



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ'TA BADEM CADİ SÜPÜRGESİ
(*Candidatus phytoplasma phoenicium*) FİTOPLAZMA
HASTALIĞININ MOLEKÜLER TEŞHİSİ**

DİDEM YÜZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAHRAMANMARAŞ

EYLÜL 2008

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ'TA BADEM CADI SÜPÜRGESİ
Candidatus phytoplasma phoenicium) FİTOPLAZMA
HASTALIĞININ MOLEKÜLER TEŞHİSİ

DİDEM YÜZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kod No:

Bu Tez 19/09/2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Doç. Dr.
Nihal BUZKAN
DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr.
Mürüvet ILGIN
ÜYE

Yrd. Doç. Dr.
Yaşar ALPTEKİN
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Süleyman TOLUN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma K.S.Ü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2007/4-7

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

İÇİNDEKİLER	SAYFA
İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	II
ABSTACT	III
ÖNSÖZ	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal	11
3.1.1 Survey ve Bitki Örneklerinin Toplanması	11
3.2. Metot	12
3.2.1.Bitki Örneklerden DNA İzolasyonu	12
3.2.2. PCR Analizi	12
3.2.3. PCR Ürünlerinin Analizi	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	14
4.1. Simptomatolojik Gözlem	14
4.2. PCR Analizi	17
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	18
KAYNAKLAR	20
EKLER	23
ÖZGEÇMİŞ	24

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZET

KAHRAMANMARAŞ'TA BADEM CADİ SÜPÜRGESİ (*Candidatus phytoplasma phoenicium*) FİTOPLAZMA HASTALIĞININ MOLEKÜLER TEŞHİSİ

DİDEM YÜZER

DANIŞMAN: Doç. Dr. Nihal BUZKAN

Yıl:2008 Sayfa:24

Jüri : Doç.Dr.Dr.Nihal BUZKAN

Yrd.Doç.Dr.Mürüvet ILGIN

Yrd.Doç.Dr.Yaşar ALPTEKİN

Bu araştırma, 2007-2008 yılında Kahramanmaraş ilindeki bazı köylerde ev ve kapama badem bahçeleri ile Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ) Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Merkezi'nde (SEKAMER) Bahçe Bitkileri Bölümü'nün katkılarıyla kurulmuş olan badem, şeftali ve erik bahçelerinde Badem Cadı Süpürgesi hastalığına neden olan *Candidatus phytoplasma phoenicium* fitoplazmasını Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemiyle teşhis etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hastalık belirtileri için gözlemler ve örnek toplama çalışmaları erken ilkbahar (Nisan) döneminde başlamış ve kış dinlenme dönemine (Kasım) kadar devam etmiştir. Badem (204), şeftali (30) ve erik (30) ağaçlarından toplam 264 adet bitkisel örnek alınmıştır. PCR analizlerinde, ağaçların içinde bulunduğu gelişme dönemi dikkate alınarak toplanan yaprak ve dormant odun çeliklerinden izole edilmiş olan DNA'lar kullanılmıştır. *Ca. phytoplasma phoenicium* teşhisi için fitoplazmaya spesifik AlmF1/AlmR1 primer çifti kullanılmış ve hiçbir örnekte fitoplazma enfeksiyonunu gösterecek 1512 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti elde edilmemiştir. Aynı örnekler fitoplazma evrensel primerleri (P1/P7) ile analiz edildiklerinde aynı şekilde hiçbir örnekte enfeksiyon tespit edilmemiştir. Sonuç olarak Kahramanmaraş ili sınırları içerisinde mevcut imkanlarla yapılan çalışmada badem, şeftali ve erik ağaçlarında Badem Cadı Süpürgesi ve muhtemel diğer fitoplazma hastalıklarının bulunmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Badem cadı süpürgesi, badem, fitoplazma, Kahramanmaraş, PCR, Türkiye

**UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAS SÜTÇÜ İMAM
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

