2018**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAHRAMANMARAŞ İLİ KİRAZ BAHÇELERİNDE
FİTOPLAZMALARIN PCR/RFLP ANALİZLERİYLE TANILANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE OLASI VEKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

BAHAR KARAPINAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
AĞUSTOS-2018

17.08.2018

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.

BAHAR KARAPINAR

ÖZET

KAHRAMANMARAŞ İLİ KIRAZ BAHÇELERİNDE FİTOPLAZMALARIN PCR/RFLP ANALİZLERİYLE TANILANMASI, KARAKTERİZASYONU VE OLASI VEKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

Türkiye’ de kiraz ağaçlarında fitoplazmalar ile ilgili çalışmalar çok sınırlı olup, vektörleri konusunda detaylı bir çalışma yürütülmemiştir. Bu çalışmada, Kahramanmaraş ilinde yetiştirilen kiraz ağaçlarındaki fitoplazmaların varlığı PCR-RFLP analizleri ile belirlenmiş, hem fitoplazmaların hem de böceklerin konukçusu olan yabancı otlarda fitoplazmaların varlığı belirlenmiş, fitoplazma ile enfekteli kiraz bahçelerinden ve çevredeki yabancı otlardan olası fitoplazma vektörü böcekler teşhis edilmiş, böcek bünyesinde fitoplazma varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmış, vektör böceklerle deneysel taşıma çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada kiraz ağaçlarında gözlenen en yaygın semptomlar kısmi dal kurumaları, aşırı sürgün oluşumu ve çiçek tomurcuklarının ve yapraklarının sık gelişimi, sararma ve dalların uçlarında çıplaklaşma olmuştur. Kiraz bahçelerinde bulunan yabancı otlarda ise virüs semptomlarına benzer mozaik, sararma ve damar bantlaşma semptomları gözlenmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplam 52 kiraz, 5 vişne ve 4 yabancı ot örneği toplanmış olup, Nested-PCR analizleriyle testlenen kirazlardan 5 tanesinde fitoplazma saptanırken (%9.61), vişne ve yabancı ot örneklerinde fitoplazma saptanamamıştır. Kiraz örneklerinin RFLP analizlerinde bu fitoplazmaların *Ca. P. prunorum*, ve *Ca. P. pyri* oldukları belirlenmiştir. Kiraz bahçelerinden *Cicadellidae* familyasına ait 796 adet böcekten 127 tanesi fitoplazma açısından pozitif olarak saptanmış olup böcek bünyesinde fitoplazma enfeksiyon oranı %15.95 olarak belirlenmiştir. Fitoplazmaların deneysel taşıma çalışmalarında 10 adet kiraz bitkisinin 7 tanesinin 16SrI (Aster sarılığı fitoplazması, *Ca. P. asteris*) ile enfekteli olduğu, denemede kullanılan *Psammotettix striatus* bireylerinin bünyesinde 16SrI fitoplazma enfeksiyon oranının %18,43 olduğu belirlenmiştir.

2018, 57 sayfa

Anahtar kelimeler: Kiraz, fitoplazma, nested-PCR, vektör

ABSTRACT

DETECTION AND CHARACTERIZATION BY PCR/RFLP ANALYSES OF PHYTOPLASMAS IN SWEET CHERRY ORCHARDS IN KAHRAMANMARAŞ PROVINCE AND DETERMINATION OF POSSIBLE VECTORS

There are very limited studies on sweet cherry tree phytoplasmas in Turkey, but not any information of their vectors. In this study, presence of phytoplasmas in sweet cherry trees growing in Kahramanmaraş province was detected by PCR-RFLP analysis, the presence of phytoplasmas in weeds which are the host of vectors and phytoplasmas, the vector species collected from phytoplasma infected sweet cherry trees and from weeds grown in and around of cherry orchards were identified, the presence of phytoplasmas in vectors were determined by molecular methods and the experimental transmission trials were done. In this study, the most common symptoms observed on sweet cherry trees were yellowing, partial shoot drying, proliferation, çiçek tomurcuklarının ve yapraklarının sık gelişimi, yellowing, baring of shoot terminals. The weeds found in sweet cherry orchards showed virus-like symptoms such as mosaic, yellowing and vein banding symptoms. Totally 52 sweet cherry, 5 sour cherry and 4 weed samples were collected from surveyed regions and according to nested-PCR analysis 5 sweet cherry trees were found infected by phytoplasma (9.61), but phytoplasma was never found in sour cherry trees and weed samples. RFLP analyses of sweet cherry samples showed that these phytoplasmas were *Ca. P. prunorum* and *Ca. P. pyri*. 127 out of 796 insects belongs to *Cicadellidae* family collected from sweet cherry orchards were found phytoplasma positive, and the infection rate of phytoplasma in insects was detected as 15.95%. In experimental transmission trials, 7 out of 10 young sweet cherry plants were found infected with 16SrI (Aster yellows phytoplasma, *Ca. P. asteris*) and the infection rate of 16SrI group phytoplasma in *Psammotettix striatus* specimen used in transmission trials was detected as 18,43%.

2018, 57 pages

Key words: Sweet cherry, phytoplasma, nested-PCR, vector

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen Hocam Sayın Prof Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a, çalışmamda Cicadellidae örneklerinin ayırımı ve teşhisleri konusunda yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr. Hüseyin BAŞPINAR'a ve Sayın Hocam Dr. Öğretim Üyesi Kamuran KAYA'ya ve Ziraat Yüksek Mühendisi Mehtap ACIOĞLU' na ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş olan arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen ailem ve eşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması	18
3.2.2. Vektör Böceklerin Toplanması ve Taşıma Denemelerinin Yapılması	18
3.2.3. Moleküler Çalışmalar.....	19
3.2.3.1. Nükleik Asit Ekstraksiyonu	19
3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
3.2.3.3. Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP) Analizi.....	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	23
4.1. Arazi Çalışmaları ve Simptomolojik Gözlemler	23
4.2. Bitkilerden nükleik asit izolasyonu ve PCR analizleri	28
4.3. Vektör böceklerin toplanması ve taşıma denemelerinin yapılması	30
4.4. Taşıma denemeleri ve PCR Analizleri	36
4.5. RFLP Analizleri.....	41
5. SONUÇ	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49
EKLER.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Sararma simptomu gözlenen kiraz ağaçları	23
Şekil 4.2.	Kiraz ağaçlarının bazı dallarında gözlenen dal kurumaları	24
Şekil 4.3.	Kiraz ağaçlarında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomu.....	24
Şekil 4.4.	Kahramanmaraş'ın Andırın ilçesi'nde kiraz ağaçlarında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomu.....	25
Şekil 4.5.	Kahramanmaraş Andırın ilçesi'nde kiraz ağaçlarında gözlenen boğum noktasından birden fazla sürgün çıkışı simptomu	25
Şekil 4.6.	Kahramanmaraş Andırın ilçesi'nde kiraz ağacında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomu.....	26
Şekil 4.7.	Kahramanmaraş'tan toplanan <i>Medicago</i> sp. (yabani yonca)'de gözlenen mozaik ve sararma simptomları	26
Şekil 4.8.	Kahramanmaraş'tan toplanan <i>Amaranthus</i> sp. (horoz ibiği)'de gözlenen damar bantlaşması ve mozaik simptomları	27
Şekil 4.9.	Kahramanmaraş'tan toplanan <i>Physalis</i> sp. (fener otu)'de gözlenen damar bantlaşması ve mozaik simptomları.....	27
Şekil 4.10.	Prince ve ark., (1993)'na göre ile ekstrakte edilen 33 numaralı kiraz DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 119.5, 260/280:1.93, 260/230:1.69).....	28
Şekil 4.11.	Prince ve ark., (1993)'na göre ile ekstrakte edilen 56 numaralı vişne DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon:101.1, 260/280:1.91, 260/230:1.56)	28
Şekil 4.12.	DNA Plant mini kitinin (Qiagen) modifikasyonu ile ekstrakte edilen 83 numaralı kiraz DNA'nın spektrofotometre ile ölçüm grafiği(Konsantrasyon: 237.2,260/280:1.83, 260/230:1.33).....	29
Şekil 4.13.	M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas). 1-52: Kahramanmaraş ilinden toplanan kiraz örnekleri; 53-57: Kahramanmaraş ilinden toplanan vişne örnekleri; 58-61: Kahramanmaraş toplanan yabancı ot örnekleri, 62: Su kontrol; ES: 'Ca. Phytoplasma prunorum'; AP: 'Ca. Phytoplasma pyri'pozitif kontroller.....	29
Şekil 4.14.	Kiraz ağaçlarında darbe yöntemiyle japon şemsiyesine düşen böceklerin emgi tüpü yardımıyla toplanması.....	30
Şekil 4.15.	Kiraz bahçesinden ve bahçe civarından atrapla böcek toplanması.....	31
Şekil 4.16.	Morfolojik teşhisi yapılmış olan böceklerin %96 alkol içeren tüpten alınması, yıkanması ve kurutulması.....	31
Şekil 4.17.	Ekstraksiyon amacıyla plakalara böceklerin yerleştirilmesi.....	32
Şekil 4.18.	Wasko ve ark. (2003)'nın metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen <i>Psammotettix striatus</i> (2G) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 302.2, 260/280:2.04, 260/230:1.47).....	32

Şekil 4.19.	Wasko ve ark. (2003)'nin metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen <i>Psammotettix striatus</i> (1G) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 99.7, 260/280:2.06, 260/230:1.00).....	33
Şekil 4.20.	Wasko ve ark. (2003)'nin metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen <i>Psammotettix provincialis</i> (2A) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 89.7, 260/280: 2.06, 260/230:1.36).....	33
Şekil 4.21.	Wasko ve ark. (2003)'nin metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen <i>Psammotettix striatus</i> (2B) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 196.0, 260/280:2.06, 260/230:1.47).....	33
Şekil 4.22.	Kahramanmaraş ili kiraz bahçelerinden toplanan ve tür teşhisi yapılan Cicadellidae familyasına ait böceklerin M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.1-92: Araziden toplanan Cicadellidae familyasına ait farklı böcek türleri. –K: Negatif kontrol, AP: ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '; PD: ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' pozitif kontroller. W: Su kontrol	34
Şekil 4.23.	Kahramanmaraş ili kiraz bahçelerinden toplanan ve tür teşhisi yapılan Cicadellidae familyasına ait böceklerin M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.1-27: Araziden toplanan Cicadellidae familyasına ait farklı böcek türleri. –K: Negatif kontrol, Su: Su kontrol, ES: ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '; AP: ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '; PD: ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' pozitif kontroller	34
Şekil 4.24.	Taşıma denemesi amacıyla araziden toplanan böceklerin binoküler altında seçilmesi ve sayılması.....	36
Şekil 4.25.	Taşıma denemesinin kurulması	37
Şekil 4.26.	Arazide sağlıklı kiraz fidanlarına taşıma denemesinin kurulması.....	37
Şekil 4.27.	Taşıma denemesi yapılan bitkilerden bir görüntü.....	37
Şekil 4.28.	Farklı Cicadellid türler ile kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi böceklerinin P1P7 primerini takiben fU3/fU5 universal primeri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-17: Taşıma denemesinde kullanılan <i>P. striatus</i> bireyleri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '; AP: ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '; PD: ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' pozitif kontroller. W: Su kontrol	38
Şekil 4.29.	<i>P. striatus</i> bireyleri ile sağlıklı kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinin P1P7 primerini takiben F1B6 ve M1M2 universal primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-17: Taşıma denemesi kurulan kiraz bitkileri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '; AP: ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '; PD: ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' pozitif kontroller. W: Su kontrol.....	39

- Şekil 4.30. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinden toplanan Cicadellid türler P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-31: Taşıma denemesinde kullanılan Cicadellid böcekler; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Su kontrol..... 40
- Şekil 4.31. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinin P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-31: Taşıma denemesi bitkileri, M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol..... 40
- Şekil 4.32. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesinde kullanılan bitki ve böceklerin P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-20: Taşıma denemesi bitkileri, 21-30: Taşıma denemesinde kullanılan böcekler; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol..... 40
- Şekil 4.33. Kahramanmaraş ilinden toplanan kiraz örneklerinin P1P7 primerini takiben fU3/fU5 üniversal primer çifti kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen fitoplazma izolatlarının *RsaI* ve *SspI* enzimleri kullanılarak yapılan RFLP analizlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-4: Kiraz bitkileri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: '*Ca. Phytoplasma prunorum*'; AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontroller. - E: Enzim içermeyen negatif kontrol 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)	10
Çizelge 3.1.	Bitki ve böcek örneklerinden fitoplazma teşhisi amacıyla yapılan PCR analizlerinde kullanılan primerler, baz dizileri ve elde edilen baz uzunlukları	21
Çizelge 4.1.	Kahramanmaraş ilinden toplanan <i>Cicadellidae</i> familyasına ait türler ve böcek bünyelerinde fitoplazma bulunma durumu.....	33
Çizelge 4.2.	Taşıma denemesinde kullanılan böcekler ve bünyelerinde fitoplazma bulunma durumu.....	38



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	Sıcaklık
Da	Dekar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
gr	Gram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
M	Molar
mM	Milimolar
pmol	Pikomol

KISALTMALAR

CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
bp	baz çifti
d ₂₂ O	Çift distile su
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromid
ETOH	Ethanol
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

MLO	Mikoplazma Benzeri Organizma
ESFY	European stone fruit yellows
PD	Pear decline
AP	Apple Proliferation
NaCl	Sodium Chloride



1.GİRİŞ

Rosaceae familyasında olan kirazın (*Prunus avium* L.) anavatanı Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölgedir. Ülkemiz kirazın orijin merkezlerinden biri olup oldukça geniş alanlarda kiraz yetiştiriciliği yapılmaktadır. 2017 yılında Türkiye kiraz üretimi 854,009 dekar alanda yapılmış ve 627,132 ton kiraz elde edilmiştir. 2017 yılı Kahramanmaraş ilinde kiraz üretimi ise 20,156 dekar alanda ve toplam 17,945 ton kiraz üretimi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2017). Dünyada 1500 civarında kiraz çeşidi bulunmaktadır. Ülkemizde yetiştirilen en yaygın temel çeşit iri, sert ve tatlı meyve eti, çatlamaya dayanıklı meyvesi, uzun yeşil sapı, yola ve muhafazaya dayanıklılığı ile dünyanın en önemli kirazları arasına girmiş olan “0900 Ziraat” çeşididir. Hastalık ve zararlıların diğer meyve ağaçlarında olduğu gibi kiraz ağaçlarında da önemli ölçüde verim ve kalite kayıplarına yol açtığı bilinmektedir. Zararlı böcekler, bakteriyel ve fungal hastalıklar çeşitli kimyasallar kullanılarak kontrol altına alınabilmekte ancak virüs, fitoplazma ve viroidlerle kimyasal mücadele olanağı bulunmamaktadır.

Virüsler tarafından sebep olduğu tahmin edilen bazı bitki hastalıklarının morfolojik olarak mikoplazmaya benzeyen prokaryotların floem dokusunda kolonize olduğu ilk kez 1967 yılında ortaya konulmuştur (Doi ve ark., 1967). Japon araştırmacılar, elektron mikroskopu kullanarak sarılık hastalığı görülen bitkilerde hücre duvarı olmayan mikroorganizmaları görüntülemişlerdir. Şimdiye kadar sarılık hastalığı olarak adlandırılan hastalıklar daha sonra saprofitik yaşayan veya insan ve hayvanlarda hastalık yapan mikoplazmalara benzediği için mikoplazma benzeri organizmalar olarak isimlendirilen etmenler tarafından sebep olduğu bildirilmiştir. *In vitro*' da gelişmemesi nedeniyle son 15 yıl öncesine kadar çok az özelliği bilinen bu organizmalar, ribozomal DNA dizilimi sayesinde bitki floemi ve böcekleri kolonize edebilen ve hücre duvarı olmayan bu prokaryotların sınıfı içerisinde büyük bir monofiletik grup olduğu anlaşılmıştır. Uluslararası Karşılaştırmalı Mikoplazmoloji Araştırma Projesi (International Research Project for Comparative Mycoplasmaology)' nin Fitoplazma Çalışma Grubu, 1990' lı yıllarda, prokaryotların bu grubunu tamamlayabilmek için 'fitoplazma' ismini vermiş ve 2004 yılında bu prokaryotların resmi sınıflandırılması '*Candidatus Phytoplasma*' cinsi olarak yapılmaya başlanmıştır (IPRCM, 2004).

