



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

MERSİN İLİ KAYISI DAMIZLIK PARSELİNDE VE BAZI ÜRETİCİ
BAHÇELERİNDE AVRUPA SERT ÇEKİRDEKLİ SARILIK
FİTOPLAZMASI ("*Candidatus Phytoplasma prunorum*")
HASTALIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ

BÜLENT ALTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY
AĞUSTOS -2009



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

MERSİN İLİ KAYISI DAMIZLIK PARSELİNDE VE BAZI ÜRETİCİ
BAHÇELERİNDE AVRUPA SERT ÇEKİRDEKLİ SARILIK
FİTOPLAZMASI ("*Candidatus* Phytoplasma prunorum")
HASTALIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ

BÜLENT ALTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

AĞUSTOS -2009

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MERSİN İLİ KAYISI DAMIZLIK PARSELİNDE VE BAZI ÜRETİCİ
BAHÇELERİNDE AVRUPA SERT ÇEKİRDEKLİ SARILIK FİTOPLAZMASI
("Candidatus Phytoplasma prunorum") HASTALIĞININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ

BÜLENT ALTAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 05/08/2009 Tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

.....
Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN Başkan Yrd.Doç.Dr. Coşkun DURGAÇ Üye Yrd.Doç.Dr. Mona GAZEL Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır

Kod No:

Prof.Dr. Bünyamin YILDIZ
Enstitü Müdürü V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, Çizelgelerin, Şekil ve Fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Yurt dışında Yapılan Çalışmalar.....	4
2.2. Yurt İçinde Yapılan Çalışmalar.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1. Bitki Materyallerinin Toplanması ve Muhafazası.....	10
3.2.2. Moleküler Testler.....	11
3.2.2.1. Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	11
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Testleri.....	11
3.2.2.3 Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Analizi.....	12
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	13
4.1. Arazi Gözlemleri.....	13
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sonuçları.....	15
4.3. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Sonuçları.....	21
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	26
KAYNAKLAR.....	28
TEŞEKKÜR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	32
EKLER.....	33
EK.1	33
EK.2	34

ÖZET

**MERSİN İLİ KAYISI DAMIZLIK PARSELİNDE VE BAZI ÜRETİCİ
BAHÇELERİNDE AVRUPA SERT ÇEKİRDEKLİ SARILIK FİTOPLAZMASI
("Candidatus Phytoplasma prunorum") HASTALIĞININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TESTLENMESİ**

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

Bu çalışma sonucunda kaysılar için önemli bir gen kaynağı olan ABKAE’de bulunan ve bölge için aşı gözü kaynağı olarak kullanılan bitkiler bir karantina patojeni olan ASSF’ye karşı testlenmiş ve pozitif bulunanların imha edilmesi önerilmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında Mersin’deki semptom göstermeyen kayısı ağaçlarında da ASSF’nin yaygın olduğu ve bu latent enfeksiyonların moleküler yöntemlerle saptanabileceği ortaya konmuştur. Böylece sertifikasyon çalışmalarında bu önemli patojene karşı semptom göstermeyen bitkilerin de testlenmesinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kayısı, Mersin, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, PZR-RFUP.

ABSTRACT

TESTING OF APRICOT GERMPLASM and SOME PRIVATE ORCHARDS IN MERSİN PROVINCE FOR EUROPEAN STONE FRUIT YELLOWS PHYTOPLASMA ("*Candidatus* Phytoplasma prunorum") BY MOLECULAR TESTINGS

This study was conducted during 2007-2009 and apricot samples, collected from mother block of Alata Horticulture Research Center (ABKAE) and Mut-Mersin, were tested for European Stone Fruit Yellows Phytoplasma ESFY ("*Candidatus* Phytoplasma prunorum") by molecular techniques. When 112 plant samples were tested by PCR-RFLP, ESFY was detected both symptomatic and asymptomatic samples and infection rate was 8.035%. Field survey results showed that only one plant in Alata exhibits typical phytoplasma symptoms like severe leaf rolling.

In this study some apricot cultivars which were used as important budwood source, growing in important gen center (ABKAE) were tested against important quarantine pathogen, ESFY and eradication of infected trees was recommended. In addition to that ESFY was detected on asymptomatic trees growing in Mersin province by molecular testing. It was also pointed out that testing of asymptomatic plants for certification programme is very important.

Key words: Apricot, Mersin, *Candidatus* Phytoplasma prunorum, PCR-RFLP.

2009, 41 pages

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
AP	Apple proliferation
ASSF	Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması
bp	Baz Çifti (base pair)
°C	Santigrat Derece
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTB	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
d ₂ H ₂ O	Çift Destile Su
EÇSF	Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması
ESFY	European Stone Fruit Yellows Phytoplasmas
EtBr	Etidyum Bromid
EDTA	Ethylenediamintetraacetic Acid
g	Gram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Soydum Klorür
µl	Mikrolitre
PD	Pear Decline (Armut Yıkım Fitoplazması)
pmol	Piko Mol
PLN	Prunus Lepto Nekroz
RFUP	Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolution Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
UV	Ultraviyole

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Denemede kullanılan çeşitler ve örnekleme yerleri	9
Çizelge 3.2 Universal ve Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması (EÇSF) grubuna spesifik primer çiftleri	10
Çizelge 4.1 Mersin Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) ve Mut ilçesinden toplanan farklı kayısı çeşitlerinin Nested-PZR sonuçları	15
Çizelge 4.2 Kayıslarda çeşit bazında Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması (ASSF) enfeksiyon oranları	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1 Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı koleksiyon parselinden genel görünüş	14
Şekil 4.2 ABKAE ve Mut bölgesinde bulunan ticari bir bahçedeki yaprak kıvrılması simptomu	15
Şekil 4.3 Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden toplanan kayısı örneklerinin FU5/rU3 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri	19
Şekil 4.4 Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve Mut'dan toplanan kayısı örneklerinin FU5/rU3 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri	20
Şekil 4.5 Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve Mut'dan toplanan kayısı örneklerinin F01-R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri	20
Şekil 4.6 FU5/rU3 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin <i>RsaI</i> enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri	21
Şekil 4.7 FU5/rU3 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin <i>SspI</i> enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri	22
Şekil 4.8 F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin <i>BfmI</i> enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri	23
Şekil 4.9 F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin <i>SspI</i> enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri	23
Şekil 4.10 F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin <i>BsaI</i> enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri	24

1. GİRİŞ

Botanik adı *Prunus armeniaca* L. olan kayısı; Rocaceae Familyası, Prunoideae alt familyasının *Prunus* L. cinsinin Prunophora (Neck) Focke alt cinsinin, Armeniaca (Mill.) Koch, bölümüne aittir (Rehder, 1940). Tür sayısı taksonomistlere bağlı olarak 3–10 arasında değişmektedir.

Dünya yaş kayısı üretimi 2,5–2,8 milyon ton arasındadır. Dünyada kayısı üretimi daha çok Akdeniz'e komşu ülkelerde yoğunlaşmıştır. Türkiye'nin dışında; İspanya, İtalya, Fransa, Yunanistan, Fas ve Cezayir'de önemli miktarda kayısı üretimi yapılmaktadır. Diğer kayısı üretici ülkeler; Bağımsız Devletler Topluluğu, İran, Pakistan, Çin, A.B.D, Avustralya ve Güney Afrika Cumhuriyeti'dir. Bu ülkelerden Fransa, İtalya, İspanya ve Yunanistan sofralık, Türkiye, İran, Pakistan, Avustralya, Cezayir, Fas ve Güney Afrika Cumhuriyeti'nde ise kurutmalık ve sofralık amaca yönelik üretim ön plandadır (Asma ve Birhanlı, 2004).

Ülkemizde Kayısı, nispi nemin çok yüksek olduğu Karadeniz sahilleri ve kışları çok soğuk geçen Doğu Anadolu Bölgesinin bazı kesimleri dışında, Türkiye'nin hemen her yerinde yetişmektedir. Sert çekirdekli meyveler grubunda yer alan kayısı, kiraz, vişne, şeftali-nektarin ve erik türlerinin 2006 yılı ülkemiz toplam üretimi 1.659.126 ton olup, en büyük pay 552.775 ton ile şeftali-nektarin türlerine aittir. Bunu kayısı (460.182 ton), kiraz (310.254 ton), erik (214.416 ton) ve vişne (121.499 ton) izlemektedir. Kayısı üretiminde Türkiye dünyada ilk sırada yer almaktadır (Anonymous, 2008).

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

(MBO) olarak adlandırılan fitoplazmalar ilk kez 1967 yılında Doi ve ark. tarafından bildirilmiştir (Lee ve ark., 1992).