MSc THESIS

ABSTRACT

**MOLECULAR DETECTION OF ALMOND WITCHES'-BROOM (*Candidatus
phytoplasma phoenicium*) IN KAHRAMANMARAS**

DİDEM YÜZER

SUPERVISOR : Assoc.Prof.Dr.Nihal BUZKAN

Yıl:2008 Sayfa:24

**Jury : Assoc.Prof.Dr. Nihal BUZKAN
Assist.Prof.Dr.Mürüvet ILGIN
Assist.Prof.Dr. Yaşar ALPTEKİN**

This study was carried out in 2007-2008 in the family and commercial almond orchards of Kahramanmaras villages and in the almond, plum and peach plantations of the Nuts Research and Experimental Orchards (SEKAMER) at Kahramanmaras Sutcu Imam University in order to detect "Almond Witches'- broom" disease caused by phytoplasma of *Candidatus phytoplasma phoenicium* by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Symptoms observations and plant sample collection were performed in early spring (April) through winter period (November). A total of 264 plants coming from almond (204), peach (30) and plum (30) was sampled. Leaf and latent woody cuttings regarding growth stage were used for DNA isolation in order to analyse with PCR. Primer sets of Alm F1/Alm R1 specific to phytoplasma was used for *Ca. phytoplasma phoenicium* detection and non of the samples was amplified for DNA band at 1512 bp for the phytoplasma infection. Same samples were also analysed by using phytoplasma universal primer sets (P1/P7) and no-sign was obtained for any other phytoplasma infection. As a conclusion neither almond witches'-broom nor other phytoplasma groups was found in basicly almond, then peach and plum samples in Kahramanmaras.

Keywords: Almond witches'-broom, almond, phytoplasma, Kahramanmaraş, PCR, Türkiye

ÖNSÖZ

Bana bu araştırma konusunu veren ve Yüksek Lisans programı süresince yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım esnasında her türlü desteğini aldığım, her türlü özveriği bana sağlayan, saygıdeğer hocam Sn. Doç. Dr. Nihal BUZKAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma projesinde SEKAMER badem, şeftali ve erik parselinde gözlem ve örnekleme çalışmalarını yapmamıza izin veren ve her türlü bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek katkıda bulunan Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Semih ÇAĞLAR ve Yrd. Doç. Mürüvet ILGIN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez araştırmasını yürütmek üzere bölüm imkanlarından faydalanmamı sağlayan Bitki Koruma Bölüm Başkanı Sn. Doç. Dr. Ali Arda IŞIKBER' e teşekkür ederim.

Son olarak, tezimin her aşamasında ve hayatta beni her konuda destekleyen eşim Dr. Hüsamettin YÜZER' e teşekkürlerimi sunuyorum.

Eylül 2008
KAHRAMANMARAŞ

Didem YÜZER

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 2.1. Fitoplazma türleri ve sebep oldukları hastalıkları.....	4
Çizelge 2.2. <i>Candidatus phytoplasma</i> türü olmasına rağmen farklı biyolojik, fitopatolojik ve genetik özelliği olan diğer türler.....	4
Çizelge 3.1. Kahramanmaraş'a bağlı köylerdeki bahçeler ile K.S.Ü. SEKAMER koleksiyon parselinden alınan bitkisel örnekler.....	11
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan P1/P7 evrensel primer dizinleri ve badem cadı süpürgesi fitoplazmasına spesifik hazırlanmış primer dizinleri...	13

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 4.1. SEKAMER badem koleksiyon parselinden genel bir görünüş...	14
Şekil 4.2. Sürgün uçlarında kuruma ve geriye doğru ölüm	15
Şekil 4.3. Yapraklarda sararma ve küçülme	15
Şekil 4.4. Meyvelerde renk değişikliği	16
Şekil 4.5. Meyvelerde küçülme ve deformasyon	16

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AP	:Apple Proliferation
bç	:Baz çifti
DAPI	: 4'-6 diamino 2-phenylindole florasın metod
DNA	:Deoxyribonucleic acid
dATP	:Deoxyadenosinetriphosphate
dGTP	:Deoxyguanosinetriphosphate
dCTP	:Deoxycytidinesetriphosphate
dTTP	:Deoxytimidinetriphosphate
dNTP	:Deoxynücleotidetriphosphate
ESFY	:European Stone Fruit Yellows
gr	:Gram
kb	:Kilobaz
MBO	:Mikoplasma benzeri organizma
PCR	:Polymerase Chain Reaction(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PD	:Pear Decline
PPWB	:Pigeon Pea Witches Brooms
RFLP	:Restriction fragment length polymorphism
RNA	:Ribonucleic acid
SEKAMER	:Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Merkezi
TAE	:Tris acetate ethylon diamine tetra acetic acid
TAGEM	:Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü
Taq	:Thermo Stabil Polimeraz Enzim
U.V.	:Ultra Viyole light
VK	:Vergilbungs krankheit