Fitoplazma hastalıkları tüm dünyada oldukça farklı bitkilerde hastalıklara neden olmaktadır. Fitoplazmalarla ilgili olduğu bilinen hastalıklar, tropik alanlarda Hindistan cevizi gizli sarılık (coconut lethal yellowing), sandal ağacı sivrilme hastalığı (sandal spike diseases), paulownia cadı süpürgesi (paulownia witches' broom), mısırdaki bodurlaşma (corn stunt), çeltik sarı cücelik hastalığı (rice yellow dwarf diseases) ekonomik olarak önemli olanlardır. Hindistan, Orta Afrika, Avrupa ve ABD ülkelerinde orman ağaçları fitoplazma hastalıklarından büyük oranda zarar görmüşlerdir. Kiraz, asma, elma, armut, erik, kayısı, turunçgil ve üzüm meyvelerinin çoğunluğu sarılık, cadı süpürgesi, geriye doğru ölüm ve aşırı sürgün oluşumu olarak adlandırılan fitoplazma hastalıklarından farklı oranlarda etkilenmektedirler. Fitoplazmaların kültür bitkilerinin yanı sıra yabancı otlarda da ciddi boyutlarda epidemi yaptığı ortaya konulmuştur (Bertaccini, 2007).

Obligat parazit olan fitoplazmalar bakterilere benzeyen tek hücreli ve hücre duvarı olmayan bitki patojenleridir. Konukçu hücrenin sitoplazmasında ve vektör böceklerin bünyesinde çoğalan fitoplazmalar tomurcuklanma ile aseksüel üreme yaparlar. Fitoplazmalar enfekte ettikleri bitkinin iletim demetlerinden floemine saldırır ve floem dokusuna yerleşir. Bu patojenler bitkilerin floeminden beslenen yaprak pireleri, *Cixiidae* ve *Psillidae* familyasına bağlı böceklerle persistent yolla taşınırlar. Vektör böcek bitkide emgi yaparak beslenirken patojeni bünyesine alır ve daha sonrasında beslenme kanalı, tükürük bezlerine iletir ve çoğalır. Patojen içeren vektör sağlıklı bitkilerle beslenirken patojeni aktarır. Diğer taraftan, aşılama, çelikle üretim, mikro çoğaltım gibi seksüel çoğaltmadan farklı yöntemlerle yapılan çoğaltma işlemlerinin fitoplazmanın taşınmasında rol oynadığı uzun yıllardır bilinmektedir. Tohumla taşıma ise hala araştırılan bir konu olmakla birlikte, yonca bitkilerinde Hindistan cevizi gizli sarılık (coconut lethal yellowing) fitoplazmasının çok sayıda bitkide tohumla taşındığı belirlenmiştir. Fitoplazmaların küsküt yoluyla da bir bitkiden diğerine taşındığı bilinmektedir. Cezayir menekşesi (*Vinca rosea*) fitoplazmalarının ırklarının muhafaza edildiği önemli bir indikatör bitkidir.

Oldukça korunmuş 16S rRNA gen dizileri fitoplazmaların sınıflandırılmasında en çok kullanılan moleküler araç olmuştur. PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA dizilerinin RFLP analizine göre ise 33 farklı grup tanımlanmıştır (Bertaccini ve ark., 2014).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde kiraz yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Kahramanmaraş ilinde kiraz ağaçlarındaki ve bahçe içinde bulunan yabancı otlardaki fitoplazmaların varlığının PCR-RFLP analizleri ile belirlenmesi ve fitoplazma ile enfekteli kiraz bahçelerinden ve çevredeki yabancı ot populasyonlarından toplanacak olası vektör aday böceklerin teşhis edilerek moleküler yöntemlerle böcek bünyesinde fitoplazma varlığının araştırılmasıdır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kiraz (*Prunus avium* L.) *Rosaceae* familyasına dahildir. Anavatanı Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölge olan kirazın orjin merkezlerinden biri de ülkemizdir. Dünyada geniş bir yayılma alanına sahip kiraz üretiminde, ülkemiz 627,132 ton üretimiyle dünya kiraz üretiminde önemli bir paya sahip olup üretimi yıldan yıla hızla artış göstermektedir (Anonim, 2017). Kiraz yetiştiriciliği Türkiye'nin farklı iklim ve toprak yapısına sahip tarımsal bölgelerine yayılmış olmasına rağmen, en yaygın yetiştiricilik özellikle Ege ve Akdeniz Bölgelerinde yapılmaktadır. Ege Bölgesinde 346.329 dekar alandan 202.132 ton verim alınmakta, Akdeniz Bölgesinde ise 132.372 dekar alandan 120.661 ton verim alınmaktadır (Anonim, 2016). Son yıllarda yurt dışından kontrolsüz bir şekilde getirilen farklı kiraz çeşitleriyle yeni bahçeler tesis edilmekte ve üretim alanı giderek artmaktadır.

2017 yılında Türkiye kiraz üretimi 854,009 dekar alanda yapılmış ve 627,132 ton kiraz elde edilmiştir. 2017 yılı Kahramanmaraş ilinde kiraz üretimi ise 20,156 dekar alanda ve toplam 17,945 ton kiraz üretimi gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2017).

Ülkemizde kiraz ağaçlarında sorun oluşturan fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar konusunda birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte fitoplazma hastalıkları ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır.

Fitoplazmalar, *Mollicute* sınıfına dahil olan, bakterilere benzeyen tek hücreli, hücre duvarı olmayan, obligat paraziter bitki patojenleridir. Filogenetik olarak düşük oranda G+C içeren, gram +, hücre duvarı olmayan bir grup mikro organizmalardır (Weisburg ve ark., 1989). Fitoplazmaların dünyada yüzlerce üründe hastalık yaptığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2000). Fitoplazma hastalıklarının bazıları konukçu dizisi ve yayılımı bakımından oldukça sınırlı kalmışsa da, tüm dünyada oldukça fazla bitki grubunda hastalığa neden oldukları saptanmıştır. Dünyada farklı bitkilerde fitoplazmalarla ilişkili olduğu bilinen en yaygın hastalıklar, mısır bodurlaşma (corn stunt), çeltik sarı cücelik hastalığı (rice yellow dwarf diseases), tropik alanlarda hindistancevizi öldürücü sarılık (coconut lethal yellowing), sandal ağacı başak hastalığı (sandal spike disease), paulownia cadı süpürgesi (paulownia witches' broom) ekonomik olarak en önemlileridir. Kültür bitkilerinin yanı sıra orman ağaçları da Hindistan, Orta Afrika, ABD ve Avrupa gibi ülkelerde fitoplazma epidemilerinden dolayı oldukça fazla

zarar görmektedirler. Meyve ağaçlarından elma, armut, erik, kayısı, kiraz, turunçgil, asma ve üzümü meyvelerin çoğunluğu sarılık, yıkım, aşırı sürgün oluşumu ve cadı süpürgesi olarak adlandırılan fitoplazma hastalıkları ile hastalanmaktadır. Dünya çapında kültüre alınan birçok otsu bitki ve yabancı otlarda önemli ölçüde epidemiy yapan fitoplazmalar bulunmaktadır (Bertaccini, 2007).

Fitoplazmalar enfekte ettikleri bitkilerin floem dokularında ve vektör böceklerin çeşitli dokularında yaşamlarını sürdürmektedirler (Bertaccini ve Duduk, 2010). Doğada bitkilerin floem dokularında beslenen vektör böcekler beslenmeleri sırasında patojenleri sağlıklı bitkilere aktarırlar. Bu patojenler bitkilerin floeminde beslenen yaprakpireleri, *Cixidiæ* ve *Psillidæ* familyasına bağlı böceklerle taşınır ve kışı vektör böceklerin bünyelerinde veya çok yıllık konukçu bitkilerde geçirmektedirler (Sugio ve ark., 2011). Bu familyalara dahil olan böcekler bitkilerde beslenirken yaptıkları emgi ile patojeni bünyesine alır ve daha sonra beslenme kanalı, tükürük bezleri yolu ile patojeni sağlıklı bitkilere aktarma özelliğine sahiptirler. Bazı çalışmalar fitoplazmaların konukçu bitki bünyesinde düzensiz olarak dağıldığını göstermişlerdir (Seemüller ve ark., 1984). Ayrıca odunsu dokuya sahip bitkilerde fitoplazma yoğunluğu mevsimsel olarak dalgalanmalar göstermektedir. Genel olarak bitkinin kök dokularında oldukça az sayıda bulunurlarken, gövde dokularında kök dokularına oranla daha yoğun olarak buldukları saptanmış ve ayrıca en yoğun olarak buldukları dokular yaşlı yapraklar olarak saptanmıştır (Christensen ve ark., 2004). Fitoplazmalar ayrıca küsküt ile de taşınmaktadır, bu yolla taşınma genellikle araştırmalar için fitoplazmaların Cezayir menekşesi (*Vinca rosea*) gibi deneysel konukçu bitkilere aktarılması açısından önemlidir. Bu şekilde pek çok fitoplazma ırkı Cezayir menekşesinde muhafaza edilmektedir. Fitoplazmalar hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere vektör böcekler, üretim materyalleri (tohum, aşı, çelik vb.) (Kaminska ve Korbin, 1999) ve küsküt (Dickinson ve Hodgetts, 2013) köprüleri ile taşınmaktadır. Tohumla taşınma ise hala araştırılan bir konu olmakla birlikte, Hindistan cevizi gizli sarılık fitoplazmasının yoncalara tohumla taşındığının ama tohumla taşınma oranının oldukça az olduğu belirlenmiştir (Bertaccini, 2007). Fitoplazmaların yonca, domates, mısır ve yağlık kanola bitkilerinin tohumlarıyla da taşınabilme olasılıkları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Khan ve ark., 2002; Botti ve Bertaccini, 2006; Calari ve ark., 2011; Chung ve Jeong, 2014).

Dünya kiraz yetiştiriciliğinde özellikle İtalya, Çek Cumhuriyeti ve Bulgaristan'da son yıllarda fitoplazmalarla ilişkili ciddi sorunlar bildirilmiş ve kiraz ölümleri önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. Kirazda ilk geriye ölüm hastalığı "leptonekrosis" olarak adlandırılmıştır (Goidanich, 1934). Kaliforniya'da X-hastalığı ile enfekteli kiraz ağaçları şiddetli simptom göstermiş ve bazı alanlarda kiraz yetiştiriciliğinin bitmesine neden olmuştur (Steenwyk ve ark., 1995). Hastalığın yayılma hızı kullanılan anaç ve vektör popülasyonuna bağlı olarak değişmiştir (Suslow ve Purcell, 1982). *Prunus mahaleb* dayanıklı olması nedeniyle aşı bölgesinde hipersensitif reaksiyon verdiği için üzerindeki enfekteli kiraz ağaçları hızla ölmüştür (Paltrinieri ve ark., 2008). Diğer anaçlarda geriye ölümün daha yavaş olduğu bildirilmiştir (Uyemoto ve ark., 1991; Kirkpatrick ve ark., 1995).

Amerika'da kiraz bahçelerinde görülen kuruma nedenleri ile ilgili olarak sunulan bir raporda sebebin X-hastalığı olduğu belirtilmiş ve bu hastalığa 16SrIII taksonomik grubuna ait fitoplazmaların neden olduğu bildirilmiştir. Bu etmeden dolayı, ağaç ölümlerinin yılda ortalama %3-5 arasında meydana geldiği bazı durumlarda yetiştiricilerin bahçeyi 2-3 yıl içinde kaybettikleri rapor edilmiştir. İlk kez 1931 yılında Kaliforniya'da tanılanan bu hastalık, 20 yıl sonra Kaliforniya'nın kuzeyindeki Napa ve Sonoma bölgesindeki kiraz endüstrisini yok ettiği, hastalığın hala diğer bölgeler için potansiyel bir tehdit olmaya devam ettiği, enfekteli ağaçlardan yaprak piresi *Fiebertella florii* tarafından sağlıklı ağaçlara taşındığı rapor edilmiştir. Ayrıca kuruyan ağaçların yerine yeni bahçeler tesis ederken, çeşitlerin dayanıklı olan mahlep üzerine aşılı olarak tercih edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Lee ve ark., 1992).

Çinde 1989'da kiraz endüstrisini ciddi boyutlarda etkileyen Çin kirazında (*Prunus pseudocerasus*) öldürücü sarılık hastalığı (lethal yellows disease) ortaya çıkmıştır (Zhu ve ark., 1998). İlkbahar aylarının sonuna doğru hastalıklı kiraz ağaçlarının yapraklarında sarılık göze çarpmakta ve erken yaprak dökümü meydana gelmektedir. Bu ağaçlar ya hiç meyve oluşturmamış, ya da çok küçük olmuştur ve sonuçta hasta ağaç üç dört yıl içinde ölmüştür. Bu hastalığa neden olan etmen 16Sr-V (elm yellows) grubunun ırkıdır. Çin'de 2007 yılında yapılan kiraz ağaçlarındaki survey sonucunda ağaçlarda virescence belirtileri görülmüş ve bu simptomu gösteren ağaçlarda '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (16SrI grubu) fitoplazması saptanmıştır (Gao ve ark., 2011).

Avrupa’da semptomlu kiraz bitkilerindeki fitoplazmanın Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı hastalığına (ESFY) neden olan 16SrX taksonomik grubuna ait ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ olduğu saptanmıştır (Paltrinieri ve ark., 2001).

Çek Cumhuriyeti’nde kiraz ve vişne ağaçlarının genellikle aster sarılığı fitoplazması (16SrI) ile enfekteli olduğu bildirilmiştir. Kirazlarda bodurluk, yaprak kıvrılması ve sarılık, vişnede ise küçük yaprak oluşumu, ağaçta kuvvet azalması ve geriye ölüm belirtileri gösteren ağaçların 16SrI grubuna ait ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ ile enfekteli olduğu bildirilmiştir. Bunun yanı sıra kirazda elma çoklu sürgün hastalığına (apple proliferation) neden olan *C. Phytoplasma mali*, vişnede ise *C. Phytoplasma prunorum* (16SrX grubu) saptanmıştır (Navratil ve ark., 2001). Çek Cumhuriyeti’nde 2009-2010 yıllarında yapılan surveylerde ise 25 vişne ağacından 9 adedinde fitoplazma tespit edilmiş ve bunların ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ olduğu belirlenmiştir (Ludvikova ve ark., 2011). Fitoplazma ile enfekteli ağaçlarda bodurluk, yaprak kıvrılması ve sararma; vişne ağaçlarında ise küçük yapraklılık, küçük meyvelilik, seyrek yeşil aksam ve geriye ölüm gözlenmiştir.

‘*Candidatus P. asteris*’ ayrıca Litvanya’da vişnelerde kiraz küçük yapraklılık hastalığı olarak tanımlanan aşırı sürgün oluşumu, küçük yaprak ve geriye ölüm ile ilişkili olduğu ve 16SrI-Q grubuna ait olduğu saptanmıştır (Valiunas ve ark., 2009). Küçük yaprak oluşumu ve aşırı yaprak dökümü gösteren vişne ağaçlarının ise 16SrVI grubuna ait clover fillodi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jomantiene ve ark., 2011).