Fitoplazmalar iki tip nükleik asit içermekte (DNA ve RNA) ve virüsler ile bakteriler arasında bir ara form oluşturmaktadır. Bakterilerden farklı olarak sert hücre duvarına sahip değildirler, bitkilerin floem iletim demetinde bulunurlar ve kültüre alınmazlar. Fitoplazmalar prokaryot canlıların *Mollicutes* sınıfında yer alırlar ve dünyadaki pek çok sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerde yıkıcı hastalıklara neden olurlar. Sert çekirdekli meyve ağaçlarından özellikle kayısı ve erikte sorun olan *Candidatus Phytoplasma prunorum* (Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı =ASSF, European Stone Fruit Yellows=ESFY)'un neden olduğu kayıplar 1924 yılında Chabrolin tarafından Fransa'da, daha sonraları da İtalya'da Japon eriklerinde bildirilmiştir. Ancak bu yıkımlara neden olan etmenin fitoplazma olduğu 1973'lerde Norvan ve ark. tarafından fitoplazma etiyojisi açıklandığında anlaşılmıştır (Nemeth, 1986). Son zamanlarda patojenin korunmuş genlerini içeren 16SrDNA'sının bazı dizilerinin tayin edilmesi ve RFLP analizlerini içeren moleküler çalışmalar Avrupa'da sert çekirdekli meyve ağaçlarında enfeksiyon yapan ve farklı isimlerle anılan hastalıklara sebep olan fitoplazmaların genetik olarak birbirlerine çok benzer olduklarını ortaya koymuş ve bu nedenle yukarıda değinilen belirtilere sebep olan etmene Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması (ASSF) adı verilmiştir (Lorenz ve ark., 1994; Kison ve ark., 1997). ASSF fitoplazması genç kayısı ağaçlarını sistemik olarak hastalandırabileceği gibi 5 yaşından büyük ağaçlarda bölgesel semptomlara da neden olabilmektedir. Bu tür ağaçlarda ilk semptomlar alt dallarda gözlenmekte ve zamanla tüm ağaç tacına yayılmaktadır. Erken tomurcuk patlaması ve yaprak oluşumu hastalığın en belirgin semptomudur, ayrıca yaprak kıvrılmaları, renklenme bozuklukları, sürekli yapraklanma, floem nekrozu ve geriye ölüm meydana gelmektedir. Enfekteli ağaçlar ilk semptomların görülmesinden sonra uzun süre yaşamaz. 15 yaşından küçük ağaçlar bir yıl içinde ölür, 15 yaşından büyük ağaçlar ise genellikle enfektelenmezler veya enfeksiyon birkaç dalda sınırlı kalır. ASSF'ye tolerant erik anaçlarına aşılanan kayısı ağaçlarında geriye ölüm yavaştır ve etmen kademeli olarak daldan dala yayılır.

ASSF'nin ülkemizdeki varlığı yapılan sınırlı çalışmalarla Marmara ve Doğu Akdeniz bölgelerinde tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark. 2004; Sertkaya ve ark. 2005; Ulubaş-Serçe ve ark. 2006). Hastalığın yayılmasını önlemek için iç ve dış karantina

önlemlerine dikkat edilmesi, eradikasyon ve özellikle gen kaynaklarımızın muhafaza edildiği bahçelerin bu hastalık açısından düzenli olarak testlenmesi çok önemlidir.

Bu çalışmanın amacı kaysılar için önemli bir gen kaynağı olan Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE)'de bulunan ve bölge için aşı gözü kaynağı olarak kullanılan bitkilerle birlikte aynı bölgede bulunan bazı verimsiz ağaçların kıyaslamalı olarak ASSF'ye karşı Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFUP) yöntemiyle testlenmesi ve çeşitler bazında ASSF yaygınlık oranlarının araştırılmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Fitoplazma nedeniyle sert çekirdekli meyve ağaçlarında ciddi verim kayıplarının olduğu Chabrolin tarafından 1924 yılında Fransa'da kayısı ağaçlarında, daha sonraları da İtalya'da Japon eriklerinde bildirilmiştir. Ancak bu yıkımların etmeninin fitoplazma olduğu 1973'lerde Norvan ve ark. tarafından fitoplazma etiyojisi açıklandığında anlaşılmıştır (Nemeth, 1986).

Daha önceleri mikoplazma olarak adlandırılan fitoplazmalar ilk kez 1967 yılında Doi ve ark. tarafından bildirilmiştir (Lee ve ark., 1992).

Sert çekirdekli meyve ağaçlarının ASSF fitoplazmasına karşı duyarlılığı farklılık göstermektedir. Kayısı, japon eriği ve şeftali *P. cerasifera* (Myrobalan) üzerine aşılandıklarında, GF 8/1 (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*) anacına aşılı olma durumlarından daha hassas olmakta ve *P. domestica* genotipleri daha az etkilenmekte, bu anaçlar üzerine aşılanan kayısılar infeksiyonlara anacın hassasiyetine göre reaksiyon göstermektedir (Desvignes ve Cornaggia, 1982; Guinchedi ve ark., 1982; Audergon ve ark., 1991; Dosba ve ark., 1991).

Jarausch ve ark. (1998), Fransa'da sert çekirdekli meyve ağaçlarının yetiştirildiği esas alanların büyük kısmını temsil eden bahçelerden aldıkları 139 örneğin 114'ünde ASSF fitoplazmasını tespit etmişlerdir. Tipik ASSF simptomsu gösteren ağaçların %95'inde, simptomsu göstermeyen ağaçların ise %51'inde ASSF saptanmıştır.

Carraro ve ark. (1998; 2001) ile Jarausch ve ark. (2001), etmenin aşı ile taşındığı gibi bir Psillid türü olan *Cacopsylla pruni* Scopoli ile de persistent olarak taşındığını bildirmiştir.

Carraro ve ark. (1998), erik leptonekroz (PLN=ESFY)'un epidemik olduğu kuzey İtalya'da Myrobalan B anacı üzerine aşılanmış Ozark Premier ve Shiro ASSF'ye yüksek derecede hassas olduğunu, 7 yıl içerisinde ağaçların tamamının doğal olarak enfektelendiğini bildirmişlerdir. Bu iki çeşit arasında Ozark Premier çeşidinde yüksek orandaki (%77) ölümler nedeniyle bu çeşidin PLN'ye daha hassas olduğu, Shiro çeşidinin ise ASSF simptomsu göstermesine rağmen hayatta kaldığını ve normal ürün verdiğini rapor etmişlerdir.

Balan ve ark. (1999), 1990-95 yılları arasında Romanya'da yürüttükleri bir çalışmada 67 kayısı çeşidi ve 1831 kayısı hibridinin fitoplazma enfeksiyonuna karşı reaksiyonlarını incelemiştir. Mayıs ve Haziran aylarında yaptıkları gözlemlerde fitoplazma semptomlarını 0-5 skalasına göre değerlendirmişlerdir. Kanada 600023, Harleyne, Dacia, Comandor, Litoral, Earlyril çeşitlerinin hiçbir fitoplazma semptomu göstermediğini ('0' değeri aldığını) bildirmişlerdir.

Jarausch ve ark. (1999), Fransa'da 2 Japon eriği ile yaptıkları çalışmada ASSF'nin mevsimsel yoğunluğunu gözlemlemişler, temmuz ayından yaprak dökümüne kadar olan sürede enfeksiyonun sistemik olduğunu saptamışlardır. Mart ayına kadar olan dinlenme döneminde etmenin bulunduğunu, nisan ve mayıs ayındaki normal dönemde yetişen yapraklarda fitoplazmanın tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Davies ve Adams (2000), Güneydoğu İngiltere'de yaptıkları çalışmada ASSF'nin *Prunus* türü ağaçları enfekte ettiğini, hem ilkbaharda hemde sonbaharda aldıkları doku örneklerini PZR ve ışık mikroskopu yöntemini kullanarak teşhis etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmanın İngiltere'deki ASSF varlığını gösteren ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

Myrta ve ark. (2000), Arnavutluk'un 5 bölgesini kapsayan merkez ve güneydoğu Arnavutluk'ta yaptıkları çalışmada 3 kayısı, 1 myrobolan, ve 1 Japon erik çeşidinin ASSF ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir

Güney Avrupa'da ASSF fitoplazmasının kayısı (*Prunus armeniaca*), Japon eriği (*P. salicina* L.), Avrupa eriği (*P. domestica*) ve şeftalide (*P. persica* L.)'de hastalık oluşturduğu (Poggi-Pollini ve ark., 1993;1995; Jaraush ve ark. 1998); ayrıca *Prunus* anaçlarının da bu etmeden etkilendiğini bildirilmiştir (Jaraush ve ark., 1998; Kison ve Seemüller, 2001).

Laimer ve ark. (2001), Avusturya'nın 2 bölgesinden aldıkları bitki örnekleri Nested PZR yöntemi ile testlemiş ve kayısı ağaçlarının yüksek oranda ASSF ile bulaşıklılığını tespit etmişlerdir.

Poggi-Pollini ve ark. (2001), Kuzey İtalya'nın orta kesimlerinde şeftalide yürüttükleri bir çalışmada ASSF'nin tipik semptomlarını gözlemlemiş daha sonra PZR yöntemi ile teste tabi tutmuşlardır. Sonuç olarak gözlem yaptıkları bitkilerin %1-4 oranında enfekteli olduğunu tespit etmiş ve enfekteliliğin daha çok GF- 677 anacı kullanılan bitkilerde olduğunu bildirmişlerdir.

ASSF kültür bitkileri dışında Çakal eriği (*P. spinosa* L.) ve Süs eriği (*P. ceracifera* Ehrh.) gibi yabancı *Prunus* türlerinde (Carraro ve ark., 2002) ayrıca Fransa'daki enfekteli bahçelerin çevresindeki kuşburnu (*Rosa canina* L.), adi çitlenbik (*Celtis australis* L.) ve adi dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) gibi diğer yabancı bitkilerde de tespit edilmiştir (Jaraush ve ark., 2001).