1.GİRİŞ

Ülkemizde üretilen yıllık meyve miktarı 1990'lı yıllarda 32 milyon ton civarında iken 2005 yılına gelindiğinde yıllık 43 milyon tona yükselmiştir. 2003-2005 yılları arasında özellikle meyve üretiminde bir artış görülmüştür. Bu rakam 2006 yılındaki kuraklık ve diğer sorunlar nedeniyle 41 milyon tona, 2007 yılında ise 40 milyon tona düşmüştür. Dünya ölçeğindeki üretim göz önüne alındığında, Türkiye Dünya' daki toplam meyve üretiminin yaklaşık yüzde 4 kadarını karşılamaktadır. Sert kabuklu meyve üretimi 2006 yılında bir önceki yıla göre yüzde 1.9 oranında artarak 15 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Önemli bazı ürünlere oranla, kayısı yüzde 46.5, erik yüzde 2.5 oranında azalmıştır. Şeftalide ise yüzde 8.4 oranında artmıştır. Toplam 14.4 milyon tonu bulan meyve üretiminde ise 2007 yılında, kayısıda yüzde 21.2'lik kayıplar yaşanmıştır. Meyve yetiştirilen bölgelerde 2008 yılında kuraklığın geçen yıllar ki kadar şiddetli olmaması, önemli don olaylarının yaşanmaması nedeniyle genel rekoltenin bir önceki yıla göre daha iyi olması beklenmektedir. Sonuç olarak, meyve üretimi 2005-2008 yılları arasında 43 milyon tondan 40 milyon tona düşmüştür (Anonim, 2008).

Türkiye'de badem yetiştiriciliğine olan ilginin son yıllarda giderek arttığı dikkat çekmektedir. Bu yüzden günümüzde badem bahçesi tesisi kazançlı bir yatırım olarak görülmeye başlanmıştır. Ülkemizde yılda yaklaşık 40.000 ton sert kabuklu badem üretilmektedir. Yerli bademlerimizin iç randımanı % 18-20 dolayında olduğuna göre, en iyimser tahminle yılda 8.000 ton kadar iç badem elde edilmektedir. Nitekim, Türkiye son yıllarda 2.000 ton dolayında iç badem ithal etmeye başlamıştır. Badem, kayısı ve şeftali gibi bazı meyve türleri binlerce yıl önce Türkiye' ye getirilmiştir. Yıllarca sadece tohumla üretilmesinden dolayı, çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Bunun yanı sıra diğer ülkelerden yurdumuza Teksas, Nonpareil gibi badem çeşitleri getirilmiş ve üretimi yapılmıştır.

Türkiye'de Doğu Karadeniz'in kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylalar dışında her yöresinde badem yetiştirilmektedir. Badem yetiştiriciliği Ege Bölgesi (Özellikle Datça yarımadası)'nde yoğunlaşmış olmakla birlikte, Akdeniz Bölgesi üretimden aldığı % 42 oranındaki payla ilk sıradadır. Bunu İç Anadolu ve Marmara Bölgeleri izlemektedir. Özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde Türkiye badem üretiminin üçte ikisi karşılanmaktadır. Kış soğuklarının fazla olduğu yerlerde ekonomik olarak badem yetiştiriciliği yapılamazken GAP bölgesinin sulu koşullarında özellikle badem yetiştiriciliğine uygun olduğu belirtilmiştir (Anonim, 2000). Badem yetiştiriciliğinde ön planda olan illerimiz Muğla, İçel, Antalya, Elazığ, Denizli, Karaman ve Diyarbakır'dır.