Macaristan’da küçük yapraklılık, solgunluk ve geriye ölüm semptomlarının gözlemlendiği kiraz ağaçlarında 16SrX-B (ESFY) ve 16SrI-B (aster sarılığı) fitoplazmaları tespit edilmiştir (Varga ve ark., 2001).

İtalya’da şiddetli geriye ölüm belirtileri gösteren kirazlarda 16SrV-B, 16SrIII-B ve 16SrXII-A (Stolbur) grubu fitoplazmalar tespit edilmiştir (Paltrinieri ve ark., 2008). Yaz sezonunun başlangıcında bu ağaçların yaprakları normalden daha küçük olup, kloroz, kızarma, kıvrılma belirtileri göstermekte ve erken dökülmektedir. Slovakya’da solgunluk, geriye ölüm, çiçek ve floem nekrozu gözlenen kiraz ağaçlarında ise *Candidatus P. mali* tespit edilmiştir (Mehle ve ark., 2007).

Hırvatistan’da meyve ağaçlarının ve bunların vektörlerin ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Krizanac ve ark., 2010).

İran'da kiraz ağaçlarının iki farklı fitoplazma ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Zreik ve ark., 1995). Yaprak kıvrılması ve cadı süpürgesi belirtileri gösteren kiraz ağaçlarında '*Candidatus P. asteris*' saptanmıştır. Bununla birlikte 16Sr RNA geni ve 16S-23S yapılan sekans analizlerinde küçük yaprak ve rozetleşme belirtileri gösteren kiraz ağaçlarında 16SrII grubuna ait '*Candidatus P. aurantifolia*' tespit edilmiştir (Zirak ve ark., 2010).

Fitoplazmaların 50 yıl önce keşfedilmesinden bugüne kadar yapılan çalışmalarda hücre dışında bir ortamda kültüre alınma çabaları başarısız olmuştur, bu durum kültüre alınan prokaryotlarda uygulanan geleneksel metodlar ile fitoplazmaların taksonomik durumlarını belirlemeyi zorlaştırmıştır. Son 30 yıla kadar fitoplazmaların sınıflandırılması ve birbirinden ayırt edilmesi, enfekteli bitkilerde oluşturdukları belirtilere, bitki ve böcek konukçularının özellişmesi gibi biyolojik özelliklerine dayanılarak yapılıyordu. Biyolojik özelliklerinin belirlenmesi de uzun zaman almakla birlikte, iş gücü gerektirmekte ve bazen de güvenilir olmamaktaydı (Lee ve ark., 1998). Moleküler yöntemlere dayalı analizler son yıllarda giderek artarak fitoplazmaların teşhisinde ve sınıflandırılmasında daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlamıştır. Modern *Mollicutes* sistematığında polifazik taksonomi sistemi uyarlanmış olup, bu sistem son yıllarda fenotipik, genotipik ve filogenetik kriterlere göre uyarlanmıştır. Fitoplazma tanısında uygulanan moleküler temelli analizlerin biyolojik çalışmalardan daha doğru ve güvenilir olduğu ortaya konulmuştur.

Fitoplazmalar *in vitro* olarak kültüre alınamadığından alternatif metodlar kullanılarak etmenleri saptamak gereklidir. Geçmiş yıllarda bu amaç için hem DNA hibridizasyonu hem de serolojik yöntemler kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR), bitki ve böcek konukçularındaki fitoplazmayı belirlemek için elverişli bir yöntem olduğundan son yıllarda tercih edilen bir yöntem olmuştur. Fitoplazma genomunun, fitoplazmaya özgü 16SrRNA bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen DNA parçalarından PCR primerleri geliştirilmiştir. Ancak, 16SrRNA genomuyla ilişkili olan fitoplazmaların birbirine benzer olması bu fitoplazmaların ayırt edilmesini zorlaştırmıştır. Son yıllarda, fitoplazmaların ayırımı sağlayan bölgenin 16S ve 23S rRNA genom bölgesi olduğunu saptanmış ve ana fitoplazma gruplarını ayırt etmeyi sağlayacak spesifik genom bölgelerine özgü PCR primerleri geliştirilerek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Smart ve ark., 1996).

Tüm prokaryotlarda olduğu gibi fitoplazmaların universal olarak tanınması ve sınıflandırılması amacıyla 16S ribozomal RNA (16S RNA) gen dizisi bilgileri yaygın olarak kullanılmaktadır (Bertaccini ve ark., 2014). Bu mikroorganizmaların hassas ve doğru tanınması fitoplazma kaynaklı hastalıkların kontrolü için bir ön şarttır. 16S rRNA'ya dayalı ilk fitoplazma teşhisi 1990'lardan (Deng & Hiruki 1991; Schneider ve ark., 1993) sonra gerçekleştirilmiştir ve günümüzde çeşitli nükleik asit bazlı teknikler temel alınarak PCR (Baric & Dalla 2004; Zhang ve ark., 1998) yöntemi ile devam etmektedir. Son 30 yılda geliştirilen çeşitli protokol ve yöntemler ile gerek bitki materyali gerekse vektör böcek bünyesinden fitoplazmaların varlığı tespit edilerek fitoplazma hastalıklarının yayılmasının engellenmesi ve ekonomik etkilerinin azaltılması amaçlanmıştır.

Fitoplazmaların ayırımında ve sınıflandırmasında kullanılan moleküler markörlerden 16SrRNA geni en çok kullanılanıdır ve fitoplazmaların teşhisinde iyi sonuçlar alınmıştır. 16S rRNA geni üzerindeki bazı universal veya generik oligonükleotid primer çiftleri, 16S-23S içsel ara bölge (intergenic space region) ve kısmi 23SrRNA geni dizisini kapsayan primerler düzenlenmiş olup, bunlar bitki ve vektör böcek bünyesindeki fitoplazmaların DNA'sının çoğalmasını sağlamaktadır. 16S rRNA gen diziliminin, seçilen enzimlerle RFLP analizi Schneider ve ark (1993) ve Lee ve ark. (1993) tarafından fitoplazmaların sınıflandırılmasında uygulanmıştır. Onyediy restriksiyon enzimi ile RFLP analizi esas alınarak fitoplazmaların kapsamlı sınıflandırma şeması oluşturulmuştur. Büyük grupların ayırımı, 1-2 kb PCR ampliconunun RFLP görüntülerinin benzerlik (similarity coefficients) oranına göre hazırlanmıştır (Lee ve ark., 1998). İki farklı grup arasındaki RFLP görüntülerinin benzerlik oranı %90 veya daha azdır. Bir grup içerisinde alt grup oluşumları bu amplicon içerisindeki yan restriksiyon analizi ile belirlenmiştir. Bir bilinmeyen fitoplazma ırkı o grubun mevcut üyelerininkinden bir veya daha fazla kesim bölgesine sahipse yeni bir alt grup olarak belirlenmiştir (Bertaccini ve ark., 2014). Bugüne kadar 33 tane fitoplazma grubu ve her bir grupta da bir veya birden fazla alt grup saptanmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)

16SR SUBGROUP	STRAIN (ACRONYM) 'Candidatus sp.'	GENBANK NUMARASI
16SrI:	Aster yellows (America, Europe, Asia, Africa)	
I-A	Aster yellows witches' broom (AYWB)	NC_007716
I-A	Tomato big bud (BB)	L33760
I-B	Onion yellows mild strain (OY-M)	NC_005303
I-B	Aster yellows (MAY) 'Ca. P. asteris'	M30790
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065
I-D	Paulownia witches' broom (PaWB)	AY265206
I-E	Blueberry stunt (BBS3)	AY265213
I-F	Aster yellows apricot-Spain (A-AY)	AY265211
I-I	Strawberry witches' broom (STRAWB1)	U96614
I-K	Strawberry witches' broom (STRAWB2)	U96616
I-L	Aster yellows (AV2192)	AY180957
I-M	Aster yellows (AVUT)	AY265209
I-N	Aster yellows (IoWB)	AY265205
I-O	Soybean purple stem (SPS)	AF268405
I-P	Aster yellows from Populus (PopAY)	AF503568
I-Q	Cherry little leaf (ChLL)	AY034089
I-R	Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	AY102275
I-S	Mexican potato purple top phytoplasma (COAH10)	FJ914654
I-U	Mexican potato purple top phytoplasma (JAL6)	FJ914650
I-V	Mexican potato purple top phytoplasma (SON18)	FJ914642
I-W	Peach rosette-like disease (PRU0382)	HQ450211
I-Y	"Brote grande" of tomato 'Ca. P. lycopersici'	EF199549
16SrII:	Peanut witches' broom (America, Africa, Europe, Asia, Australia)	
II-A	Peanut witches' broom (PnWB)	L33765
II-B	Lime witches' broom (WBDL) 'Ca. P. aurantifolia'	U15442
II-C	Faba bean phyllody (FBP)	X83432
II-D	Papaya mosaic (PpM) 'Ca. P. australasia'	Y10096
II-E	Pichris echioides phyllody (PEY)	Y16393
II-F	Cotton phyllody (CoP)	EF186827
16SrIII:	X-disease (America, Europe, Asia)	
III-A	Peach X-disease (PX11CT1) 'Ca. P. pruni'	
III-B	Clover yellow edge (CYE)	AF173558
III-C	Pecan bunch (PB)	GU004371
III-D	Goldenrod yellows (GR1)	GU004372
III-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228
III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724
III-G	Walnut witches' broom (WWB)	AF190226/AF190227
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223
III-I	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	AF060875

Çizelge 2.1(Devamı). Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)

III-J	Chayote witches' broom (ChWBIII)	AF147706
III-K	Strawberry leafy fruit (SLF)	AF274876
III-L	Cassava frog skin disease (CFSD)	EU346761
III-M	Potato purple top (MT117)	FJ226074
III-N	Potato purple top (AKpot6)	GU004365
III-P	Dandelion virescence (DanV)	AF370119/AF370120
III-Q	Black raspberry witches' broom (BRWB7)	AF302841
III-T	Sweet and sour cherry (ChD)	FJ231728
III-U	Cirsium white leaf (CWL)	AF373105/AF373106
III-V	Passion fruit phytoplasma (PassWB-Br4)	GU292082
16SrIV:	Coconut lethal yellows (America, Africa)	
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307
IV-B	Yucatan coconut lethal decline (LDY)	U18753
IV-C	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	X80117
16SrV:	Elm yellows (Europe, America, Asia, Africa)	
V-A	Elm yellows (EY) 'Ca. P. ulmi'	AY197655
V-B	Jujube witches' broom (JWB-G1) 'Ca. P. ziziphi'	AB052876
V-C	"Flavescence dorée" (FD-C)	X76560
V-D	"Flavescence dorée" (FD-D)	AJ548787
V-E	Rubus stunt (RuS) 'Ca. P. rubi'	AY197648
V-F	Balanite witches' broom (BltWB) 'Ca. P. balanitae'	AB689678
16SrVI:	Clover proliferation (Europe, America, Asia)	
VI-A	Clover proliferation (CP) 'Ca. P. trifolii'	AY390261
VI-B	Strawberry multiplier disease (MC)	AF190224
VI-C	Illinois elm yellows (EY-IL1)	AF409069/AF409070
VI-D	Periwinkle little leaf (PLL-Bd)	AF228053
VI-E	Centarurea solstitialis virescence (CSVI)	AY270156
VI-F	Catharanthus phyllody phytoplasma (CPS)	EF186819
VI-H	Portulaca little leaf phytoplasma (PLL-Ind)	EF651786
VI-I	Passionfruit (WB-Br4) 'Ca. P. sudamericanum'	GU292081
16SrVII:	Ash yellows (America, Europe)	
VII-A	Ash yellows (AshY) 'Ca. P. fraxini'	AF092209
VII-B	Erigeron witches' broom (ErWB)	AY034608
VII-C	Argentinian alfalfa witches' broom (ArAWB)	AY147038
16SrVIII:	Loofah witches' broom (Asia)	
VIII-A	Loofah witches' broom (LufWB)	AF086621

Çizelge 2.1(Devamı). Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)

16SrIX:	Pigeon pea witches' broom (Europe, Asia, America)	
IX-A	Pigeon pea witches' broom (PPWB)	AF248957
IX-B	Almond witches' broom (AIWB) 'Ca. P. phoenicium'	AF515636
IX-C	Naxos periwinkle virescence (NAXOS)	HQ589191
IX-D	Almond witches' broom (AIWB)	AF515637
IX-E	Juniperus witches' broom	GQ925918
IX-F	Almond and stone fruit witches' broom (N27-2)	HQ407532
IX-G	Almond and stone fruit witches' broom (A1-1)	HQ407514
16SrX:	Apple proliferation (Europe, America)	
X-A	Apple proliferation (AP) 'Ca. P. mali'	AJ542541
X-B	European stone fruit yellows (ESFY) 'Ca. P. prunorum'	AJ542544
X-C	Pear decline (PD) 'Ca. P. pyri'	AJ54254
X-D	Spartium witches' broom (SpaWB) 'Ca. P. spartii'	X92869
X-E	Black alder witches' broom (BAWB(BWB))	X76431
16SrXI:	Rice yellow dwarf (Europe, Asia, Africa)	
XI-A	Rice yellow dwarf (RYD) 'Ca. P. oryzae'	AB052873
XI-B	Sugarcane white leaf (SCWL)	X76432
XI-C	Leafhopper-borne (BVK)	X76429
16SrXII:	Stolbur (Europe, Asia, America, Africa, Australia)	
XII-A	Stolbur (STOL11) 'Ca. P. solani'	AF248959
XII-B	XII-B Australian grapevine yellows (AUSGY) 'Ca. P. australiense'	L76865
XII-C	Strawberry lethal yellows (StrawLY)	AJ243045
XII-D	Japanese hydrangea phyllody 'Ca. P. japonicum'	AB010425
XII-E	Yellows diseased strawberry (StrawY) 'Ca. P. fragariae'	DQ086423
XII-F	"Bois noir" (BN-Op30)	EU836630
XII-G	"Bois noir" (BN-Fc3)	EU836647
XII-H	Bindweed yellows (BY-S57/11) 'Ca. P. convolvuli'	JN833705

Çizelge 2.1(Devamı). Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)

16SrXIII: Mexican periwinkle virescence (America)		
XIII-A	Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960
XIII-B	Strawberry green petal (SGP)	U96616
16SrXIV: Bermudagrass white leaf (Europe)		
XIV-A	Bermudagrass white leaf (BGWL) 'Ca. P. cynodontis'	AJ550984
XIV-B	Bermudagrass white leaf Iran	EF444485
16SrXV: Hibiscus witches' broom (America)		
XV-A	Hibiscus witches' broom (HibWB) 'Ca. P. brasiliense'	AF147708
XV-B	Guazuma witches' broom (GWB)	HQ258882
16SrXVI: Sugarcane yellow leaf syndrome (America)		
XVI-A	Sugarcane yellow leaf syndrome 'Ca. P. graminis'	AY725228
16SrXVII: Papaya bunchy top (America)		
XVII-A	Papaya bunchy top 'Ca. P. caricae'	AY725234
16SrXVIII: American potato purple top wilt (America)		
XVIII-A	American potato purple top wilt 'Ca. P. americanum'	DQ174122
16SrXIX: Chestnut witches' broom (Asia)		
XIX-A	Chestnut witches' broom 'Ca. P. castaneae'	AB054986
16SrXX: Rhamnus witches' broom (Europe)		
XX-A	Rhamnus witches' broom 'Ca. P. rhamni'	AJ583009
16SrXXI: Pinus phytoplasmas (Europe)		
XXI-A	Pinus phytoplasma (PinP) 'Ca. P. pini'	AJ310849
16SrXXII:		
XXII-A	Lethal yellow disease Mozambique (LYDM) 'Ca. P. palmicola'	KF751387
XXII-B	Cape St. Paul wilt disease (CSPW)	Y13912/JQ868442
16SrXXIII:		
XXIII-A	Buckland valley grapevine yellows	AY083605