Pastore ve ark. (2001), Myrobolan üzerine aşılı 3 yaşındaki 10 kayısı çeşidine ait (Buttianese, Harogem520, Colomer419, Sajeb351, Canini Tardio, Nennella, Baracca253, Amal349, Newjersy480, Brusca) toplam 40 fidana ve sağlıklı 3 japon eriği çeşidine (Black Amber, Ozark Premier, Sorrisso di Primavera) ASSF enfekteli Sungiant kayısı ağacından aldıkları gözleri yama aşı yöntemi ile aşılıyarak inokulasyonlar yapmışlardır. Araştırmacılar, bu bitkilerde 15 ay sonra yaptıkları testlerde ASSF'nin varlığı tespit etmiş ve aşı ile fitoplazmanın taşınmasının 10 kayısı çeşidinden 5'inde ve tüm erik çeşitlerinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Kison ve Seemüller (2001), ASSF fitoplazma ırklarının virülens durumlarındaki farklılıklar ve çeşitli anaçlar üzerindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarının bu patojene olan hassasiyetleri üzerine yaptıkları çalışmada, *P. domestica* stoklarından Ackermann's, Brompton ve P1275 ile *P. cerasifera* stoklarından Myrobolan üzerine aşılana ağaçlar az etkilenmiş, GF 677, GF8-1 ve *P. insititia* stoklarından St Julien A ve St Julien GF655/2 üzerine aşılı ağaçlarda daha fazla zarar olduğu bildirilmiştir. Myrobolan ve şeftali anacı Higama ve GF 305 orta derecede hassas; şeftali anaçlarından Montclar, Rutgers, Red Leaf ve Rubira, kayısı anaçlarından St Julien 2 üzerine aşılana ağaçlarda yüksek hassasiyet oluşturduğu rapor edilmiştir.

Lübnan'da yapılan bir çalışmada binlerce badem ağacında ASSF hastalığının hızlı yayılması nedeni ile 10 yıl içerisinde öldüğü bildirilmiş, hastalık Nested PZR yöntemi ile kolayca tespit edilmiştir (Jawdah ve ark., 2002).

Torres ve ark. (2004), İspanya'nın Barcelona bölgesinde yaptıkları çalışmada erik ve kayısı ağaçlarının bulunduğu bölgelerde survey yapmış ve 4 yıllık gözlem sonucunda kayısı çeşitlerinde yüksek oranda ASSF simptomlarının gözlendiğini, Japon eriklerinde ise her yıl %2'lik bir oranda artış ile yeni enfekte olan bitkilerin ortaya çıktığını bildirilmişlerdir. Bu gözlemlerden sonra alınan örnekler Nested PZR yöntemi ile testlenmiş, testlemede 16SrX grubu spesifik primerler kullanılmıştır. Yapılan testleme sonucunda simptom göstermeyen 69 örneğin %50'inin ASSF ile enfekteli

olduğu ortaya çıkmıştır. Bu alışma sonucunda ASSF semptomu göstermeyen bitkilerden sağlıklı olanlara yayılmasına devam ettiğini bildirilmişlerdir.

Landi ve ark. (2007), Kuzey İtalya’da erik deneme bahçesinde 16SrlIII-A ribozomal alt grubuna ait fitoplazmalar belirlemiş, aynı fitoplazmaları erik ağaçlarına asılmış sarı yapışkan tuzaklarla yakalanan “*Philaenus spumarius*” böceğinde tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yine aynı bölgede kiraz ağacında yaşayan “*Fiebertella flori*” böceğinde de fitoplazma tespit edilmiş, “*Cocopsylla pruni*” de ise bir kez etmen saptanmasına rağmen moleküler testlerde negatif sonuç alındığını bildirmişlerdir.

2.2. Yurt İçinde Yapılan alışmalar

Son yıllarda ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazmaların saptanması konusundaki çalışmalar oldukça yoğunlaşmış ve ilk semptomolojik bulgular ağlayan ve Gazel (1999) tarafından bildirilmiştir.

Jarausch ve ark. (2000), İzmir’den temin ettikleri bir adet Japon eriği (*Prunus salicina*)’da ASSF fitoplazmasını PZR-RFLP ile tespit etmişler ve bu tespitin ülkemizde ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

ağlayan ve ark. (2004), Doğu Akdeniz Bölgesi’nde 2003–2004 yıllarında yaptıkları srvey çalışmaları sonucunda toplam 174 sert çekirdekli meyve ağacından 4 kayısının ASSF fitoplazması ile enfekteli olduğunu PZR-RFLP ile saptamışlardır. Bu çalışmada enfekteli bitkilerin 3 adedi Doğu Akdeniz bölgesinde son yıllarda yoğun olarak yetiştirilen erkenci bir çeşit olan Prececo de Thyrinthe’de, 1 adedi ise ülkemizin en önemli sofralık kayısı çeşidi olan Sakıt eşidinde saptanmıştır.

Sertkaya ve ark. (2005)’nın Adana, Hatay ve İçel illerinden topladıkları toplam 21 kayısı, badem, şeftali ve erik ağacından 4 tanesinin ASSF fitoplazması ile enfekteli olduğu bildirilmiştir.

Antalya, Gaziantep, Isparta, Mersin ve Yalova illerindeki gen kaynaklarından alınan Çağrıbey, şekerpare, Sakıt, Canino, Kecskemet Rosa, Levent ve Aprikoz kayısı örnekleri ile Obilnaja, October Sun, Globe Sun, Original Sun, TC Sun, Queen Rosa, Autumn Giant erik örneklerinde ASSF fitoplazması moleküler yöntemlerle tespit etmişlerdir (Ulubaş-Serçe ve ark., 2006).

Ulubaş-Serçe ve ark. (2007), sera koşullarında altı yerli kayısı eşidinin *Candidatus Phytoplasma prunorum* fitoplazmasına duyarlılığını araştırmışlardır. Bu

Çalışmada kullanılan Hacihaliloğlu, Kabaası, Tokaloğlu, Şekerpare, Alkayısı ve Karacabey eşitleri 2005 yılının Eylöl ayında yapay inokulasyon yöntemiyle aşılanmış ve 2 yıl boyunca yapılan gözlemlerde ve PZR testlemelerinde sadece Kabaası eşidinde etmen saptanmamıştır. Özellikle Alkayısı, Şekerpare, Karacabey ve Hacihaliloğlu çeşitlerine ait bazı bitkilerin enfeksiyon nedeniyle 1 yıl içinde öldüğü gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma Mersin-Erdemli Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nün Kayısı damızlık parseli ile Mersin-Mut bölgesinin bazı üretici bahçelerinde yürütülmüştür. Toplam 29 çeşitten 112 örnek alınmıştır. Çalışmada kullanılan çeşitler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede Kullanılan Çeşitler ve Örnekleme Yerleri

No	Örnek Alınan Yer	Çeşit adı
1	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Alata Yıldızı
2	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Alyanak
3	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Aurora
4	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Bebeco
5	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Beliana
6	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Canino
7	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Castelbrite
8	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Çağataybey
9	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Çağrıbey
10	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Dr. Kaşka
11	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Fracasso
12	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Mahlep
13	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Ninfa
14	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Harcot
15	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Palstein
16	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Precoce de Colomer
17	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Precoce de Tyrinthe
18	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Priana
19	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Roxana
20	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Sakit-2
21	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Sakit-6
22	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Şahinbey
23	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	Zerdali
24	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	33-89
25	Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü	2-89
26	Mut / Mersin	Precoce de Tyrinthe
27	Mut / Mersin	Alkayısı
28	Mut / Mersin	Şekerpare
29	Mut / Mersin	İtalyan Tokalı

Testlemelerde bu bahçelerde simptom gösteren ve göstermeyen ağaçlardan alınan sürgünler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

İki aşamalı yapılan PZR testlerinde Direkt-PZR’de 1800 bp ürün veren P1 ve P7 primerleri, Nested-PZR’de ise 1050 bp ürün veren F01 ve R01, 1200 bp ürün veren F2 ve R2, 865 bp ürün veren FU5/rU3 primer çiftleri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizleri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.2. Universal ve Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma (EÇSF) grubuna spesifik primer çiftleri

P1	5’AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A 3’	(Deng ve Hiruki, 1991)
P7	5’ CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3’	(Smart ve ark., 1996);
F2	5’ACG ACT GCT AAG ACT GG 3’	(Lee ve ark., 1995)
R2	5’TGA CGG GCG GTC TGT ACA AAC CCC G3’	(Lee ve ark., 1995)
rU3	5’TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA 3’	(Lee ve ark., 1995)
FU5	5’CGG CAA TGG AGG AAA CT 3’	(Lee ve ark., 1995)
F01	5’ CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT 3’	(Lee ve ark., 1995)
R01	5’ AAG TGC CCAACT AAA TGA T 3’	(Lee ve ark., 1995)

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Materyallerinin Toplanması ve Muhafazası

Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’nde bölgenin tek damızlık kayısı damızlık parseline ve Mersin’in Mut ilçesinde kayısı yetiştirilen bahçelere sonbahar aylarında sörveyler yapılmıştır. Örneklerin toplanması amacıyla ASSF simptomu gösteren veya göstermeyen simptomsuz ağaçlardan tesadüfi olarak bahçenin %5’ini temsil edecek şekilde ağaçların dört farklı yönünden 20-25cm uzunluğunda yapraklı sürgünler örnekleri oluşturmuştur.