Son on yıl içerisinde Akdeniz ülkelerinde sert kabuklu meyve türlerinin üretimi gün geçtikçe artmaktadır. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları büyük sorunlar yaşatmaktadır (Dunez, 1988 ve 2000). Türkiye' de sert çekirdekli meyve türlerinde görülen virüs ve virüs benzeri hastalıklar bademde de hastalık yapmaktadır ve bu konuda yapılan araştırmalar az sayıdadır. Virüs ve virüs-benzeri hastalık etmenlerinin yanı sıra bademde zarar yapan klor (yapraklarda fungus zararı), yaprak delen (kızıl leke-çil; hastalık nemin arttığı alanlarda sıkça görülür), et leke hastalığı (fungus enfeksiyonundan kaynaklanan yapraklarda sarı-parlak kırmızı leke), külleme hastalıkları da önemli sayılabilir. Zararlılar olarak akarlar, yeşil şeftali yaprakbiti, fidan dip kurdu gibi böcek grupları ağacın gelişimi ve meyve kalitesi üzerinde olumsuz etki yapmaktadır (Küden ve Küden, 2000).

Geçmiş yıllarda sarılık hastalığı taşıyan bitkilerin elektron mikroskobuyla incelemesinde hücre duvarı olmayan organizmalar tespit edilmiştir. Bu yeni hastalık ajanı, insanda ve hayvanda hastalığa sebep olan mikoplazmaya benzerliğinden ötürü “Mikoplazma benzeri organizmalar (MBO)” olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları bu organizmaların kendine has, değişmeyen bazı özelliklerinin saptanması üzerine bu grup için fitoplazma ismi verilmiştir. Fitoplazmaya bağlı hastalıklar tüm dünya çapında yaygındır ve birçok bitkiyi enfekte etmektedir. Yüzlerce bitki türünde 300’den fazla hastalığa sebep olmaktadır. *Coconut lethal yellowing*, *Peach X-disease*, ve *Apple proliferation* gibi ekonomik olarak önemli hastalıklara yol açmaktadır. Bazı fitoplazma hastalıkları tek yıllık bitkileri bazıları ise orman alanlarını enfekte etmektedir (Welliver, 1999).

Fitoplazmalar bakterilere benzeyen tek hücreli, hücre duvarı olmayan, obligat parazitlerdir. Konukçu haricinde yaşamlarını sürdüremezler. Konukçu hücre sitoplazmasında büyür ve çoğalırlar. Fitoplazmalar çok küçüktürler ancak elektron mikroskobu ile izlenebilirler. Tomurcuklanma vasıtasıyla aseksüel olarak ürerler. Günümüzde en az 75 farklı fitoplazma mevcuttur; 14 grup ve 38 alt gruptan oluşmaktadır. Hastalıklar daha önceden adlandırıldığından sonradan saptanan fitoplazma ajanlarının isimleri arasında halen bir düzenleme yoktur. Moleküler teşhis yöntemlerinin gelişmesi ile benzer hastalığa neden olan farklı fitoplazmalar saptanmıştır. Aynı zamanda farklı adlarla adlandırılan hastalıkların tek bir fitoplazma tarafından enfekte edildiği anlaşılmıştır. Fitoplazmalar her ne kadar ilk olarak elektron mikroskobu yöntemi ile teşhis edilmiş olsa bile boyama, serolojik ve DNA’ya dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Serolojik ve DNA teknikleri farklı fitoplazmaların ayırt edilmesini, spesifik olarak tespitini ve sınıflandırılmalarını sağlamıştır (Welliver, 1999).