Çizelge 2.1(Devamı). Fitoplazmaların 16S ribosomal DNA'larının RFLP analizleri ve/veya sekans yöntemiyle sınıflandırılması (Bertaccini ve ark., 2014)

16SrXXIV:		
XXIV-A	Sorghum bunchy shoot	AF509322
16SrXXV:		
XXV-A	Weeping tea witches broom	AF521672
16SrXXVI:		
XXVI-A	Sugarcane phytoplasma D3T1	AJ539179
16SrXXVII:		
XXVII-A	Sugarcane phytoplasma D3T2	AY539180
16SrXXVIII:		
XXVIII-A	Derbid phytoplasma	AY744945
16SXXXIX: Cassia witches' broom (Asia)		
XXIX-A	Cassia witches' broom (CaWB) 'Ca. P. omanense'	EF666051
16SXXX: Salt cedar witches' broom (Asia)		
XXX-A	Salt cedar witches' broom 'Ca. P. tamaricis'	FJ432664
16SXXXI: Soybean stunt (America)		
XXXI-A	Soybean stunt (SoyST1c1) 'Ca. P. costaricanum'	HQ225630
16SXXXII: Malaysian periwinkle virescence and phyllody (Asia)		
XXXII-A	Malaysian p. virescence (MaPV) 'Ca. P. malaysianum'	EU371934
XXXII-B	Malayan yellow dwarf phytoplasma (MYD)	EU498727
XXXII-C	Malayan oil palm phytoplasma (MOP)	EU498728
16SXXXIII: Allocasuarina muelleriana phytoplasma (Australia)		
XXXIII-A	Allocasuarina phytoplasma 'Ca. P. allocasuarinae'	AY135523

RFLP ile oluşturulan grublama 16S rRNA dizilerinin analizi ile oluşturulan ile oldukça benzerdir. Her bir grubun en az bir fitoplazma türü ile temsil edilmesi önerilmiştir (Gundersen ve ark., 1994). Son yıllarda, yukarıda verilen tablo görsel RFLP görüntüleri kullanılarak daha ayrıntılı bir şekilde güncellenmiştir (Wei ve ark., 2007;

2008). Her alt grup tek bir RFLP görüntüsünden oluşmaktadır. Tabloda referans fitoplazma ırklarının RFLP modelleri verilmek zorundadır. Bu görüntülerin karşılaştırılması ile bir araştırmacı bilinmeyen bir fitoplazma ırkının 16S rRNA gen dizisini ya gerçek yada bilgisayar aracılığı ile oluşturulan görsel RFLP analizi aracılığı ile tanımlayabilir. 16S rRNA geninin dizilemesi görsel RFLP analizinin oluşturulması için gereklidir. Pratikte, gerçek RFLP analizi, bilinmeyen bir fitoplazma hastalığının ön karakterizasyonunda ya çok sayıda örnek analiz edilecekse veya dizileme imkanı yoksa tercih edilebilir. Çizelge 2.1. fitoplazmaların en kapsamlı sınıflandırmasını temsil etmekte ve fitoplazma ırklarının hızlı tanısı amacıyla kullanışlı moleküler markörlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

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

Ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazmaların saptanması konusundaki ilk simptomolojik bulgular Çağlayan ve Gazel (1999) tarafından bildirilmiş olup daha sonraki yıllarda detaylı çalışmalar yapılmıştır. İzmir'den toplanan erik örnekleri arasında sadece bir adet Japon eriği (*Prunus salicina*) ağacında PCR-RFLP ile ESFY fitoplazması ilk kez ülkemizde tespit edilmiştir (Jaraush ve ark., 2000). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2003-2004 yılları arasında sert çekirdekli meyve bahçelerinde yapılan kapsamlı sörvey çalışmaları sonucunda toplanan 174 adet örnekten dört kayısı ağacının ESFY fitoplazması ile enfekteli olduğu PCR-RFLP yöntemi ile saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2004). Adana, Hatay ve İçel illerinden toplanan toplam 21 kayısı, badem, şeftali ve erik ağacından 4 tanesinin ESFY fitoplazması ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Sertkaya, 2005). Ülkemizin birçok bölgesinde gerek gen kaynaklarında gerekse ticari sert çekirdekli meyve bahçelerde fitoplazmaların varlığı araştırılmış ve gen kaynaklarında *Ca. Phytoplasma prunorum* fitoplazması %54,8 ticari bahçelerde ise %3,2 oranında saptanmış olup etmenin vektörleri konusunda bir kayıt rapor edilmemiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2006).

2007-2009 yılları arasında yürütülen bir yüksek lisans çalışmasında Mersin’de Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) Müdürlüğü’ nün damızlık kayısı parselinde bulunan birçok çeşit ile Mut yöresinde ticari olarak yetiştirilen bazı yerli ve yabancı kayısı çeşitlerinin *Ca. P. prunorum* ile enfeksiyon durumunun moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla toplanan örnekler PCR-RFLP yöntemi ile testlenmiş olup 112 adet simptomlu ve simptomsuz kayısı örneğinde fitoplazma enfeksiyon oranı % 8.035 olarak belirlenmiştir (Altan, 2009).

Doğu Akdeniz Bölgesinde ESFY hastalığının vektörleri ve etmeni yayma potansiyelleri/dönemleri konusunda yürütülen bir TÜBİTAK projesi kapsamında, *Circulifer haematoceps*, *Empoasca spp.*, *Exitianus capicola*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Phlepsius sp.*, *Psammotettix procincialis*, *P. striatus*, *Orosius orientalis* ve *Zyginidia pullula* (Cicadellidae: Homoptera) türleri toplanmış ve bu türlerden sadece *Empoasca spp.*, *Macrosteles quadripunctulatus* ve *Psammotettix procincialis* ile taşıma denemeleri yapılmıştır. Yapılan PCR/RFLP testlerinde *Empoasca spp.* (1/6), *Macrosteles quadripunctulatus* (1/8) ve *Psammotettix procincialis* (1/12) ESFY tespit edilmiştir (Sertkaya, 2005). Ancak, bu çalışmada saptanan türlerin hiç birisi ESFY’nin vektörü olmayıp, dünyada bu hastalığın en etkili vektörü olarak bildirilen *Cacopsylla pruni* yapılan arazi çalışmaları sonucunda bulunamamıştır. Bu psillidin ülkemizde varlığı ve hastalığı taşıdığına dair ilk bulgular 2010-2011 yıllarında Ulubaş Serçe ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışma sonucu elde edilmiş olup adı geçen çalışmada altı farklı sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapıldığı birçok ilde kapsamlı sörvey çalışmaları yapılmış, *C. pruni* Adana, Mersin, Bursa ve Yalova illerinde *P. spinosa* ve yabani *Prunus* türlerinde bulunurken, Hatay ve Malatya illerinde bulunamamıştır; Mersin ilinden toplanan *C. pruni*’lerin testlenmesi sonucunda bu bireylerin *Ca. Phytoplasma prunorum* içermelerinin oranlarının %23 olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye’de kayısılardan elde edilen üç *Ca. P. prunorum*, iki adet armut ve bir *C. pyri*’den elde edilen *Ca. P. pyri* izolatlarının *imp*, *aceF*, *pnp* ve *SecY* genleri kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda I26 kodlu Türkiye-ESFY izolatının diğer Avrupa izolatlarından farklı olan bir grupta yer aldığı saptanmıştır (Danet ve ark., 2011).

Türkiye’deki sert çekirdekli meyve ağaçlarında fitoplazma hastalıkları konusunda bazı çalışmalar bulunmasına rağmen, kiraz ağaçlarında bulunan fitoplazmaların

moleküler karakterizasyonu ve vektörleri konusunda çalışmalar hala eksiktir. Bu çalışmada, Kahramanmaraş ilinde yetiştirilen kiraz ağaçlarındaki fitoplazmaların varlığının PCR-RFLP analizleri ile belirlenmesi, fitoplazma ile enfekteli kiraz bahçelerinden ve çevredeki doğal ot populasyonundan toplanan olası vektör adayı böcekler teşhis edilerek moleküler yöntemlerle böcek bünyesinde fitoplazma varlığı araştırılması, hem fitoplazma hem de böceklerin konukçusu durumunda olan yabancı otlarda fitoplazmaların varlığının belirlenmesi, vektör böceklerle sağlıklı kiraz fidanlarına taşıma denemelerinin yapılarak vektör olma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Yapılan bu çalışmada Kahramanmaraş ilinde kiraz yetiştirilen ilçelerinden kiraz örnekleri, yabancı otlar ve bu alanlardan toplanan *Psyllidae* ve *Cicadellidae* familyalarına ait böcek türleri, çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Kahramanmaraş ilinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplam 52 kiraz, 5 vişne ve 4 yabancı ot olmak üzere toplam 61 bitki örneği toplanmış ve çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

Kahramanmaraş ilinde özellikle kiraz yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Bertiz, Andırın ilçelerindeki kiraz bahçeleri Mart-Aralık ayları arasında ziyaret edilerek güdümlü örnekleme ile bitki örnekleri toplanmıştır. Fitoplazmalara özgü yaprak deformasyonları, kısmi dal kurumaları, bodurluk, sarılık, kloroz, cadı süpürgesi oluşumları vb. anormallikler gösteren ağaçlardan örnekler alınmıştır. Ayrıca kiraz ağaçlarının ilk çiçek açtığı dönemde çiçek anormalliği gösteren ağaçlardan da örnekler alınmıştır. Kiraz ağaçlarından alınan 15–20 cm'lik 7–8 sürgün ve kiraz bahçeleri içerisinde ve çevresindeki simptom gösteren olası otsu konukçulardan toplanan örnekler ayrı ayrı torbalara konulmuş ve DNA analizleri yapılmaya kadar +4C'de muhafaza edilmiştir. Toplanan yabancı otların tür teşhisi M.K.Ü. Bitki Koruma Bölümü Öğretim üyelerinden Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ tarafından yapılmıştır.

3.2.2. Vektör Böceklerin Toplanması ve Taşıma Denemelerinin Yapılması

Kiraz ağaçlarında bulunan fitoplazmaların vektörü olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan *Psyllidae* ve *Cicadellidae* (Homoptera) familyalarına ait

böcekler, böceğin ergin döneminin aktif olduğu Mart-Nisan aylarından Aralık ayına kadar örnekleme yapılarak japon şemsiyesi, emgi tüpü ayrıca atrap sallama yöntemi kullanılarak toplanmıştır. Toplanan böcekler etiket bilgileri ile birlikte plastik kutular içerisinde canlı olarak laboratuvara getirilmiştir. Vektör böceklerin toplanması ve morfolojik ayrımlarının yapılarak gruplandırılması ve % 96'lık alkol bulunan eppendorf tüpler içerisine alınması M.K.Ü. Bitki Koruma Bölümü Öğretim üyelerinden Dr. Öğretim üyesi Kamuran KAYA tarafından, tür teşhisleri ise Adnan Menderes Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüseyin BAŞPINAR tarafından yapılmıştır. Morfolojik olarak tür teşhisleri yapılan böceklerin bünyelerinde hastalık etmeninin bulunup bulunmadığı belirleninceye kadar -20°C' de muhafaza edilmişlerdir. Laboratuvara canlı olarak getirilen böceklerin teşhisleri yapılmış ve daha sonra taşıma denemelerinde kullanılmışlardır. Taşıma denemeleri araziden toplanan en yoğun vektör aday türlerle kurulmuştur.

Taşıma denemelerinde araziden toplanan ve morfolojik teşhisi yapılan aynı tür böcekler aynı sağlıklı fidana (fitoplazma ari) aktarılmış (ortalama 20 böcek/bitki) ve bünyelerinde var olan olası fitoplazmayı bu konukçu bitkiye aktarması sağlanmıştır. Taşıma denemesi bitkileri günlük olarak kontrol edilmiş ve ölen böcekler etiket bilgileri ile toplanarak tek birey halinde ekstrakte edilmiş ve bünyelerinde fitoplazma bulundurup bulunmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm taşıma denemeleri 25±1°C sıcaklık, % 60-70 orantılı nem ve 16 saat ışıklandırma periyodundaki iklim odalarında özel tül kafesler içinde yapılmıştır. Taşıma denemesinde kullanılan bitkiler simptomolojik olarak gözlenmiş ve deneme kurulduktan yaklaşık 6 ay sonra ve her 6 ayda bir DNA ekstraksiyonu ve takibinde PCR yapılarak patojen taşımalarının gerçekleşip gerçekleşmediği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Araziden toplanan kiraz bitkilerinden ve taşıma denemesi kurulan bitkilerden nükleik asit ekstraksiyonu DNA Plant mini kitinin (Qiagen) protokolünün modifikasyonu ve Prince ve ark., (1993)'nın yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu

yönteme göre yaklaşık 1 gr bitki organı (yaprak orta damarı ve sürgün) chloroform/phenol yöntemi kullanılarak nükleik asitler ekstrakte edilmiştir. DNA izopropanol ile çökeltilerek elde edilen çökelti TE buffer'da [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 8.0)] çözündürülmüş ve PCR çalışmaları yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Araziden toplanan ve morfolojik olarak teşhis edilen psillidlerden DNA ekstraksiyonları Wasko ve ark. (2003)'na göre bazı modifikasyonlarla TNES metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu yönteme göre, psillidler tek bireyler halinde 96 çukurlu derin çukurlu (2 ml) plakaların çukurlarına yerleştirilmiş ve TNES ekstraksiyon tamponunda (50 mM; 400 mM NaCl; 20 mM EDTA; %0,5 SDS ve 0,2 µg/µl Proteinaz K) tüm gece 55°C'de inkübe edilmiştir. Her tüpe 5 µl 5 M NaCl eklendikten sonra 30 dakika 3700 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üstte toplanan sıvı yeni plakalara alınarak üzerine 400 µl soğuk absolute alkol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandıktan sonra %70 alkol ile yıkanmış ve 60 µl steril su ile sulandırıldıktan sonra çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bitkilerden ve böceklerden extrakte edilen DNA'ların miktar ve kalitelerinin ölçümleri Nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek değerlendirilmiştir. Fitoplazma gruplarını temsil eden izolatların pozitif DNA örnekleri X. Foissac (INRA, Fransa) ve A. Bertaccini (Italya)'dan temin edilmiştir. Sağlıklı kiraz yaprakları PCR analizlerinde negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İzole edilen bitki ve böcek DNA'ları Direkt- ve Nested-PCR yöntemiyle testlenmişlerdir (Lee ve ark., 1992). Direkt-PCR aşamasında nükleik asitler 1/50 oranında sulandırılarak 1µl DNA 50 µl reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 2 ünite *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. Direkt-PCR döngüsü; P1/P7 primerleri kullanılarak 94°C'de 2 dakika denatürasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 57°C'de 2 dakika ve 72 °C'de 3 dakikadan

oluşan 35 döngüyü takiben 72°C’de 10 dakikadan oluşmuştur. Direkt-PCR’den sonra uygulanan Nested-PCR’da kullanılan primerler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Nested PCR reaksiyon karışımına 1/50 oranında sulandırılmış Direkt-PCR ürünlerinden 1 µl eklenmiştir. Nested-PCR’da ise tüpler 94°C’de 2 dk; 94°C’de 30 sn denatürasyon, 55°C’de 30 sn. bağlanma, 72°C’de 1 dk uzama 35 döngü şeklinde gerçekleştirilmiş ve son uzama 72°C’de 5 dk olacak şekilde yapılmıştır (Lee ve ark., 1998). PCR ürünlerinin %1.2’lik agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra ethidium bromide ile boyanmış ve sonuçlar UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır (Varga ve ark., 2001). Universal fitoplazma primerleri ile teslenen bitki ve böcek örneklerinde fitoplazma pozitif saptanan örnekler grup spesifik primerler kullanılarak hangi gruba ait oldukları belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. Bitki ve böcek örneklerinden fitoplazma teşhisi amacıyla yapılan yapılan PCR analizlerinde kullanılan primerler, baz dizileri ve elde edilen baz uzunlukları