Kayısı ağaçlarından örnekler toplanırken ASSF hastalığının belirtileri göz önünde tutulmuş ve ağaçların gelişmesi, dalların durumu, yapraklarda kıvrılma, erken tomurcuk patlaması ve yaprak oluşumu, kabukaltı nekrozları, renk değişiklikleri

gibi belirtiler bulunup bulunmadığına dikkat edilmiştir. Ağaçlardan alınan örnekler plastik torbalara etiketlenerek yerleştirilmiş ve buz içeren kutularda laboratuara taşınmıştır.

3.2.2. Moleküler Testler

3.2.2.1 Nükleik Asit Ekstraksiyonu

— Toplam DNA izolasyonu için sürgünlerin floem dokularından 0.1 g alınarak sıvı azot ile toz haline getirilmiş, %0,2 Merkaptoethanol içeren %2'lik CTAB'dan 1 ml eklenmiştir. 2 ml'lik eppendorf tüplere konulan örnekler 60 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

— Karışım 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan sıvı fazdan 750 µl alınarak üzerine 750 µl fenol: chloroform: isoamlyalkol eklenerek 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

— Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

— Santrifüjden sonra oluşan üst fazdan 500 µl alınarak üzerine 800 µl izopropanol eklenerek DNA çökeltilmiş, -20 °C'de 2 saat bekletilmiştir.

— -20 °C'den çıkarılan tüpler 1400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı faz dökülerek dipte kalan çökeltinin üzerine 1ml %70'lik soğuk alkol koyuldu ve tüplerdeki pelletin yerinden oynamamasına dikkat edilerek tüpler yavaşça alt üst edildi ve alkol kısmı döküldü. Kısa bir santrifüjlemeden sonra dipte kalan sıvı pipetle alınarak, pelletin kuruması için tüpler 37 °C'de yarım saat etüvde bekletilmiştir.

— Tüplere 100 µl TE buffer eklenerek pellet çözündürüldükten sonra elde edilen DNA PZR işlemlerinde kullanılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Doyle and Doyle., 1990).

(Nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltiler EK.1'de verilmiştir)

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Testleri

İzole edilen DNA'ların PZR işlemi 2 aşamada (Direkt- ve Nested-PZR) gerçekleştirilmiştir. (Lee ve ark., 1992). Direkt-PZR aşamasında nükleik asitler 1/ 50

sulandırılarak 1µl DNA 25 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 (P1 ve P7), 2 ünite *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. Direkt-PZR döngüsü; 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C de 1 dakika, 57°C'de 2 dakika ve 72°C'de 3 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikadan oluşmuştur. Direkt-PZR'dan sonra uygulanan Nested-PZR amacıyla F01-R01, F2 ve R2, FU5/rU3 primerleri kullanılmış, yukarıda açıklanan reaksiyon karışımına 1/50 oranında sulandırılmış Direkt-PZR ürünlerinden 1 µl eklenmiştir. Nested-PZR programı, Direkt-PZR ile aynı olmakla birlikte 35 döngülük kısımda denatürasyon 94°C'de 30 saniye ve primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklığı 55°C'de 30 saniye uygulanmıştır. PZR ürünlerinin %1.2'lik agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak ve sonuçlar UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır (Lee ve ark., 1992).

PZR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla reaksiyondan sonra ürünler %1.2 agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez 1XTAE ortamında gerçekleştirilmiş ve aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme ortamı (6X; 15 ml için 150mg bromophenol blue, 18 g gliserol, 6ml 50XTAE) ile birlikte 12 µl yüklenen PZR ürünleri, 120 V'da 35 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1mg/µl EtBr içeren 0.5XTAE ortamında 3-5 dakika boyanmıştır (Ek.2). Daha sonra UV altında sonuçlar gözlenerek fotoğrafları çekilmiştir (Lee ve ark., 1992).

3.2.2.3 Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Analizi

FU5/rU3 primerleriyle elde edilen Nested PZR ürünlerinin RFUP analizi *RsaI*, *SspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılmıştır. f01/r01 primerleriyle elde edilen Nested PZR ürünlerinin RFLP analizi ise *SspI*, *BmfI*, *BsaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla 10µl Nested PZR ürünü, 0.5µl enzim, 1.5µl enzim tamponu, 3µl d₂H₂O, *BsaAI* (*Ppu2II*) enzimi için 30 °C 5 saat, *SspI*, *BfmI* ve *RsaI* enzimleri için ise 37 °C'de 5 saat bekletildikten sonra elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Enzim kesimi sonucu pozitif kontrollerden ASSF ile aynı band profili oluşturan örnekler ASSF ile enfekteli kabul edilmiştir (Lee ve ark., 1999).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu araştırmada Mersin-Erdemli ilçesinde bulunan Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı koleksiyon bahçesinde kayısı ağaçlarında zarar oluşturan ASSF (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) hastalığının arazi gözlemleri ve PZR testi ile kesin tanıları yapılarak yaygınlık oranı belirlenmiştir. Ayrıca Mut ilçesi kayısı üreticilerinden yoğun şikâyetlerin geldiği bazı bahçeler de ziyaret edilerek bu bahçelerdeki ASSF'nin varlığı da moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir.

4.1 Arazi Gözlemleri

ASSF hastalığının saptanması için en uygun mevsimin sonbahar ayları olması nedeniyle (Jarausch ve ark.,1999) bitki örnekleri 2008 yılının Ekim ayında toplanmıştır. Örnekler Mersin-Erdemli Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı koleksiyon parselinden (Şekil 4.1; 4.2b) ve Mersin-Mut ilçesinde bulunan bazı ticari bahçelerde simptom gösteren (Şekil 4.2a) ve göstermeyen bitkilerden bahçenin %5'ini temsil edecek şekilde alınmıştır. Toplam 112 örneğin 20 tanesi Mersin-Mut'ta bulunan bahçelerden, 92 tanesi ise Mersin-Erdemli Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü kayısı koleksiyon parselinden toplanmıştır.

Bu bitkilerde gözlenen en önemli simptom yaprak kıvrılması olup, ASSF'nin neden olduğu diğer simptomlara rastlanmamıştır.



Şekil 4.1. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı koleksiyon parselinden genel görünüş



Şekil 4.2. a. Mut bölgesinde bulunan ticari bir bahçedeki yaprak kıvrılması simptomu.

b. ABKAE koleksiyon parselindeki yaprak kıvrılması simptomu

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Sonuçları

Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü kayısı koleksiyon parselinden toplanan 92 örneğin bir tanesi ve Mersin-Mut ilçesinden üretici şikâyetlerinin geldiği toplam 6 bahçeden toplana 20 örneğin 8 tanesinin fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Mersin Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) ve Mut ilçesinden toplanan farklı kayısı çeşitlerinin Nested -PZR sonuçları

Örnek No	Çeşit Adı	Alındığı Yer	Nested-PZR Sonucu
1	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
2	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
3	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
4	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
5	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
6	Precoce de Tyrinthe	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
7	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
8	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
9	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
10	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
11	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
12	Çağrıbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
13	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
14	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
15	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
16	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
17	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
18	şahinbey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
19	Mahlep	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
20	Mahlep	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
21	Mahlep	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
22	Mahlep	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
23	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
24	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
25	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
26	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
27	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
28	Ninfa	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
29	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
30	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
31	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
32	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
33	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
34	Palstein	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-

35	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
36	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
37	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
38	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
39	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
40	Dr. Kaşka	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
41	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
42	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
43	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
44	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
45	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
46	Precoce de Colomer	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
47	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
48	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
49	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
50	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
51	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
52	Çağataybey	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
53	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
54	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
55	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
56	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
57	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
58	Alata Yıldızı	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
59	Zerdali	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
60	Zerdali	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
61	Zerdali	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
62	Zerdali	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
63	Zerdali	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
64	Beliana	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
65	Beliana	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
66	Beliana	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
67	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
68	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
69	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
70	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
71	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
72	Sakit-2	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
73	Harcot	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
74	Harcot	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
75	Harcot	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
76	Harcot	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
77	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
78	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
79	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
80	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-

81	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
82	Bebeco	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
83	2-89	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
84	Canino	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
85	Roxana	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
86	Aurora	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
87	Sakit-6	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
88	Fracasso	Erdemli/Mersin (ABKAE)	+
89	Castelbrite	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
90	33-89	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
91	Alyanak	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
92	Priana	Erdemli/Mersin (ABKAE)	-
93	Prececo de Tyrinthe	Mut/Mersin (Zeytin Çukuru)	-
94	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
95	Precoce de Tyrinthe	Mut/Mersin (Zeytin Çukuru)	-
96	Precoce de Tyrinthe	Mut/Mersin (Zeytin Çukuru)	+
97	Precoce de Tyrinthe	Mut/Mersin (Zeytin Çukuru)	-
98	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
99	Şekerpare	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
100	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
101	Alkayısı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
102	Şekerpare	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
103	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
104	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
105	Alkayısı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
106	Alkayısı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
107	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
108	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+
109	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
110	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
111	İtalyan Tokalı	Mut/Mersin (Çukurbağ)	-
112	Şekerpare	Mut/Mersin (Çukurbağ)	+