Lübnan’ın 3 farklı bölgesinde 2000 ve 2002 yılları arasında yapılmış olan surveylerde, uç sürgünlerinde küçük sararmış yapraklar bulunan badem ağaçlarından toplanan örneklerle yapılan bir çalışmada tüm badem çeşitlerinin etkilendiği saptanmıştır. Fakat bazı ağaçların belirgin derecede hassas olduğu ve sürgünlerde şiddetli cadı süpürgesine benzer değişimlerin geliştiği saptanmıştır. Bazı ağaçlarda bu belirtileri takiben ani ölümler tespit edilmiştir (Verdin ve ark., 2003). Lübnan ve İran’da 1990’lardan sonra badem cadı süpürgesi öldürücü hastalığı ile badem üretimi çok ciddi şekilde etkilenmiştir. Ülkenin güneyinde 1990’ların başında ilk yayılma başladığı zamandan itibaren, Lübnan’da son 15 yıl içerisinde binlerce badem ağacı ölmüştür. Lübnan ve İran’da görülen cadı süpürgesi hastalığının badem ağaçlarındaki belirtileri kök ve gövdeden başlayarak zayıf sürgünlerin artması ve cadı süpürgesinin belirginleşmesini kapsamaktadır. Bu belirtiler ağaçlar etkili olarak budandığı zaman şiddetlenmektedir. Ağaçlarda aynı zamanda yaprak boyutlarının küçülmesi ve sararması, büyümenin engellenmesi, geriye ölüm, sezon dışı büyüme, yapraklarda rozetleşme ve erken çiçeklenme görülür. Ağaçların ya da dalların etkilenen kısımlarında meyve miktarı azalır veya hiç meyve vermez duruma gelirler (Foissac ve ark., 2008).

Badem cadı süpürgesi (Almond witches’broom)’nin doğal konukçusu kültüre alınmış bademler (*Prunus dulcis*, *P. amygdalus* ya da *Amygdalus communis*) ve yabani bademdir (*P. orientalis*). Ancak Lübnan’da bu fitoplazma, amygdalus alt grubunda olan şeftali (*P. persica*) ve nektarinde de (*P. persica* var. *nucipersica*) saptanmıştır. Aşılama uygulamaları cadı süpürgesi hastalığının bademe, şeftali ve nektarine taşındığını

gösterirken *Prunus* ve *Cerasus* alt grup üyeleri olan kayısı, erik ve kiraza taşınmamıştır. Deneysel küskütle taşınma metoduyla *Cantharanthus roseus* yabancı otlarına *Solanum melongena* bitkisine başarıyla taşınmıştır (Foissac ve ark., 2008).

Badem ağaçlarını enfekte eden fitoplazma hastalıkları şiddetli ürün kaybına sebep olmaktadır. Yaklaşık 20 yıldır yapılan çalışmalar, bu hastalığı erken dönemde saptayıp, zararlı etkilerinin önlenmesine yöneliktir. Fransa, İtalya, Almanya, Amerika, İran ve Lübnan'da bu hastalığın tespiti ve kontrolüne yönelik geniş araştırmalar yapılmıştır. Lübnan ve İran'da yakın tarihte bademi enfekte eden bu fitoplazmanın tespit edilmiş olması ülkemizde de bu hastalığın görülebileceğini bizi düşündürmektedir. Fitoplazmaların ayırımı ve saptanması, hastalığın teşhisi için gereklidir. Bu prokaryotlar *in vitro* olarak kültüre alınamadığından alternatif metodlar kullanılmak zorundadır. Geçmişte bu amaç için hem DNA hibridizasyonu hem de serolojik yöntemler kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR), bitki ve böcek konukçularındaki fitoplazmayı belirlemek için daha çok yönlü bir yöntem olduğundan günümüzde tercih edilmektedir. Fitoplazma genomunun fitoplazmaya özgü 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen fragmanlardan PCR primerleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte 16S rRNA genomuyla ilişkili olan fitoplazmaların birbirine benzer olması bu fitoplazmaların ayırt edilmesini zorlaştırmıştır. Son yıllarda fitoplazmaların ayırımını sağlayan bölgenin 16S ve 23S rRNA genom bölgesi olduğunu saptanmış ve ana fitoplazma gruplarını ayırt etmeyi sağlayacak spesifik genom bölgelerine özgü PCR primerleri geliştirilmiştir. Bu teknik epidemiyolojik çalışmalar, vektör ilişkilerinin analizi ve hastalığın kontrolüne yönelik strateji geliştirilmesi açısından önemlidir (Smart ve ark., 1996). Günümüzde halen fitoplazmaların tespitinde evrensel ve spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda, Kahramanmaraş'ta ev ve kapama bahçelerinde mevcut *Badem cadı süpürgesi* hastalığının simptomatolojik olarak gözlemlerinin yapılması, simptomlu veya simptomsuz olduğu düşünülen ağaçlardan alınan örneklerin hastalık etmenine spesifik hazırlanmış primer dizinleriyle PCR yöntemi kullanılarak tanısının yapılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bitki floem dokusunu ve böcekleri kolonize eden hücre duvarı olmayan, heliks yapıda olmayan prokaryotların kolektif adı olarak fitoplazma ismi kabul edilmiştir. *In vitro*'da fitoplazmalar henüz daha kültüre alınamamıştır. Farklı genlere dayalı filogenetik analizler fitoplazmaların mollicutes sınıfı altında farklı monofiletik sınıfta bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmada *Candidatus* (Ca.) *phytoplasma* ile fitoplazmaların birbirine uygun olduğu öne sürülmüştür. Bu çalışma *Ca. phytoplasma* taksonunun özelliklerini tarif etmektedir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Fitoplazma türleri ve sebep oldukları hastalıkları