PCR tipi	DNA Uzunluğu (bp)	Primer Adı	Primer baz dizisi 5’-3’	Kaynaklar
Direkt PCR	1800	P1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA	Deng ve Hiruki, 1991
		P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart ve ark., 1996
Nested PCR	1050	f01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT	Lorenz ve ark., 1995
		r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT	
	550	16R758f (M1)	GCTTTTACTGACGCTGAGGC	Gibbs ve ark., 1995
		16R1232r (M2)	CTTCAGCTACCCTTTGTAAC	
	880	fU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Lorenz ve ark., 1995.
		rU5	CGGCAATGGAGGAAACT	
	1050	F1	AAGACGAGGATAACAGTTGG	Davis ve Lee, 1993
		B6	TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	Padovan ve ark., 1995
	1240	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACC CCG	Lee ve ark., 1995
		R16F2	GAAACGACTGCTAAGACTGG	

3.2.3.3. RFLP Analizi

PCR ürünlerinin RFLP analizleri amacıyla seçilen PCR ürünlerinden 5-15 µl'si restriksiyon endonükleaz enzimleri (*SspI*, *RsaI*) ile kesilmiştir. Elde edilen restriksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş, ethidium bromide ile boyanmış ve sonuçlar UV trans-illuminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları ve Simptomolojik Gözlemler

Proje kapsamında survey yapılan illerde kiraz bahçelerinde sararma (Şekil 4.1), kısmi dal kurumaları (Şekil 4.2), aşırı sürgün oluşumu ve çiçek tomurcuklarının ve yapraklarının sık gelişimi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6) gibi fitoplazmaya benzer simptomlar kiraz ağaçlarında gözlenmiştir. Yapılan arazi sörveylerinde vişne ağaçlarında fitoplazmaya özgü simptom gözlenmemiştir. Kiraz bahçelerinde horoz ibiği (*Amaranthus* sp.), fenerotu (*Physalis* sp.) ve yabancı yonca (*Medicago* sp.) gibi yabancı otlarda fitoplazmaya özgü simptomlarda ziyade mozaik, sararma ve damar bantlaşması gibi virüs benzeri simptomlar gözlenmiştir (Şekil 4.7, 4.8, 4.9). Yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplam 52 kiraz, 5 vişne ve 4 yabancı ot örneği alınmıştır.



Şekil 4.1. Sararma simptomu gözlenen kiraz ağaçları



Şekil 4.2. Kiraz ağaçlarının bazı dallarında gözlenen dal kurumaları



Şekil 4.3. Kiraz ağaçlarında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomsu



Şekil 4.4. Kahramanmaraş'ın Andırın ilçesi'nde kiraz ağaçlarında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomu



Şekil 4.5. Kahramanmaraş Andırın ilçesi'nde kiraz ağaçlarında gözlenen boğum noktasından birden fazla sürgün çıkışı simptomu



Şekil 4.6. Kahramanmaraş Andırın ilçesi'nde kiraz ağacında gözlenen aşırı sürgün oluşumu simptomsu



Şekil 4.7. Kahramanmaraş'tan toplanan *Medicago* sp. (yabani yonca)'de gözlenen mozaik ve sararma simptomsu



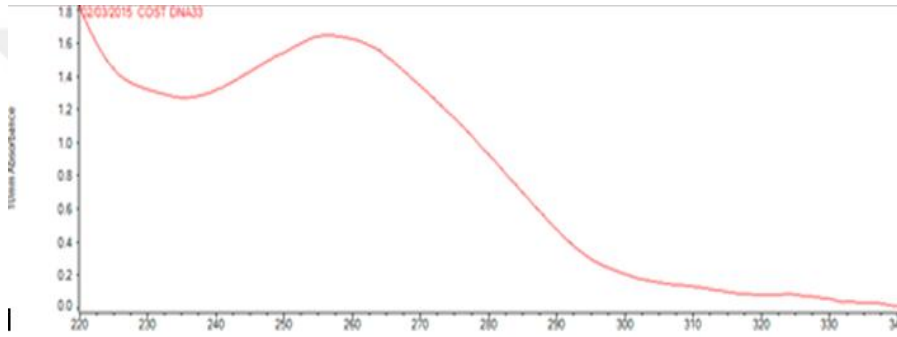
Şekil 4.8. Kahramanmaraş'tan toplanan *Amaranthus* sp. (horoz ibiği)'de gözlenen damar bantlaşması ve mozaik simptomları



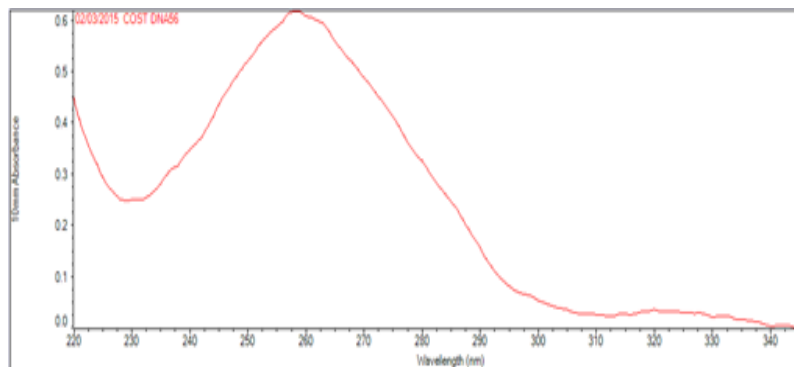
Şekil 4.9. Kahramanmaraş'tan toplanan *Physalis* sp. (fener otu)'de gözlenen damar bantlaşması ve mozaik simptomları

4.2. Bitkilerden nükleik asit izolasyonu

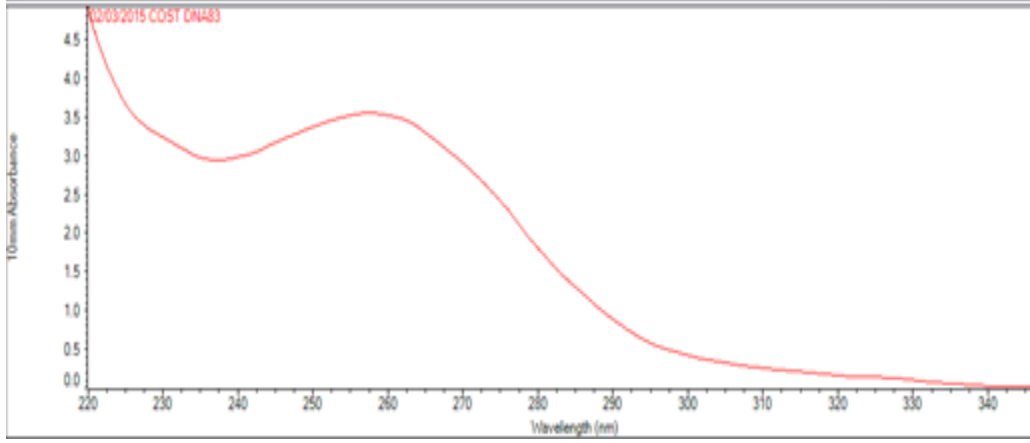
Araziden toplanan bütün kiraz, vişne ve yabancı ot örneklerinden, bunun yanında taşıma denemesinde kullanılan tüm kiraz bitkilerinden (taşıma denemesi yapılmadan önce ve sonra 6 ay ara ile 3 kez) DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstarkte edilen bitki ve böcek DNA'larının kalite ve miktarı Nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) cihazıyla ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde her iki yöntemle de hem kiraz hem de vişne ağaçlarından ekstrakte edilen DNA'ların birbirine yakın değere sahip olduğu, kalite ve miktarının ise DNA amplifikasyonu için yeterli düzeyde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10, 4.11, 4.12)



Şekil 4.10. Prince ve ark., (1993)'na göre ile ekstrakte edilen 33 numaralı kiraz DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon:119.5 ng/µl, OD260/280:1.93, OD260/230:1.69)

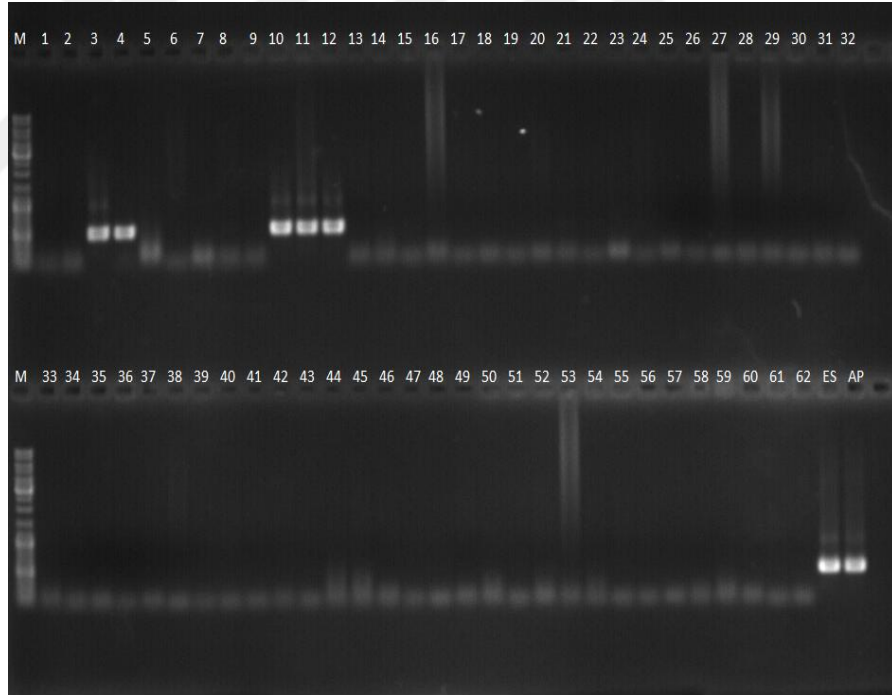


Şekil 4.11. Prince ve ark., (1993)'na göre ile ekstrakte edilen 56 numaralı vişne DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon:101.1 ng/µl, OD 260/280:1.91, OD 260/230:1.56)



Şekil 4.12. DNA Plant mini kitinin (Qiagen) modifikasyonu ile ekstrakte edilen 83 numaralı kiraz DNA'nın spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 237.2 ng/µl, OD 260/280:1.83, OD 260/230:1.33)

Araziden toplanan bitki örneklerinin ekstraksiyonu sonucunda elde edilen bitki DNA'ları direk- ve nested-PCR yöntemleriyle analiz edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas). 1-52: Kahramanmaraş ilinden toplanan kiraz örnekleri; 53-57: Kahramanmaraş ilinden toplanan vişne örnekleri; 58-61: Kahramanmaraş toplanan yabancı ot örnekleri, 62: Su kontrol; ES: 'Ca. Phytoplasma prunorum'; AP: 'Ca. Phytoplasma pyri' pozitif kontroller.

4.3. Vektör böceklerin toplanması ve taşıma denemelerinin yapılması

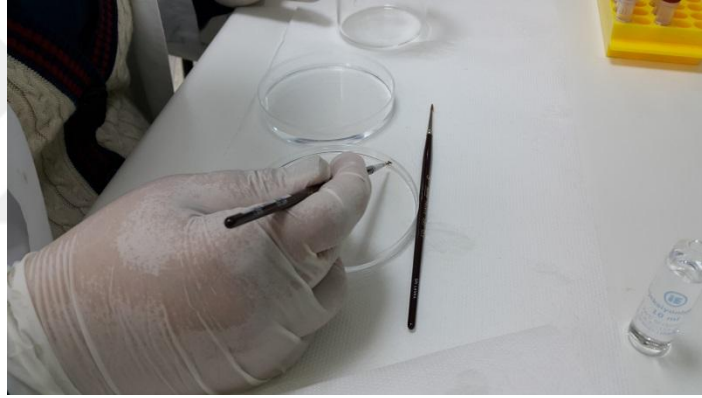
Kiraz ağaçlarından darbe yöntemiyle, bahçe içindeki yabancı otlardan da atrap sallama yöntemiyle toplanan vektör (Şekil 4.14, 4.15) böceklerin morfolojik olarak tür teşhisleri yapılmıştır. Vektör böceklerden ekstrakte edilen (Şekil 4.16, 4.17) DNA'ların miktar ve kalitelerinin ölçümleri Nanodrop spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçülerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21). Yapılan ölçümlerde böceklerden ekstrakte edilen DNA'ların kalite ve miktarının DNA amplifikasyonu için yeterli düzeyde olduğu bulunmuştur. Böceklerden ekstrakte edilen DNA'lar Nested-PCR yöntemiyle testlenmişlerdir (Şekil 4.21, 4.22).



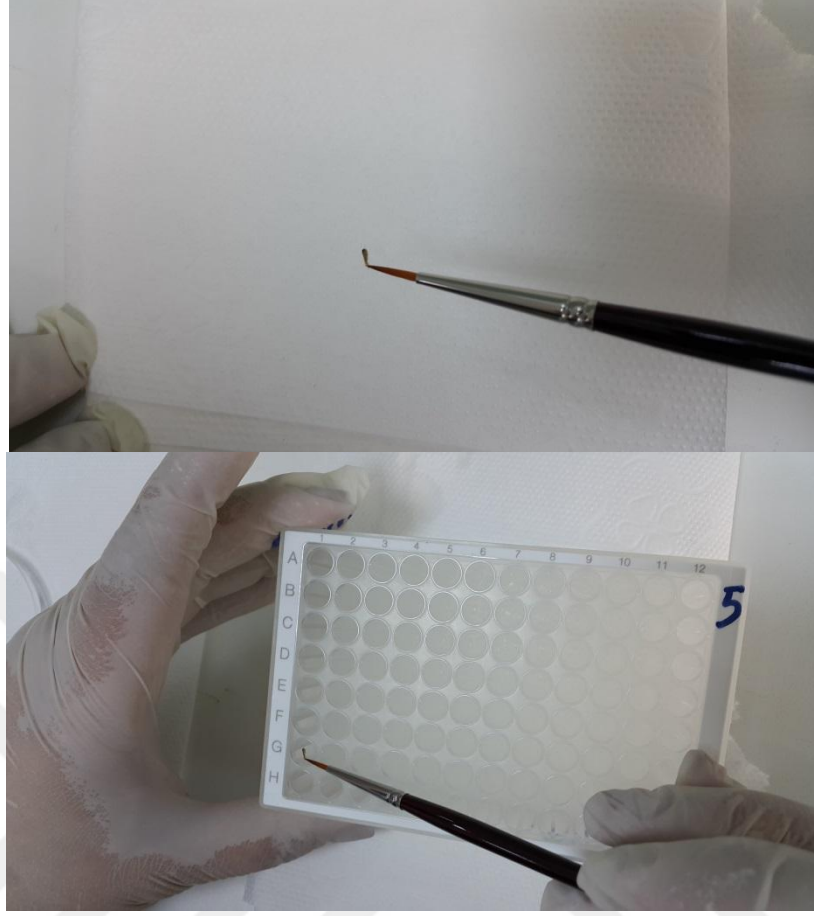
Şekil 4.14. Kiraz ağaçlarında darbe yöntemiyle japon şemsiyesine düşen böceklerin emgi tüpü yardımıyla toplanması