+ : Fitoplazma ile enfekteli **—** : Fitoplazma yok

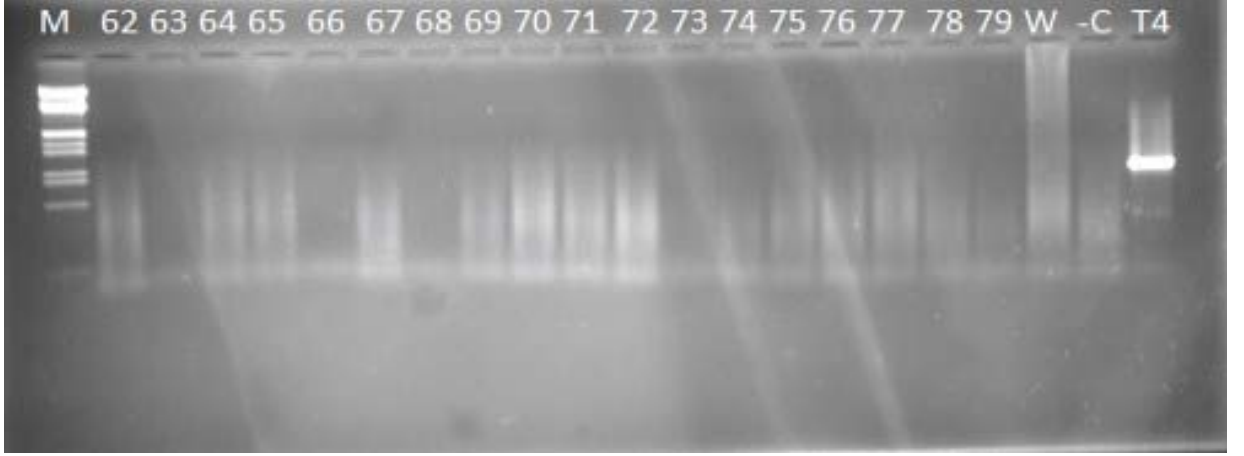
Çizelgede görüldüğü gibi Mut ilçesinde testlenen örneklerden 94, 96, 98, 99, 100, 101, 108, 112 nolu örnekler; Erdemli Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nden testlenen örneklerden ise 88 nolu örnek (Fracasso çeşidi) fitoplazma ile enfekteli bulunmuştur. Testlenen 112 ağaçtan 103'ü fitoplazma açısından temiz bulunmuştur (Şekil 4.3).

Bu çalışmada 3 farklı primer çifti kullanılarak Nested-PZR yapılmıştır. F2R2 primer çiftleri kullanılarak yapılan Nested PZR sonucunda sadece 2 örnekte çok hafif

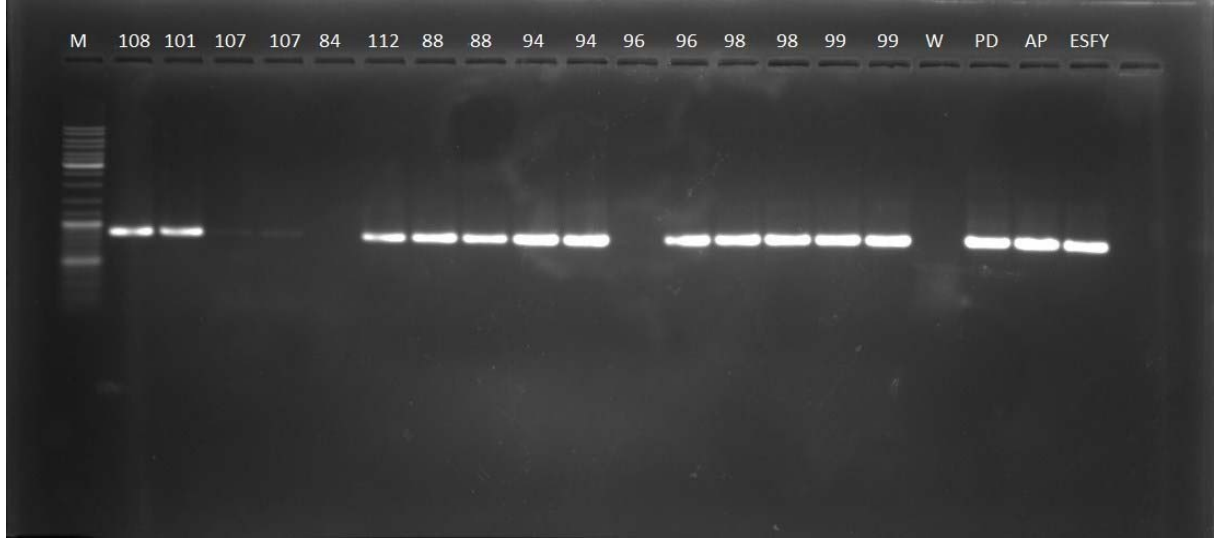
bir band elde edilmiş, PCR ürününün yetersizliği nedeniyle RFLP testine tabi tutulamamıştır. FU5/rU3 ve F01/R01 primer çiftleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.4. ve 4.5'te görülmektedir. Her iki şekilde de görüldüğü gibi jeller üzerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede band oluşumu gözlenen örneklerin fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bant oluşumu görülmeyen örneklerin fitoplazma açısından temiz olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan bu testlemeler sonucunda Mut ilçesinden alınan örneklerde fitoplazma enfeksiyon oranı % 40 olarak belirlenirken ABKAE'den alınan örneklerde % 1.08 olarak bulunmuştur. Jarausch ve ark. (1998), tipik ASSF simptomu gösteren ağaçların %95'inde, simptom göstermeyen ağaçların ise %51'inde ASSF saptamıştır. Ayrıca Torres ve ark. (2004), İspanya'nın Barcelona bölgesinde yaptıkları çalışmada erik ve kayısı ağaçlarının bulunduğu bölgelerde survey yapmış bu gözlemlerden sonra alınan örnekler Nested- PZR yöntemi ile testlenmiş, testlemede 16SrX grubu spesifik primerler kullanılmış ve yapılan testleme sonucunda simptom göstermeyen 69 örneğin %50'inin ASSF ile enfekteli olduğu ortaya çıkmıştır. Bizim yaptığımız çalışma da bu çalışmalarla paralellik göstermektedir. Jarausch ve ark. (2000), İzmir'den temin ettikleri bir adet *Prunus salicina* (Japon eriği)'da ASSF fitoplazmasını PZR-RFUP ile tespit etmişler ve ülkemizde bu fitoplazmanın ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir. Çağlayan ve ark. (2004) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2003–2004 yıllarında yaptıkları sörvey çalışmaları sonucunda toplam 174 sert çekirdekli meyve ağacından 4 kayısının ASSF fitoplazması ile enfekteli olduğunu PZR-RFUP ile saptamışlardır. Bu çalışmada enfekteli bitkilerin 3 adedi Doğu Akdeniz bölgesinde son yıllarda turfanda çeşit olarak yoğun olarak yetiştirilen Prececo de Thyrinthe çeşidinde, 1 adedi ise ülkemizin en önemli sofralık çeşidi olan Sakıt çeşidinde saptanmıştır. Ayrıca Ulubaş-Serçe ve ark. (2006), Antalya, Gaziantep, Isparta, Mersin ve Yalova illerindeki gen kaynaklarından alınan Çağrıbey, Şekerpare, Sakıt, Canino, Kecskemet Rosa, Levent ve Aprikoz kayısı örnekleri ile Obilnaja, October Sun, Globe Sun, Original Sun, TC Sun, Queen Rosa, Autumn Giant erik örneklerinde ASSF fitoplazması tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgularda ilk kez Fracasso çeşidinde ASSF saptanmış ve ABKAE'de bulunan diğer çeşitlerin şimdilik ASSF'den ari oldukları belirlenmiştir. Hastalığın ülkemizin diğer damızlık parsellerinde oldukça yaygın bulunması ve vektör böceklerle etkin taşınması durumu göz önüne

alındığında bu bitkilerin her yıl testlenmesi ve enfekteli bulunanların derhal imha edilmesi gerekmektedir.



Şekil 4.3. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden toplanan kayısı örneklerinin FU5/rU3 primerleri ile yapılan Nested PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), W: Su kontrol, -C : Negatif kontrol; T4: ASSF ile enfekteli pozitif kontrol



Şekil 4.4. Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (ABKAE) ve Mut'dan toplanan kayısı örneklerinin FU5/rU3 primerleri ile yapılan Nested PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI Fermentas), W: Su kontrol; Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması); 84, 88: ABKAE örnekleri; 94, 96, 98, 99, 101, 107, 108, 112: Mut örnekleri.