<i>Ca. phytoplasma aurantifolia</i>	Prokaryot associated witches'-broom disease of small-fruited acid lime
<i>Ca. phytoplasma australiense</i>	Australien grapevine yellows
<i>Ca. phytoplasma fraxini</i>	Ash yellows
<i>Ca. phytoplasma japonicum</i>	Japanese hydrangea phylody
<i>Ca. phytoplasma brasiliense</i>	Hibiscus witches'-broom in brasil
<i>Ca. phytoplasma castaneae</i>	Chestnut witches'-broom in korea
<i>Ca. phytoplasma asteris</i>	Aster yellows
<i>Ca. phytoplasma mali</i>	Apple proliferation
<i>Ca. phytoplasma phoenicium</i>	Almond lethal disease
<i>Ca. phytoplasma trifolii</i>	Clover proliferation
<i>Ca. phytoplasma cynodontis</i>	Bermuda grass white leaf
<i>Ca. phytoplasma ziziphi</i>	Jujube witches'-broom
<i>Ca. phytoplasma oryzae</i>	Rice yellow dwarf

Altı hastalık *candidatus* türüne ilave edilmesine rağmen taksonomik adlandırma yapılmamıştır.

1. Şeftali X hastalığı
2. Asma flavescence doree
3. Orta Amerika Hindistan cevizi ölüm sarılığı
4. Hindistan cevizinde Tanzanya ölümü
5. Hindistan cevizinde Nijerya ölümü
6. Loofah cadı süpürgesi

Diğer *Ca. phytoplasma* türlerine 16SrRNA gen dizisi %97,5'dan fazla benzemesine rağmen farklı biyolojik, fitopatolojik ve genetik özellikleri ile karakterize başka türler farklı organizmalar olarak adlandırılmalıdır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. *Candidatus phytoplasma* türü olmasına rağmen farklı biyolojik, fitopatolojik ve genetik özelliği olan diğer türler

<i>Ca. phytoplasma pyri</i>	Pear decline (PD)
<i>Ca. phytoplasma prunorum</i>	European Stone fruit yellows
<i>Ca. phytoplasma spartii</i>	Spartium witches' broom
<i>Ca. phytoplasma rhamni</i>	Buckthorn witches' broom
<i>Ca. phytoplasma allocasuarinae</i>	Allocasuarina yellows
<i>Ca. phytoplasma ulmi</i>	Elm yellows

Sonuç olarak bazı organizmalar 16SrRNA gen dizilerin diğer *candidatus* türlerine %97,5'in altında benzerlik göstermesine rağmen tüm özellikleri tam anlayamadığından

candidatus türü olarak halen adlandırılmamaktadır (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma working team, 2004).