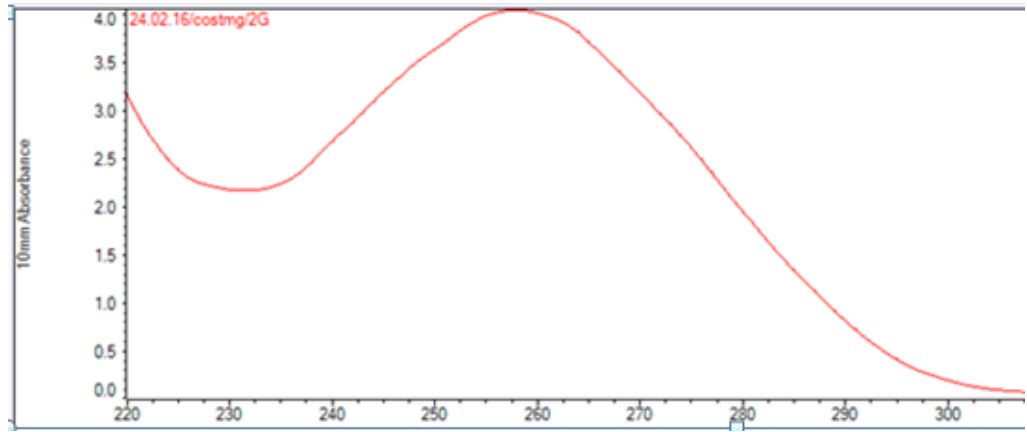
Şekil 4.15. Kiraz bahçesinden ve bahçe civarından atrapla böcek toplanması



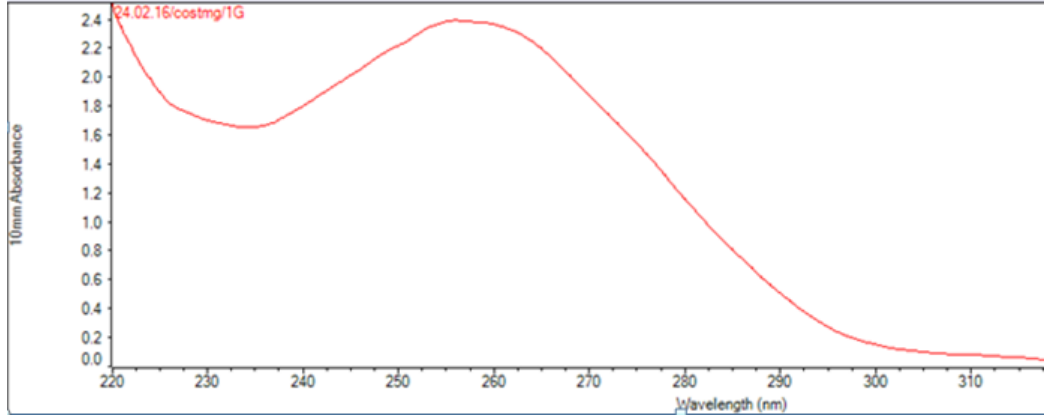
Şekil 4.16. Morfolojik teşhisi yapılmış olan böceklerin %96 alkol içeren tüpten alınması, yıkanması ve kurutulması



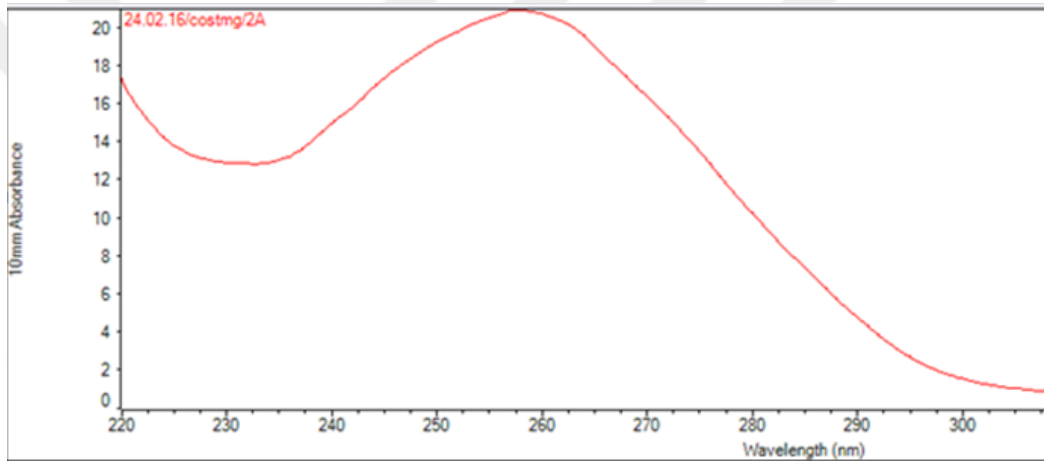
Şekil 4.17. Ekstraksiyon amacıyla plakalara böceklerin yerleştirilmesi



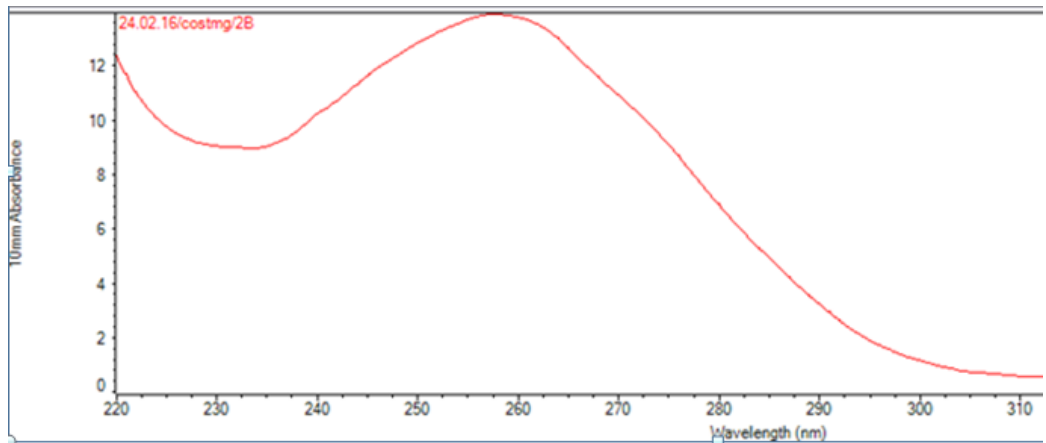
Şekil 4.18. Wasko ve ark. (2003)'nın metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen *Psammotettix striatus* (2G) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 302.2, 260/280:2.04, 260/230:1.47)



Şekil 4.19. Wasko ve ark. (2003)'nın metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen *Psammotettix striatus* (1G) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 99.7, 260/280:2.06, 260/230:1.00)

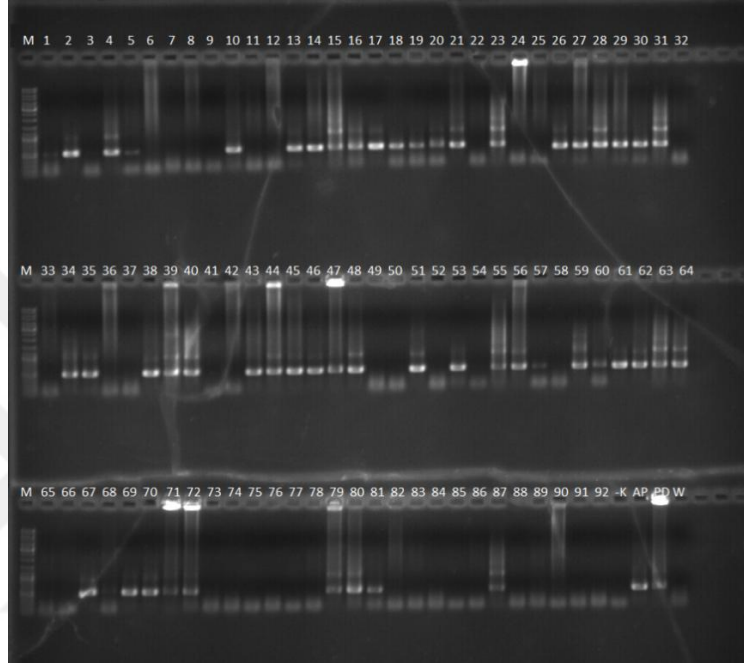


Şekil 4.20. Wasko ve ark. (2003)'nın metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen *Psammotettix provincialis* (2A) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 89.7, 260/280: 2.06, 260/230:1.36)

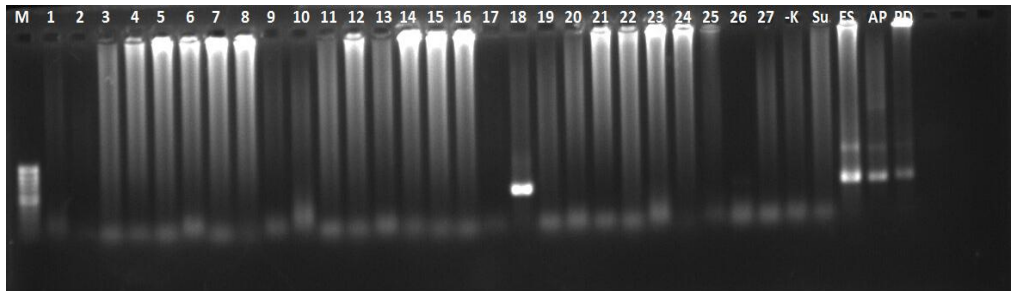


Şekil 4.21. Wasko ve ark. (2003)'nın metodunun bazı modifikasyonlarıyla ekstrakte edilen *Psammotettix striatus* (2B) DNA'sının spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon: 196.0, 260/280:2.06, 260/230:1.47)

Akdeniz bölgesi'nde kiraz bahçelerinden toplam 1339 adet Cicadellidae familyasına ait böcek toplanmıştır. Toplanan böcek örnekleri teşhis edildikten sonra Nested-PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve 1339 böcekten 231 tanesi fitoplazma pozitif olarak saptanmış (Şekil 4.22, 4.23) olup böcek bünyesinde fitoplazma enfeksiyon oranı %17.25 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22. Kahramanmaraş ili kiraz bahçelerinden toplanan ve tür teşhisi yapılan Cicadellidae familyasına ait böceklerin M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-92: Araziden toplanan Cicadellidae familyasına ait farklı böcek türleri. -K: Negatif kontrol, AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontrollere. W: Su kontrol



Şekil 4.23. Kahramanmaraş ili kiraz bahçelerinden toplanan ve tür teşhisi yapılan Cicadellidae familyasına ait böceklerin M1/M2 primerleri ile yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-27: Araziden toplanan Cicadellidae familyasına ait farklı böcek türleri. -K: Negatif kontrol, Su: Su kontrol, ES: '*Ca. Phytoplasma prunorum*'; AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontrollere.

Kahramanmaraş ilinden toplanan ve Cicadellidae familyasına ait böcekler, birey sayıları ve bünyelerinde fitoplazma saptananların sayıları ve fitoplazma ile % enfeksiyon durumu Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kahramanmaraş ilinden toplanan *Cicadellidae* familyasına ait türler ve böcek bünyelerinde fitoplazma bulunma durumu

Böcek adı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam dişi birey sayısı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam erkek birey sayısı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam nimf sayısı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam birey sayısı
<i>Psammotettix provincialis</i>	18/40	41/64	0/0	59/104
<i>Psammotettix striatus</i>	21/130	28/167	0/0	49/297
<i>Balclutha hebe</i>	2/6	4/8	0/0	6/14
<i>Empoasca sp.</i>	5/41	0/4	0/4	5/49
<i>Hardya anatolica</i>	0/3	3/8	0/0	3/11
<i>Anaceratagallia ribauti</i>	0/0	2/11	0/0	2/11
<i>Asymetrasca decedens</i>	1/26	0/31	0/0	1/57
<i>Anaceratagallia laevis</i>	0/1	1/6	0/0	1/7
<i>Anaceratagallia sp.</i>	1/3	0/0	0/0	1/3
<i>Typhlocyba sp.</i>	0/49	0/23	0/0	0/72
<i>Zyginidia pullula</i>	0/30	0/17	0/0	0/47
<i>Erythroneura</i>	0/30	0/11	0/0	0/41
<i>Circulifer haematoceps</i>	0/30	0/6	0/0	0/36
<i>Psammotettix sp.</i>	0/34	0/2	0/0	0/36
<i>Cicadulina bipunctella</i>	0/3	0/4	0/0	0/7
<i>Circulifer sp.</i>	0/1	0/1	0/0	0/2
<i>Macrostes laevis</i>	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Zyginella pulchra</i>	0/0	0/1	0/0	0/1
Toplam	48/428	79/364	0/4	127/796

Kahramanmaraş ili kiraz bahçelerinden toplanan böceklerden Cicadellidae familyasına ait böceklerden 428 tane dişi, 364 erkek ve 4 nimf olmak üzere toplam 796 adet böcek testlemeye alınmıştır. Bu böceklerin bünyesinde fitoplazma bulunma oranı Nested-PCR analizleriyle %15.95 olarak saptanmış olup, testlenen erkek bireylerde fitoplazma oranı %21.70 iken bu oran dişi bireylerde %11.21 olarak bulunmuş olup nimflerde fitoplazma saptanamamıştır. Arazi çalışmaları sonucunda en yoğun bulunan türler *Psammotettix striatus* ve *Psammotettix provincialis* olarak belirlenmiş olup, bu 2 tür toplanan Cicadellid türlerinin yaklaşık yarısı kadardır. Nested-PCR yöntemiyle testlenen *Psammotettix provincialis* bireylerinin bünyesinde fitoplazma bulunma oranı %56.73 iken *Psammotettix striatus* bireylerinde bu oran %16.49’dur. *Balclutha hebe*’de

fitoplazma bulunma oranı %42.85 iken, *Empoasca* sp.'de fitoplazma bulunma oranı %10.20, *Hardya anatolica*'da %27.27, *Anaceratagallia ribauti* türünde %18.18, *Asymmetrasca decedens* bireylerinde bu oran %1.75, *Anaceratagallia laevis*'te %14.28, *Anaceratagallia* sp.'de ise bu oran %14.28 olarak belirlenmiştir

4.4. Taşıma denemeleri ve PCR Analizleri

Araziden toplanan ve canlı olarak iklim odasına getirilen böcekler mikroskopta familya ve tür bazında ayrımları yapılan *Cicadellidae* ve *Delphacidae* familyasına ait böcekler 1-2 yaşındaki sağlıklı kiraz fidanları üzerine aktarılmış ve taşıma denemeleri kurulmuştur (Şekil 4.24, 4.25). Araziden canlı toplanan böcekler havaların aşırı sıcak olması ve mesafe uzaklığı nedeniyle M.K.Ü. iklim odasına getirilinceye kadar yarısından çoğu öldüğünden taşıma denemelerinden bazıları araziye taşınan sağlıklı fidanlara kurulmuş ve bu bitkiler hemen iklim odasına getirilmiştir (Şekil 4.26, 4.27).