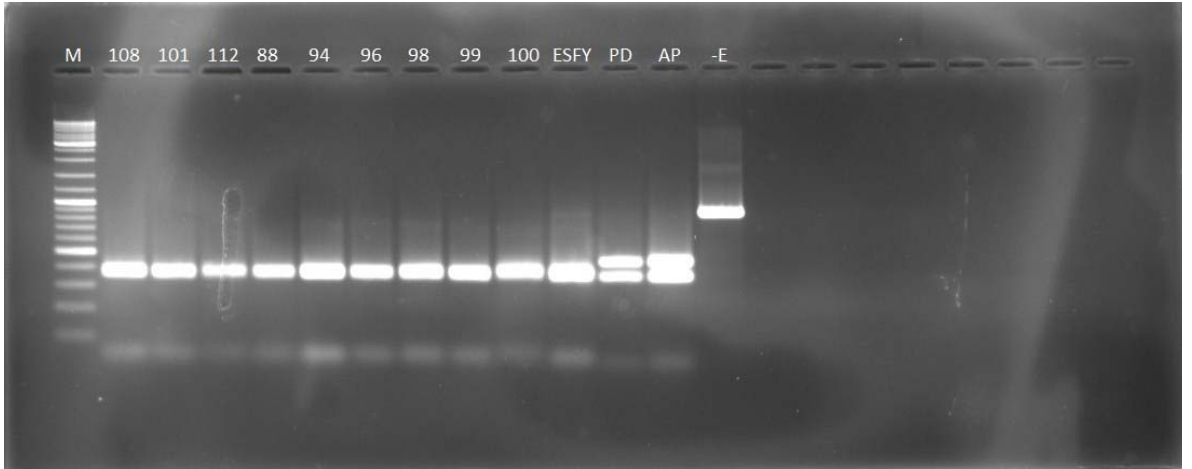


Şekil 4.5. Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (ABKAE) ve Mut'dan toplanan kayısı örneklerinin F01-R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested PZR sonucu elde edilen jel görüntüleri. M: DNA markırı (MBI, Fermentas), W: Su kontrol; Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması); 14, 84, 87, 88: ABKAE örnekleri; 94, 96, 98, 99, 100, 101, 108, 112: Mut örnekleri.

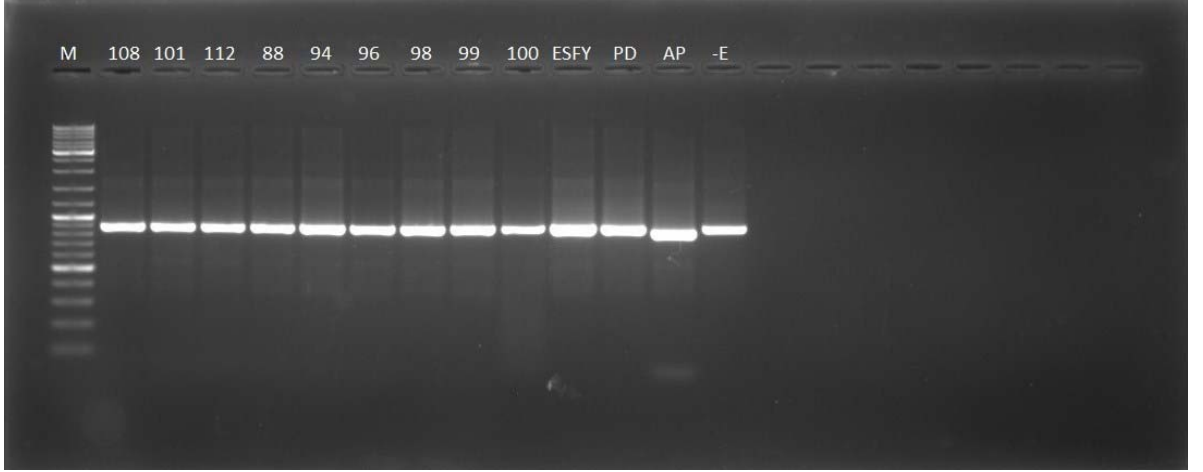
4.3. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) Sonuçları

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

FU5/rU3 primer çifti kullanılarak yapılan Nested-PZR ürünlerinin *RsaI*, *SspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan RFUP analizi sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.6. ve 4.7’de verilmiştir.

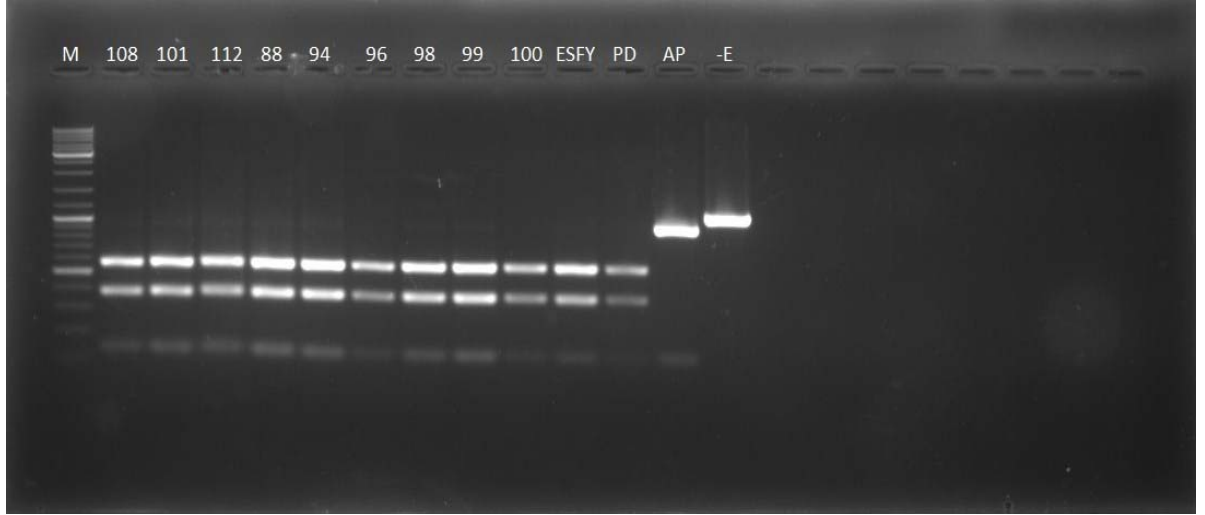


Şekil 4.6. FU5/rU3 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI, Fermentas); Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması); 88: ABKAE pozitif örneği; 94, 96, 98, 99, 101, 108, 112: Mut pozitif örnekleri; -E: Enzim içermeyen kontrol.

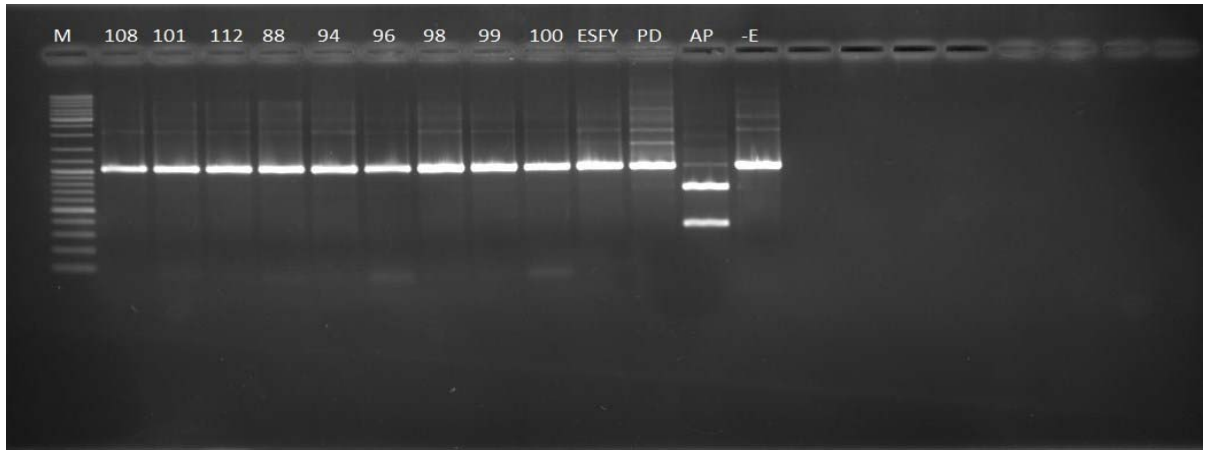


Şekil 4.7. FU5/rU3 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ssp* I enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI, Fermentas); Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması); 88: ABKAE pozitif örneği; 94, 96, 98, 99, 101, 108, 112: Mut pozitif örnekleri; -E: enzim içermeyen kontrol.