Mollicuteslerin moleküler teşhisi 16S ribozomal RNA (rRNA) genlerine spesifik hazırlanmış primerler kullanılarak yapılması mümkün olmuştur. Ökaryotların 16S-benzeri rRNA dizileri ya da öbakterlerin, mollicuteslerin ve hücre içi organellerin 16S rRNA dizilerini temel alarak beş çift PCR primeri sentez edilmiştir. Bu PCR primerleri değişik kütüre alınabilen veya kütüre alınamayan mollicuteslerin 16S rRNA genleri ile yüksek dizilim homolojisi, ökaryotik nükleer 16S-benzeri rRNA ya da hücre içi organellerinin 16S rRNA genleri ile de düşük dizilim homolojisi göstermektedir. Mollicutes'lere özgü DNA preparatları ile PCR uygulaması yapıldığında, uzun zincirli 16S rRNA genleri ve kısa zincirli 16S rRNA genlerinin değişken bölgeleri başarılı olarak çoğaltılmıştır. Aynı primerler *Escherichia coli* ve sağlıklı bitki DNA preparatları kullanıldığında ise çoğaltım yapmamıştır (Deng ve Hiruki, 1991).

Ahrens ve Seemüller (1992) 16Sr RNA gen dizisinin çoğaltıldığı PCR metoduyla mikoplazma benzeri bitki patojenlerinin DNA'larını saptamışlardır. Bu çalışmalarında *Cantharanthus roseus*'dan izole edilmiş MBO izolatları ile sistemin uygunluğunu test etmişlerdir. Tüm izolatlardan 24 döngü sonrasında çoğalma ürünü olan MBO DNA'sını elde etmişlerdir. Bu yöntemle enfekteli bitkiden alınan örneklerde ise 40 döngü sonrasında MBO'nın DNA fragmenti saptanmıştır. Simptom göstermeyen bitkilerdeki MBO varlığının, DNA çoğaltım işleminin yapıldığı RFLP analizi ile tespit edilebileceği gösterilmiştir. Bu yöntemle farklı *Prunus* türlerinde MBO varlığı ilk defa saptanmıştır.

Amerika ve İtalya'da doğal yollarla enfektelenmiş bağlarda, asma sarılığı hastalığı (Grapevine yellows) ile ilişkili MBO'ların zincirlerinin tespit ve ayırımında PCR ve PCR restriksiyon analizi ile çoğaltılmış DNA'lar kullanılmıştır. Asmayı enfekte eden MBO'ların 3 büyük grubu bu yolla tanımlanmıştır. Asma sarılığı hastalığını göz önüne alan bu çalışma farklı etiyolojiye sahip birçok hastalığın kompleks olduğunu göstermektedir (Prince ve ark., 1993).

Lorenz ve ark., (1995) *Apple Proliferation* (AP) ve *Pear decline* (PD) hastalıklarının sebebi olan fitoplazmaları teşhis etmek için ribozomal ve ribozomal olmayan DNA dizilerinden PCR primerleri hazırlamışlardır. PD enfekteli ağaçlardan alınan örneklerde, hedef DNA'ların çoğaltılmasını başlatan ribozomal bir çift primer (fU5/rU3) geliştirmişlerdir. Bu primerler aynı zamanda taksonomik olarak farklı olan diğer tüm fitoplazmalarda da rDNA'yı çoğaltmada başarılı olmuştur. AP, PD ve *European stone fruit yellows* (ESFY) ile ilişkili birbirine benzer olan fitoplazmaların tespiti için 16Sr RNA geninden köken alan grup spesifik bir çift primer (f01/r01) hazırlanmıştır. PD ajanının (fU5/ rU3) ve (f01/r01) primerleri kullanılarak PCR ile tespiti, 4'- 6 diamino 2-phenylindale florasen metodunu kullanarak yapılan mikroskopik tespite (DAPI) göre belirgin derecede daha hassastır. PCR ürünlerinden yapılan restriksiyon enzim analizi ile AP ve PD fitoplazmalarının ayırımı yapılmıştır. Bu çalışmada 3 çift ribozomal olmayan primer, AP yada PD enfekteli ağaçlardan fitoplazmik DNA'yı çoğaltmayı başarmıştır, ancak her iki patojeninde tüm zincirleri tespit edilememiştir (Lorenz ve ark., 1995).