Şekil 4.24. Taşıma denemesi amacıyla araziden toplanan böceklerin binoküler altında seçilmesi ve sayılması



Şekil 4.25. Taşıma denemesinin kurulması



Şekil 4.26. Arazide sağlıklı kiraz fidanlarına taşıma denemesinin kurulması



Şekil 4.27. Taşıma denemesi yapılan bitkilerden bir görüntü

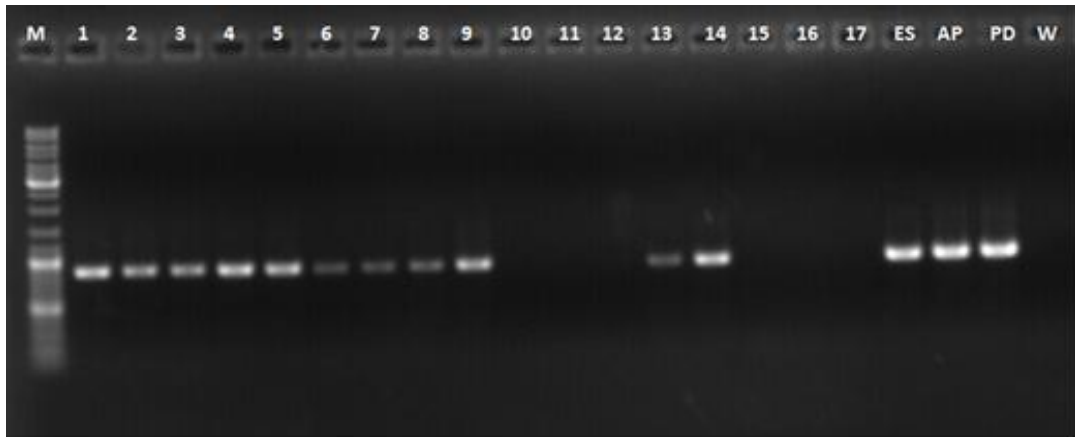
Taşıma denemelerinde 10 farklı sağlıklı kiraz bitkisi kullanılmıştır. Taşıma denemesinde kullanılan böceklerin listesi ve bünyelerinde fitoplazma içeren türlerin sayıları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Taşıma denemesinde kullanılan böcekler ve bünyelerinde fitoplazma bulunma durumu

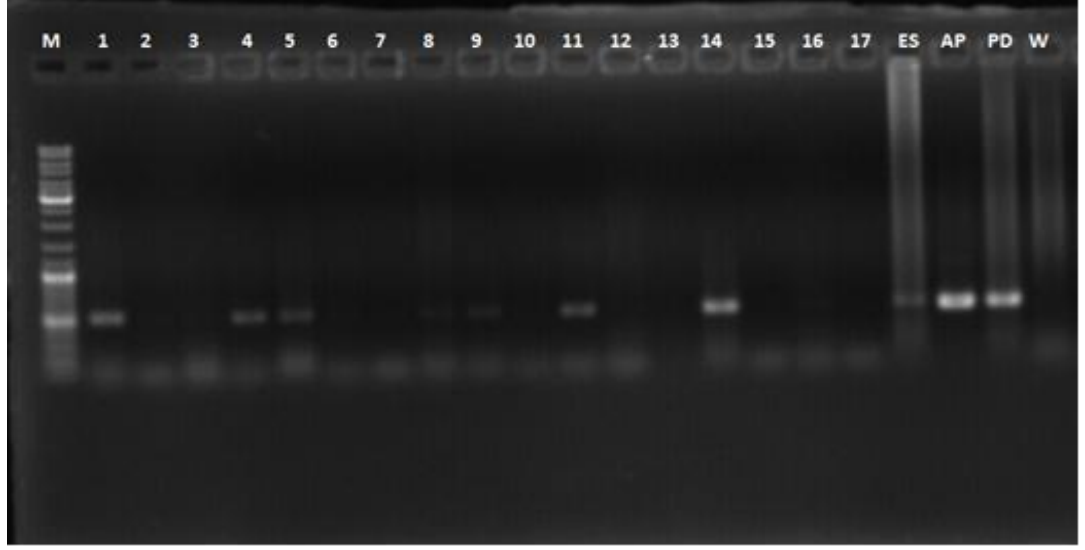
Taşıma denemesi bitki no	Taşıma denemesinde kullanılan böcek türü	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam dişi birey sayısı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam erkek birey sayısı	Fitoplazma enfekteli/testlenen toplam birey sayısı
1	<i>P. striatus</i>	-/5	-/16	-/21
2	<i>P. striatus</i>	-/10	-/9	-/19
3	<i>P. striatus</i>	-/10	-/15	-/25
4	<i>P. striatus</i>	-/6	1/5	1/11
5	<i>P. striatus</i>	-/3	1/9	1/12
6	<i>P. striatus</i>	1/16	1/13	2/29
7	<i>P. striatus</i>	5/18	2/12	7/30
8	<i>P. striatus</i>	5/12	2/11	7/23
9	<i>P. striatus</i>	2/7	3/8	5/15
10	<i>P. striatus</i>	1/10	9/15	10/25
Toplam		14/97	19/82	33/179
% enfeksiyon		14.43	23.17	18.43

Yapılan taşıma denemelerinde kullanılan *P. striatus* bireylerinin bünyelerinde fitoplazma bulunma oranı % 18.43 olmuştur. Dişi vektör böceklerle bu oran % 14.43 iken erkek bireylerde %23.17 olarak bulunmuştur (Şekil 4.28).

Sağlıklı 10 tane kiraz bitkisine kurulan taşıma denemesinde bitkiler Nested-PCR yöntemiyle 6 ayda bir testlenmiştir. Taşıma denemesi kurulduktan sonraki ilk 6 ayda yapılan testlemede 10 adet kiraz bitkisinin 5 adedinin fitoplazma ile enfekteli olduğu sonraki 6 ayda ise 2 bitkinin daha fitoplazma enfekteli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.29).

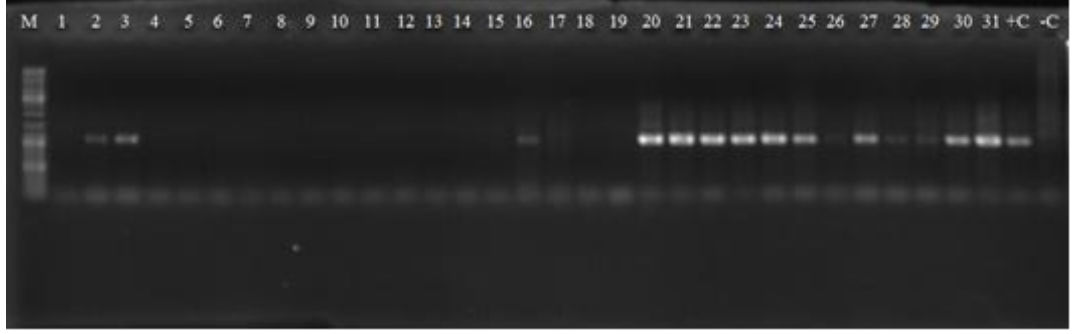


Şekil 4.28. Farklı Cicadellid türler ile kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi böceklerinin P1P7 primerini takiben fU3/fU5 üniversal primeri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-17: Taşıma denemesinde kullanılan *P. striatus* bireyleri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: '*Ca. Phytoplasma prunorum*'; AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontroller. W: Su kontrol

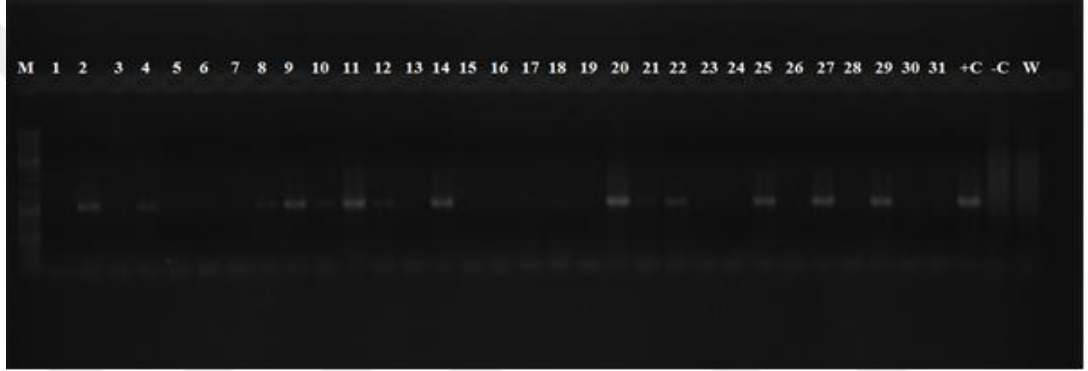


Şekil 4.29. *P. striatus* bireyleri ile sağlıklı kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinin P1P7 primerini takiben F1B6 ve M1M2 üniversal primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-17: Taşıma denemesi kurulan kiraz bitkileri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: '*Ca. Phytoplasma prunorum*'; AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontroller. W: Su kontrol

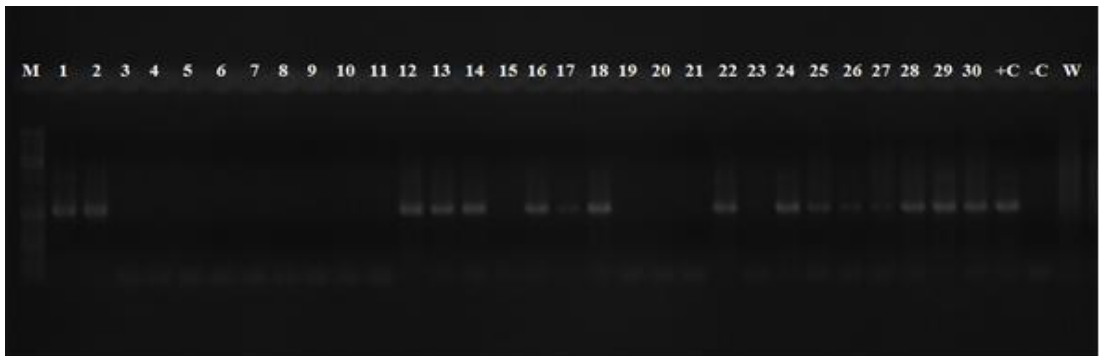
Taşıma denemesinde kullanılan Cicadellid bireylerle kurulan taşıma denemesinde bireyler ölür ölmez hemen alınmış ve DNA ekstraksiyonlarını takiben Nested PCR analizlerine tabi tutulmuşlardır. Taşıma denemesi böcekleri direkt PCR'da P1/P7 nested PCR'da ise F1B6 ve ardından M1M2 üniversal primerleri kullanılarak testlenmiştir. Elde edilen fitoplazma izolatlarının hangi gruba ait olduğunu belirlemek için I., III. ve X. Gruplara spesifik primerler kullanılarak yapılan nested-PCR analizlerinde gerek taşıma denemesindeki böcekler gerekse taşıma denemesi yapılan bitkilerde sadece I. Gruba spesifik primerlerle beklenen 1100 bp seviyesinde bant elde edilmiştir (Şekil 4.30, 4.31, 4.32).



Şekil 4.30. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinden toplanan Cicadellid türler P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-31: Taşıma denemesinde kullanılan Cicadellid böcekler; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Su kontrol



Şekil 4.31. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesi bitkilerinin P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-31: Taşıma denemesi bitkileri, M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol

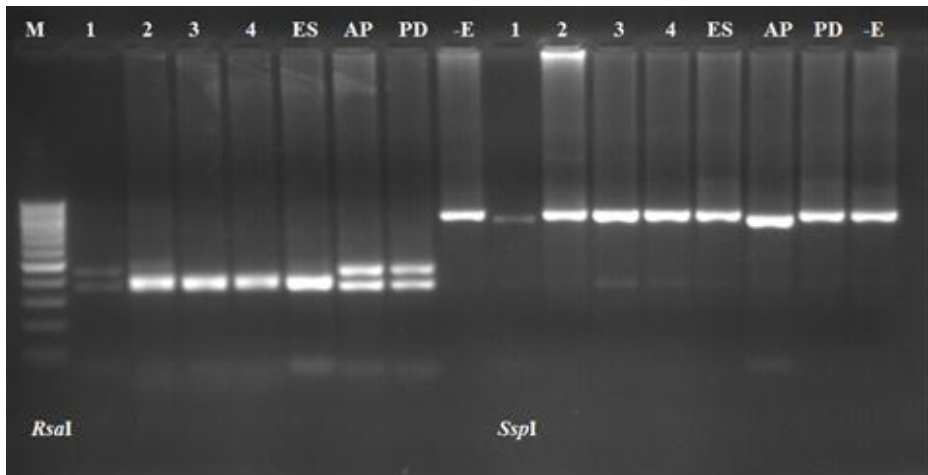


Şekil 4.32. Kiraz bitkilerine kurulan taşıma denemesinde kullanılan bitki ve böceklerin P1P7 primerini takiben I. Gruba spesifik R16IF1/R1 primerleri kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-20: Taşıma denemesi bitkileri, 21-30: Taşıma denemesinde kullanılan böcekler; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), +C: Aster yellows fitoplazma pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol

Sağlıklı kiraz bitkileriyle kurulan taşıma denemelerinde taşıma yapıldıktan bir yıl sonra yapılan PCR testlemelerinde bitkilerin I. Gruba spesifik fitoplazma ile enfekteli bulunması yanında taşımada kullanılan böceklerde de aynı fitoplazma bulunmuştur. Araziden toplanan böcek türlerinin ve sağlıklı kiraz bitkilerinde aynı fitoplazma ile enfekteli bulunması taşımanın başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. I. Gruba spesifik primer çifti kullanılarak yapılan nested-PCR analizlerinde testlenen tüm böceklerde 16SrI grup fitoplazma ile %18.18 oranında enfeksiyon saptanmıştır.

4.5. RFLP analizi

Universal primerlerle yapılan Nested-PCR analizlerinde fitoplazma pozitif bulunan kiraz örneklerinin PCR ürünleri RFLP analizleri için *RsaI* ve *SspI* restriksiyon endonükleazlarla kesilmişlerdir. RFLP analizine tabi tutulan 4 kiraz örneğinden 3 tanesi armut yıkım fitoplazması (Pear decline, *Ca. Phytoplasma pyri*), 1 tanesi Avrupa Sert Çekirdekli meyve fitoplazması (European Stone Fruit Yellows, *Ca. Phytoplasma prunorum*) ile enfekteli bulunmuştur (Şekil 4.32). Sert çekirdekli meyve ağaçlarında *Ca. P. pyri* ve *Ca. P. prunorum* enfeksiyonları daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Mehle ve ark., 2007).



Şekil 4.33. Kahramanmaraş ilinden toplanan kiraz örneklerinin P1P7 primerini takiben fU3/fU5 üniversal primer çifti kullanılarak yapılan nested-PCR analizleri sonucu elde edilen fitoplazma izolatlarının *RsaI* ve *SspI* enzimleri kullanılarak yapılan RFLP analizlerinin agaroz jel görüntüsü. 1-4: Kiraz bitkileri; M: Lambda DNA DNA ladder (MBI Fermentas), ES: '*Ca. Phytoplasma prunorum*'; AP: '*Ca. Phytoplasma pyri*'; PD: '*Ca. Phytoplasma mali*' pozitif kontroller. -E: Enzim içermeyen negatif kontrol

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Türkiye’de meyveciliğin çok eski dönemler dayandığı bilinmektedir. Sahip olduğu ekolojik koşullardan dolayı pek çok meyve türünün gen merkezidir. Kiraz ağaçlarındaki fitoplazma hastalıklarının önemli verim kayıplarına ve meyve kalitesinde azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir. Bazı fitoplazmalar meyve ağaçlarında simptom oluşturmadığından sinsi yayılabilmektedir. Bu nedenle kiraz ağaçlarında fitoplazma hastalıklarının erken ve doğru teşhis edilmesi son derece önemlidir. Fitoplazmaların bitki içindeki ve mevsimsel dağılımı düzensiz olduğundan dolayı, patojenin teşhisinde oldukça sorun yaşanmaktadır. Yapılacak doğru ve erken teşhis sonucunda fitoplazmaların sağlıklı bitkilere yayılması önlenecek ve meydana getireceği ekonomik kayıplar azaltılacaktır. Bu çalışma kapsamında, Kahramanmaraş ilinde yetiştirilen kiraz ağaçlarındaki fitoplazmaların varlığının PCR-RFLP analizleri ile belirlenmiş, testlenen kirazlarda fitoplazma enfeksiyon oranı %9.61 olduğu ve bu fitoplazmaların 16SrX. gruba ait olduğu belirlenmiştir. Bu oran sağlıklı aşı gözü kullanılması ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Testlenen az sayıdaki vişne ve yabancı ot örneklerinde herhangi bir fitoplazma saptanamamıştır.