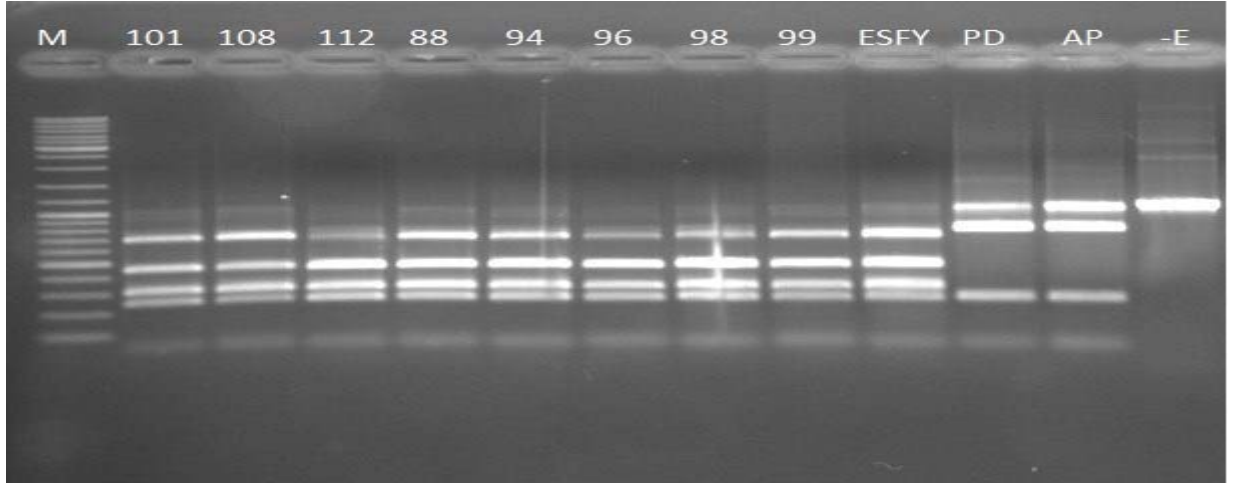
FO1/R01 primer çifti kullanılarak yapılan Nested-PZR ürünlerinin *Ssp*I, *Bmf* I, *Bsa* I restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan RFUP analizi sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.8. F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Bfm1* enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI, Fermentas); Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplması); 88: ABKAE pozitif örneği; 94, 96, 98, 99, 101, 108, 112: Mut pozitif örnekleri; -E: enzim içermeyen kontrol.



Şekil 4.9. F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI, Fermentas); Pozitif kontroller: PD (Armut Yıkım Fitoplması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplması); 88: ABKAE pozitif örneği; 94, 96, 98, 99, 101, 108, 112: Mut pozitif örnekleri; -E: enzim içermeyen kontrol.



Şekil 4.10 F01-R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BsaI* enzimi ile kesilmelerinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı # SMO331 (MBI, Fermentas); Pozitif kontrolleri: PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ESFY (Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması); 88: ABKAE pozitif örneği; 94, 96, 98, 99, 101, 108, 112: Mut pozitif örnekleri; -E: enzim içermeyen kontrol.

Nested-PZR sonucu fitoplazma ile enfekteli bulunan örneklerin farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmeleri sonucu yapılan jellerde fitoplazma ile enfekteli pozitif örneklerin band profillerinin ASSF pozitif kontrolünün band profili ile aynı olduğu ortaya konulmuştur (Lee ve ark., 1995).

Bu enzimler ile yapılan kesimlerde AP grubuna giren PD ve AP fitoplazmaları ASSF'den farklı band profili oluşturmaları ile ayırt edilebilmiştir.

Yapılan bu testlemeler sonucunda çeşit bazında enfekteli ağaçların dağılımı incelendiğinde; 1 tane Fracasso, 1 tane Precoce de Thyrinthe, 1 tane Alkayısı, 2 tane Şekerpare, 4 tane İtalyan tokalı kayısı çeşidinin ASSF ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Kayıslarda çeşit bazında Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması (ASSF) enfeksiyon oranları

Çeşit İsmi	Alındığı Bölge	Alınan Örnek Sayısı	Enfeksiyonlu Örnek Sayısı	% Oranı
Fracasso	ABKAE	1	1	100
Alkayısı	MUT	3	1	33.3
İtalyan Tokalı	MUT	9	4	44.4
Precoce de Tyrinthe	MUT	9	1	11.1
Şekerpare	MUT	3	2	66,9

Bu sonuçlara göre Mersin’de kayısı damızlık bloklarında da ASSF fitoplazmasının varlığı ilk kez saptanmış olup önemli bir kayısı bölgesi olan Mut’ta da gerek semptomlu gerekse semptomsuz ağaçlarda hastalığın varlığı kanıtlanmıştır. Hastalığın yaprak psillaları ile etkin olarak taşındığı da göz önüne alındığında bölgedeki kayısı ağaçlarının ASSF açısından dikkatle takip edilmesi, vektörler karşı uygun ilaçlamaların yapılarak hastalığın taşınmasının önlenmesi ve özellikle de damızlık bloklarda bulunan tüm bitkilerin her yıl testlenerek enfekteli olanların imha edilmesi gerekmektedir. Çalışmanın sınırlı bir alanda ve sınırlı sayıda örnekle yapılmasından dolayı bu sonuçların daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi zorunludur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sahip olduğu değişik ekolojik koşullar nedeniyle pek çok meyve kültürünün merkezi olan Türkiye kayısı, elma, erik ve kiraz gibi farklı meyve ağaçlarının anavatanı ve meyvecilik kültürünün merkezidir. Bu meyve türleri ülkemizde ekonomik olarak önemli bir yer tutmakta fakat yüksek verimli ve kaliteli meyve elde etmek her zaman mümkün olmamakla birlikte Sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki hastalık ve zararlılar ekonomik olarak önemli kalite ve verim kayıplarına neden olmaktadır. Zararlı böcekler, fungal ve bakteriyel hastalıklar değişik kimyasallar kullanılarak etkili bir savaşım yöntemiyle başarılı bir şekilde önlenabilmektedir. Ancak, virüs, viroid ve fitoplazma gibi hastalıklarla aynı şekilde kimyasal mücadele yapılamamaktadır. Bu etmenlerle en etkili mücadele yolu tesis edilen bahçelerde sağlıklı ve etmene tolerant/dayanıklı fidanlar kullanmak, diğer inokulum kaynaklarından etmenin bulaşmasının önlenmesi için vektörlerle ve olası konukçularla mücadele etmek ve eradikasyondur. Sert çekirdekli meyve ağaçlarından özellikle kayısı ve erikte sorun olan fitoplazmalardan *Candidatus Phytoplasma prunorum* (Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı=ASSF European Stone Fruit Yellow=ESFY) hassas çeşitlerde ağacın 1-2 yıl içinde ölümüne neden olmaktadır.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde 2007–2009 yıllarında yürütülen bu çalışmada Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı koleksiyon parselinden 92, Mut ilçesinin Çukurbağ bölgesinden 17 ve yine Mut ilçesinin Zeytinçukuru bölgesinden 3 örnek alınmıştır. Alınan örneklerle yapılan PZR çalışmalarında Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün kayısı damızlık parselinden 1, Çukurbağ bölgesinden 7, Zeytinçukuru bölgesinden ise 1 örnek ASSF fitoplazması ile enfekteli bulunmuştur. ABKAE'deki damızlık çeşitlerde hastalığın varlığı ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Çeşitlere göre dağılımı incelendiğinde, İtalyan tokalı, Şekerpare, Alkayısı, Precoce de Thyrinthe ve Fracasso çeşitlerinde ASSF'nin varlığı tespit edilmiştir. Fracasso çeşidi için ülkemizdeki hastalık ilk kayıttır.

Çeşitler bazında incelendiğinde, kayısı yetiştiriciliğinde üreticiler yabancı çeşitleri kullandıkları gibi yerli çeşitleri daha yoğun kullanmaktadır. Ancak ülkemizde yetiştirilen bu kayısı çeşitlerinin ASSF fitoplazmasına karşı olan reaksiyonları (tolerant/dayanıklı veya hassas olma durumu) hakkında bir çalışma dışında pek fazla bir

bilgi mevcut değildir. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde ASSF fitoplazmasının epidemi yapması durumunda bu bölgeler için önemli bir potansiyel tehlike olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle, ülkemizde geniş üretim alanı bulan ekonomik kayısı çeşitlerinin ASSF fitoplazmasına karşı tolerans/dayanıklı veya hassas olma durumlarının belirlenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan kayısı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan anaçlar ve anaç potansiyeline sahip çeşitlerin de aynı araştırmaya tabi tutulması ile dayanıklı/tolerant anaç kullanımı ile ASSF'nin zararlı etkilerinden korunmak mümkün olabilecektir.

ASSF fitoplazmasını persistent olarak taşıdığı bilinen *Cacopsylla pruni* Scopoli böceğinin ülkemizde varlığına dair henüz bir kayıt yoktur. Bu bölgede tespit ettiğimiz ASSF fitoplazma'sının enfekteli fidan veya aşı materyali ile taşınma olasılığı yüksek görülmekle birlikte mutlaka olası vektör ve konukçuların da araştırılması gerekmektedir.

Bütün bunlar göz önüne alındığında kayısı bahçesi tesisinde kullanılacak fidanların mutlaka virüs ve benzeri etmenlerden arı olması, aşı gözü temininde ise yine aynı şekilde virüs ve benzeri etmenlerden arı aşı gözü kullanımı teşvik edilmelidir. Bahçe tesisinden sonra ise düzenli aralıklarla bitkilerin kontrolü, gerekli durumlarda eradikasyon, olası vektör ve konukçularla düzenli mücadele bu tür hastalıkların kontrolünde önemli bir başarı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2004. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer)D.İ.E., Yayın No. 2002, 199 s. Ankara.
- Anonymous, 2008. Fao Statistics Division 23.11.2008.
- Audergon, J. M., Castelain, C., Morvan, G., Castellière, M.-G., 1991. Behaviour of 150 apricot varieties after an apricot chlorotic leaf roll inoculation . **Acta Hort.**, 293: 593-598.
- Asma, B, M. ve Birhanlı, O., 2004. Mişmiş. Evin offset MALATYA, 4s.
- Balan, V., Ivascu, A., Toma, St. Solcan, Gh., Tatu, St., 1999. The reaction to phytoplasma infection of different apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. **Acta Hort.**, 488 765-768.
- Carraro, I., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., and Refatti, E., 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. **Journal of Plant Pathology**, 80: 233-239.
- Carraro, I., Loi, N., Ermacora, P., 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. **European Journal of Plant Pathology**, 107: 695-700.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N., 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. **Plant Pathology**, 51: 513-517.
- Çağlayan, K., Gazel, M., 1999. Primary studies for viroid and phytoplasma problems of stone fruits in East Mediterranean Area of Turkey. XIVth International Plant Protection Congress (IPPC) Jerusalem, Israel, July 25-30. p. 16.characterisation of Mediterranean *Prunus* Necrotic Ringspot Virus Isolates. **Journal of Plant Pathology**, 83 (1): 45-49.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Ulubaş, Ç., Ember, I., 2004. Doğu Akdeniz Bölgesindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarında Avrupa sert çekirdekli meyve ağacı sarılığı (European stone fruit yellows=ESFY) fitoplazmasının yaygınlık durumunun PZR/RFLP yöntemleriyle saptanması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 8-10 Eylül 2004, 141 s. Samsun.
- Davies, D, L., and Adams, A, N., 2000. ,European Stone Fruit Yellows Phytoplasmas associated with a decline diseases of apricot in southern England. **Plant Pathology**, 49: 635-639.
- Deng, S., Huriki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. **Journal of Microbiological Methods**. 14:1, 53-61.
- Desvignes, J.C., Cornaggia, D., 1982. Observations on apricot chlorotic leaf roll (ACLR): sensitiveness of different *Prunus* species, detection, spread in plum orchards. **Acta Hort.** 130, 249-256.
- Dosba, F., Lansac, M., Mazy, K., Garnier, M., and Eyquard, P.J., 1991.Incidence of different diseases associated with mycoplasma-like organisms in different species of *Prunus*. **Acta Hort.**, 283: 311-320.
- Doyle,J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15.
- Dunez, J. 1988. Fruit crop sanitation in theMediterranean and Near east Region. Status and Requirements. FAO. United Nations Development Programme, 251-259.
- Guinchedi, L., Poggi-Pollini, C. and Credi, R., 1982. Susceptibility of stone fruit trees to the Japanese plum tree decline causal agent. **Acta Hort.**, 130: 285-90.
- Jarausch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J. M. and Dosba, F., 1998. PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use

- for epidemiological studies in France. **European Journal of Plant Pathology** 104: 17-27.
- Jarausch, W., Lansac, M., and Dosba, F., 1999. Seasonal Colonization Pattern of European Stone Fruit Yellowings Phytoplasmas in Different Prunus Species Detected by Specific PCR. **Journal of Phytopathology**, 147: 47-54.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M., Mohs, M., and Dosba, F., 2000. Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellowings phytoplasmas. **Journal of Phytopath.**, 148: 489-493
- Jarausch, W., Jarausch-Wegrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C., and Garnier, M., 2001. Detection and identification of European stone fruit yellowings and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in Southern France. **European J. Plant Path.** 107: 209-217.
- Jawdah, Y.A., Karakishian, A., and Sobh, H., 2002. An Epidemic of Almond Witches' broom in Lebanon: Classification and Phylogenetic Relationship of the Associated Phytoplasma. **Plant Disease**, 477.
- Kisson, H., Kirkpatrick, B. C. Seemüller, E., 1997. Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. **Plant Pathol.**, 46: 538-544.
- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellowings Phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. **J. Phytopathology**, 149: 533-541.
- Laimer Da Camara Machado, M., Paltrinieri, S., Hanzer, V., Arthofer, W., Strommer, S., Martini, M., Pondrelli, M., and Bertaccini, A., 2001. Presence of European stone fruit yellowings (ESFY or 16SrX-B) phytoplasmas in apricots in Austria. **Plant Pathology**, 50: 130-135.
- Landi, F., Prandini, A., Paltrinieri, S., Mori, N., Bertaccini, A., 2007. Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy. **Bulletin of Insectology** 60 (2): 163-164.
- Lee, I.M., and Journal of Phytopath 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 yellowings MLO strain cluster. **Phytopathology**, 82: 977-986.
- Lee, I.M., and A. Bertaccini, M. Vibro and D. E. Gundersen., 1995. Detection of Multiple Phytoplasmas in Perennial Fruit Trees with Decline symptoms in Italy. 728-735
- Lorenz, K.-H., Dosba, F., Poggi Pollini, C., Llacer, G., Seemüller, E., 1994. Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. **Z. Pflkrankh. Pflschutz**, 101: 567-575.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. **Molecular Cloning; A Laboratory Manual**. By Cold Spring Harbour Lab., ISBN 0-87969-136.
- Myrta, A., Ermacora, P., Stamo, B., and Osler, R., 2000. Identification of European Stone Fruit Yellowings From Apricot and Japanese Plum in Albania.
- Nemeth, M., 1986. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands and Akademia Kiado, Budapest, Hungary, 840 p.

- Poggi Pollini C., Giunchedi L., Gambin E., 1993. Presence of mycoplasma-like organisms in peach trees in Northern-Central Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, 32: 188-92.
- Poggi-Pollini, C., Bissani, R., Giunchedi, L. and Vindimian, E., 1995. Occurrence of phytoplasma infection in European Plums (*Prunus domestica*). **Journal of Phytopathology**, 143: 701-3.
- Poggi-Pollini, C., Bissani, R., Giunchedi, 2001. Occurrence of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFY) Infection in Peach Orchards in Northern-Central Italy. **Journal of Phytopathology**, 149: 725-730.
- Pastore, M., Piccirillo, P., Simeone, A.M., Tian, J., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., 2001. Transmission by patch grafting of ESFY Phytoplasma to apricot (*Prunus armeniaca* L) and Japanese plum (*Prunus salicina* Linl). **Acta Hort.**, 550: 339-343.
- Rehder, A. 1940. Manual of Cultivated Trees and Shrubs. Second Edition. Macmillan Company, 996 p. New York..
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemuller, E., and Kirkpatrick, B.C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23SrRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol* 62, 2988-2993.
- Sertkaya G., Martini M., Ermacora P., Musetti R., Osler R., 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and Pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. *Phytoparasitica* **33**:380-390.
- Torres, E., Martin, P, M., Paltrinieri, S., Vila, A., Masalles, R., and Bertaccini, C., 2004. Spreading of ESFY Phytoplasmas in stone fruit in Catalonia. **Journal of Phytopathology**, 152: 432-437.
- Ulubas Serce, C., Gazel, M., Caglayan, K., Bas, M., Son, L., 2006. Phytoplasma Diseases of Fruit Trees in Germplasm and Commercial Orchards in Turkey. **Journal of Plant Pathology**. 88 (2), 179-185.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Yalçın, S., Çağlayan, K., 2007. Responses of Six Turkish Apricot Cultivars to ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’ under Greenhouse Conditions. **Bulletin of Insectology** 60 (2), 309-310.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan ve yol gösteren danıőman hocam sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım sırasında değerli görüő, katkı ve bilgilerini esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr Mona GAZEL, Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE ve Yrd. Doç. Dr Feza CAN'a teőekkürlerimi sunarım.

Labaratuar çalıőmalarımda bana yardımcı olan arkadaşlarım Ziraat Müh. Melisa MUKANNASGİL ve Őefika YAVUZ'a teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarım sırasında manevi desteğini esirgemeyen, hayatımın her aşamasında bana her konuda destek olan özellikle değerli eőim Hr ALTAN'a ve çocuklarıma teőekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1977 BİNGÖL doğumluyum. 1995 yılında Çankırı Ziraat Meslek Lisesinden mezun oldum. 1996 yılında Diyarbakır Tarım İl Müdürlüğünde göreve başladım. 2001 yılında Silifke Seracılık Meslek Yüksek okulundan mezun oldum. 2006 yılında HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden mezun oldum. 1998 yılından beri Mersin Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk babasıyım.

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

Kimyasal	Miktar
CTAB (%2)	2 gr
NaCl (1,4M)	8,2 gr
EDTA (20mM)	0,7gr
Tris-HCl (500mM)	6gr
*β-mercaptoethanol	% 2

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

TE Tampon Çözeltisi 50 ml için

Tris 10mM

EDTA 1mM

Ek 2. AGAROSE JEL ELEKTROFOREZ ÇÖZELTLERİ ve HAZIRLANMASI
(MANIATIS Ve ark., 1982)

TAEX50

100ml stok için

Trizma base	24.2
0.5 M EDTA ph 8.0	10ml
0.6 glacial acetic acide	5.71ml

Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

Yükleme Ortamı

15ml 6X stok için

150mg Bromophenol blue

18g Glycerol

6ml TAEX50

-20 °C'de saklanır.

Ethidium Bromide Solüsyonu

1mg/ml 200ml stok için

200ml 0.5XTAE

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

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

kadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.

% 1.2'lik Agarose Jelin hazırlanması

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