Kiraz bahçelerinden toplanan *Cicadellidae* familyasına giren böceklerin bünyesinde fitoplazma enfeksiyon oranı %15.95 olarak belirlenmiş olup toplanan en yaygın türler olan *Psammotettix provincialis* bireylerinin bünyesinde fitoplazma bulunma oranı %56.73 iken *Psammotettix striatus* bireylerinde bu oran %16.49 olarak belirlenmiştir. Fitoplazmaların gerek aşı gözüyle gerekse vektör böceklerle etkin olarak taşındığı bilindiğinden temiz fidan kullanımının hastalık kontrolünde yeterli olmadığını göstermektedir.

Taşıma denemesi kurulan 10 adet kiraz bitkisinin 7 adedinin fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Taşıma denemesinde kullanılan *Psammotettix striatus* bireylerinin bünyesinde fitoplazma enfeksiyon oranı %18,43 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışma kapsamında Kahramanmaraş ilinde kiraz yetiştirilen alanlardaki fitoplazmalar, vektörleri belirlenmiş olup, etmen ve vektörüyle etkin mücadele olanaklarının yapılması için gerekli önlemlerin ivedilikle alınması gerekmektedir.

Ülkemizde kiraz yetiştiriciliğinde sağlıklı olmayan bitki materyallerinin kullanılması, sertifikasyon programlarına önem verilmemesi, kontrolsüz fidan ithalatının yapılması ve fidan üretim merkezlerinin kontrollerinin düzenli yapılmaması fitoplazma hastalıklarının yayılmasını uygun hale getirmektedir. Bu yüzden ülkemizde sanitasyon ve sertifikasyon programlarının en kısa zamanda başlatılarak tehlike arz eden fitoplazma hastalıklarının yayılmasının engellenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Altan, B. 2009. "Mersin ili kayısı damızlık parselinde ve bazı üretici bahçelerinde Avrupa sert çekirdekli sarılık sitoplazması (*Candidatus* Phytoplasma puronum) hastalığının moleküler yöntemlerle terslenmesi", **Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, p.
- Anonim, 2016. "TÜİK, Tarımla Yapı, Üretim, Fiyat, Değer".
- Anonim, 2017. "TÜİK, Tarımla Yapı, Üretim, Fiyat, Değer".
- Baric, S, & Dalla, V.J. (2004), "A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay", **Journal of Microbiological Methods**, vol. 57, pp.135-145.
- Bertaccini, A., & Duduk, B., (2010), "Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research", **Phytopathologia Mediterranea**, vol. 48, issue 3, pp.355-378.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., Contaldo, N., 2014. "Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture", **American Journal of Plant Sciences**, 2014, 5, 1763-1788
- Bertaccini, A. 2007. "Phytoplasmas, diversity, taxonomy, and epidemiology", **Frontiers of Bioscience**, 12, 673-689.
- Botti, S. & Bertaccini, A., (2006), "Phytoplasma infection through seed transmission: further observations", 16 th Congress IOM, 9-14 July, **Cambridge, UK**, pp.76-113.
- Brooks, D.S, Gonzalez, D.N., Appel, D.N. and Filer T.H. 1994. "Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt", **Biol Control**, 4, 373–381.
- Bulgari, D., 2010. "Phytoplasma-Endophytes Interactions: The Case Study of Grapevine Yellows Recovery" (Doktora tezi), **Universita' Degli Studi Di Milano, Facolta Di Agraria**.
- Bulgari, D., Bozkurt, İ.A., Casati, P., Çağlayan, K., Quaglino, 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**, 102, 677–687.
- Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., Bianco, P.A. 2011. "Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. Plants", **Appl Environ Microbiol**, 77, 5018–5022.
- Calari, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Sakaliova, D., Mori, N., Duduk, B. & Bertaccini, A. (2011), "Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings", **Bulletin of Insectology**, vol. 64, pp.157-158.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schultz, A., (2004), "Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging", **Molecular Plant–Microbe Interactions**, vol. 17, pp.1175-1184.
- Chung, B.N. & Jeong, M.I. (2014), "Identification of "stolbur" phytoplasmas in *Petunia hybrida* seedlings", **Phytopathogenic Mollicutes**, vol. 4, issue 1, pp.5-8.
- Cieslinska, M., 2011. "Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees", **Journal of Plant Protection Research**, 51, 4, 435-440.

- Çağlayan, K., Gazel, M., 1999. "Primary studies for viroid and phytoplasma problems of stone fruits in East Mediterranean Area of Turkey", **Journal of Plant Pathology**, 83 (1), 45-49.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Ulubaş, Ç., Ember, I., 2004. "Doğu Akdeniz Bölgesindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında Avrupa sert çekirdekli meyve ağacı sarılığı (European stone fruit yellows=ESFY) fitoplazmasının yaygınlık durumunun PCR/RFLP yöntemleriyle saptanması", **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 8-10 Eylül 2004, Samsun, p 141.
- Danet, J.L., Balakishiyeva G., Cimerman A., Sauvion N., Marie-Jeanne V., Labonne G., Lavina A., Battle A., Krizanac I., Skoric D., Ermacora E., Ulubaş Serce Ç., Çağlayan K., Jarausch W and Foissac X., 2011. "Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter species recombination", **Microbiology**, 157, 438-450.
- Davis, R.E., Lee, I.M., 1993. "Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16SrDNA sequences for detection and identification of mycoplasma like organisms", **Phytopathology**, 83, 1008-1011.
- Deng, S, Hiruki, C., 1991. "Genetic relatedness between two non-culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction", **Phytopathology**, 81, 1475-1479.
- Dickinson, M., & Hodgetts, J. (2013), "Phytoplasma methods and protocols", New York: Humana Press, The University of Nottingham, **Nottingham, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland**.
- Doi Y., Teranaka, M., Yora, K., 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 pawlownia witches broom", **Ann. Phytopath Soc. Japan** 33,259-266.
- Gao, R., Wang, J., Zhao, W., Li, X.-D., Zhu, S.-F., Hao, Y.-J., 2011. "Identification of a Phytoplasma Associated with Cherry Virescence in China". **J. Plant Pathol.**, 93, 2.
- Gibbs, K.S., Padovan A.C., Mogen B.A., 1995. "Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other species growing in Northern Australia", **Phytopathology**, 85, 169-174.
- Goidànich, G. 1934. "La leptonecrosi dei ciliegi e degli albicocchi", **Boll. Staz. Pat. Veg.** 14, 531-540.
- Gundersen, D.E. Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E. and Kingsbury, D.T., 1994. "Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification", **Journal of Bacteriology**, 176, 5244-5254.
- Holliday, P., 1989. "A dictionary of plant pathology", **Cambridge University Press, Cambridge**.
- IRPCM. (2004), "Candidatus Phytoplasma", a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 54, pp.1243-1255.
- Ivanauskas, A., Valiūnas, D., Jomantienė, R., Picciau, L., Davis, R.E., 2014. "Possible insect vectors of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and 'Ca. Phytoplasma pruni'-related strains in Lithuania", **Zemdirbyste-Agriculture**, 101, 3, 313-320.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M., Mohns, M., and Dosba, F., 2000. "Susceptibility and tolerance of new French Prunus domestica cultivars to

- European stone fruit yellows phytoplasmas”, **Journal of Phytopath.**, 148, 489-493.
- Jomantiene, R., Yao Z., Lee I.M., Davis R.E. 2011. “Phytoplasmas infecting sour cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phytoplasma”, **Eur. J. Plant Pathol.**, 130, 1, 97–107.
- Kaminska, M., & Korbin, M. (1999), “Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts”, **Acta Physiologiae Plantarum**, vol. 21, issue 1, pp.21-26.
- Khan, A. J., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, A. M. & Bertaccini, A. (2002), “Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds?” **XIII Congress IOM, July 07-12, Vienna**, pp.6.
- Kirkpatrick B.C., Uyemoto J.K., Purcell A.H. 1995. “X disease”. p. 57–58. In” “Compendium of Stone Fruits Diseases” (J.M. Ogawa, E.I. Zehr, G.W. Bird, D.F. Richie, K. Uriu, J.K. Uyemoto, eds. APS Press, St. Paul, MN, USA, 128 pp.
- Krizanac, I., Mikec, I., Budinscak, Z., Seruga Musi, M., Skoric, D., 2010. “Diversity of Phytoplasmas Infecting Fruit Trees and Their Vectors in Croatia”, **Journal of Plant Diseases and Protection**, 117, 5, 206–213.
- Lee, I.M., and Davis, R.E., Chen, T.-A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., and Schaff, D.A., 1992. “A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster”, **Phytopathology**, 82, 977-986.
- Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E. and Gundersen, D.E. 1993. “Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms”, **Phytopathology**, 83, 834-842.
- Lee, I.M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E. 1994. “Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant”, **Phytopathology**, 84, 6, 559–566.
- Lee, I.M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D.E., 1995. “Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy”, **Phytopathology**, 85, 728-735.
- Lee, I.M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. “Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences”, **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48, 1153-1169.
- Lee, I.M., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E. 2000. “Phytoplasmas, phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**”, 54, 221-255.
- Lorenz, K.H., Scheiner B. Ahrens U., Seemüller E., 1995. “Detection of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA”, **Phytopathology**, 85, 771-776.
- Ludvikova, H., Franova, J., Sucha, J., 2011. “Phytoplasmas in apricot, peach and sour cherry orchards in East Bohemia, Czech Republic”, **Bulletin of Insectology**, 64 (Supplement), 67-68.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovic, N., Gruden, K., Dreo, T., Zezlina, I., Seljak, G. and Ravnikar, M. 2007. “First report of *Candidatus*

- Phytoplasma mali in *Prunus avium*, *P. armenica* and *P. domestica*”, **Plant Pathology**, 56, 721.
- Navrátil M., Válková P., Fialová R., Petrová K., Fránová J., Nebesářová J., Poncarová-Voráčková Z., Karešová R. 2001. “Survey for stone fruit phytoplasmas in Czech Republic”, **Acta Hortic.**, 550, 377–382.
- Nemeth M., 1986. “Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees”, Martinus Nijhoff Publishers, **The Netherlands and Akademi Kiado, Hungary**.
- Padovan, A.C., Gibb, K.S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, R.E., Magarey, P.A., Sears, B.B., 1995. “Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with a grapevine yellows phytoplasma from Emilia-Romagna in Italy”, **Australian Journal of Grape and Wine Research**, 1, 25-31.
- Paltrinieri, S., Martini M., Stefani E., Pondrelli M., Fideghelli C., Bertaccini A. 2001. “Phytoplasma infection in peach and cherry in Italy”, **Acta Hortic.**, 550, 365–370.
- Paltrinieri, S., Bertaccini A., Lugaresi C. 2008. “Phytoplasmas in declining cherry plants”. **Acta Hortic.**, 781, 409–416.
- Prince, J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R., Barba M., 1993. “Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs”, **Phytopathology**, 83, 1130-1137.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C. and Seemüller, E. 1993. “Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA”, **Journal of General Microbiology**, 139, 519-527.
- Seemüller, E., Schaper, U., & Zimbelmann, F. (1984), “Seasonal variations in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline”, **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection**, vol. 91, pp.371-382.
- Sertkaya, E. 2005. “Doğu akdeniz Bölgesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında sorun olan fitoplazma kökenli hastalıkların yaygınlığının, böcek vektörlerinin belirlenmesi ile bunların populasyon gelişmesi ve vector etkinliğinin araştırılması”, **TUBİTAK-TOGTAĞ-3205 (2003-2005) proje raporu**.
- Sertkaya, G., Martini, M., Osler, R., 2008. “First report of *Candidatus Phytoplasma mali* in Turkey”, **Journal of Plant Pathology**, 90, 1, 143-149.
- 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 16S-23SrRNA spacer region”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 62, 2988-2993.
- Steenwyk Van, R.A., Kirkpatrick, B.C., Purcell, A.H., Fouche, C.F., Grant, J.A. and Uyemoto, J.K. 1995. “Evaluation of an abatement program for western X-disease in sweet cherry”, **Plant Disease**, 79, 1025–1028.
- Sugio, A., Kingdom, H.N., MacLean, A.M., Grieve, V.M. & Hogenhout, S.A. (2011), “Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis”, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 108, pp.1254-E1263.

- Suslow, K.G. and Purcell, A.H., 1982. "Seasonal transmission of X-disease agent from cherry by leafhopper *Colladonus montanus*", **Plant Disease**, 66, 28–30.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Caglayan, K., Bas, M., Son, L., 2006. "Phytoplasma Diseases of Fruit Trees in Germplasm and Commercial Orchards in Turkey", **Journal of Plant Pathology**, 88, 2, 179-185.
- Ulubaş Serçe, Ç., Yvon, M., Kaya, K., Gazel, M., Can Cengiz, F., Çağlayan, K., Sauvion, N., 2011. "Survey on the presence of *Cacopsylla pruni* in Turkey: preliminary results", **Bulletin of Insectology**, 64 (Supplement), 145-146.
- Uyemoto, J.K., Kirkpatrick, B.C. and Cummins, J.N. 1991. "Susceptibility of selected cherry clones and related species to Western X-disease". **Hort. Science** 26, 1510–1511.
- Valiūnas, D., Jomantiene R., Davis R.E. 2009. "Establishment of a new phytoplasma subgroup, 16SrI-Q, to accommodate a previously undescribed phytoplasma found in diseased cherry in Lithuania", **J. Plant Pathol.**, 91, 1, 71–75.
- Varga, K., Kólber M., Ember I., Erdős Z., Biró E., Paltrinieri S., Martini M., Bertaccini A. 2001. "Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary", **Acta Hort.**, 550, 383–388.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C. and Foresti, F. 2003. "Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales", **Hereditas**, 138, 161–165.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.-M. and Zhao, Y. 2007. "Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, 1855-1867.
- Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R.E., Suo, X. and Zhao, Y. 2008. "Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58, 2368-2377.
- Weisburg, W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., 1989. "A phylogenetic analysis of ycoplasmas: basis for their classification", **Journal of Bacteriology**, 171, 6455-7467.
- Zhang, Y., Uyemoto, J.K., & Kirkpatrick, B.C., (1998), "A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay", **Journal of Virological Methods**, vol. 71, pp.45-50.
- Zhu, S.F., Hadidi A., Gundersen D.E., Lee I.M., Zhang C.L. 1998. "Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches' broom in China", **Acta Hort.**, 472, 701–714.
- Zirak, L., Bahar M., Ahoonmanesh A. 2010. "Characterization of phytoplasmas related to 'Candidatus Phytoplasma asteris' and peanut WB group associated with sweet cherry diseases in Iran", **J. Phytopathol.**, 158, 6, 63–65.
- Zreik, L., Carle P., Bové J.M., Garnier M. 1995. "Characterization of mycoplasma-like organisms associated with witches' broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia', **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 45, 3, 449–453.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1992 yılında Hatay ili Antakya ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu Antakya'da Ayşe Fitnat ilköğretim okulunda, Lise eğitimini Mustafa Gencay lisesinde tamamladı. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma bölümünü kazandı ve 2014 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2015 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



EKLER

TNES BUFFER(pH 7.5) (100 ml)

5 ml 1M Tris(pH 7.5)
8 ml 5M NaCl
20 ml 0.5 M EDTA
5 ml 10% SDS
62 ml dH₂O

% 10 SDS(Sodium Dodecyl Sulfat)

10 gr Sodium Dodecyl Sulfat
100 ml dH₂O' ya tamamla

0,5 mM EDTA

1M 1 lt 372,2 gr EDTA
0,5 M 1lt 186,1 gr EDTA

AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1992)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24.2 g

Çözelti 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0.5X TAE 200 ml

Ethidium bromide 200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

1 gr agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenmiştir (15-20 dakika). 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.