Maixner ve ark., (1995) Alman Üzüm Sarısı hastalığı (*German grapevine yellows*-VK) ile ilişkili MBO'ların ribozomal serilerinin özgül çoğaltımını sağlayan PCR prosedürü

geliştirmişlerdir. Farklı bahçelerin farklı alanlarından toplanmış olan örneklerin başarılı çoğaltımı, hastalık ajanının nispeten homojen bir organizma olduğunu göstermiştir. *Convolvulus arvensis*, *Solanum nigrum* gibi bağlarda doğal olarak enfektelenmiş yabancı otlardan ve bağlardan toplanan *Hyalesther obsoletus* vektöründen hazırlanan template DNA'nın çoğaltımını başarmışlardır. Böceklerin asma fidanlarındaki beslenmesi ile patojene vektörlük yaparak bitkilerde tipik sarılık simptomunun geliştiğini göstermişlerdir.

Fitoplazmaları filogenetik gruplarına göre sınıflandırılması ve tanımlanmasını sağlayacak teşhis yönteminin geliştirilmesi için fitoplazmaların 16S-23S “intergenic spacer” bölgelerinin dizilim farklılığı avantajından yararlanılmıştır. SR dizilerinden hazırlanan 10 adet PCR primeri ile grup spesifik olarak DNA çoğaltımı sağlanmıştır. *Elm yellows*, *Ash yellows* ve *Pear decline* gibi bazı fitoplazma grupları için SR primeri ile 16S rRNA genini içine alan spesifik primer çifti oluşturulmuştur. Bu primer çiftleri spesifik fitoplazma gruplarına özgüdür ve başka diğer fitoplazma gruplarından PCR ürünlerini çoğaltmazlar. Korunmuş olan transfer RNA (tRNA)'yı sağlamlaştırmak için kullanılan primer dizinleri ve evrensel primer ile birlikte test edildiği tüm fitoplazmaların teşhisi güvenilir şekilde yapılmıştır. Bu primerlerin, arazi örneklerinde belirli gruptaki fitoplazmaların teşhisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Smart ve ark., 1996).

Carraro ve ark., (1998) ESFY'nin taşınması çalışmalarında araziden yada enfekteli bitkilerden yakalanmış *Cacopsylla pruni*'yi kullanarak fitoplazmayı Japon eriğine deneysel taşınmasını başarmışlardır. Enfeksiyöz psyllosların farklı grupları inoküle edilerek test edilen bitkilerin %89'unda enfeksiyon saptanmışlar ve hem nimflerin hem de erginlerin hastalığı aktarabileceğini göstermişlerdir. Kafese konulan böcekler test bitkilerine hastalığı çok hızlı nakletmişlerdir. Ortalama 4-5 aylık inkübasyon periyodu sonrası ilk test bitkileri tipik belirtileri göstermiştir. İnokulum kaynakları, test bitkileri ve vektörler fitoplazma varlığı açısından PCR ile gözden geçirilmiştir. Bitkilerden ve böceklerden alınan izolatlar deney sonucunda benzer restriksiyon profili göstermiştir. AP grubunun üyeleri olan PD ve ESFY'nin her ikisinin de *Cacopsylla spp.* ile taşındığını göstermişlerdir (Carraro ve ark., 1998).

Avrupa'daki sert çekirdekli meyve ağaçlarının şiddetli geriye ölüm hastalığı (*Severe decline diseases*) ile fitoplazmaların ilişkisinin spesifik olarak saptanması için PCR ile DNA çoğaltım yöntemini kullanılmıştır. PCR primerleri, ESFY fitoplazmasının ribozomal olmayan genomik fragmanının PCR sekans ürünlerinden elde edilen, kısmi dizilimine dayanılarak düzenlenmiştir. Yaklaşık 300'ün üzerinde sert çekirdekli örneğinden elde edilen toplam DNA'larının 237 bç'lik kısmının spesifik çoğaltılmasına dayalı PCR yöntemi geliştirilmiştir. Özellikle AP ve PD gruplarındaki fitoplazmalara benzeyen diğer fitoplazmalarla hastalanmış ya da sağlıklı kontrollerden alınmış olan DNA'larda hiçbir PCR ürünü saptanmamıştır. Fitoplazma enfeksiyonu tüm örneklerde evrensel ribozomal primerler kullanılarak PCR çoğaltımı ile kontrol edilmiştir. Spesifik ve evrensel primerlerle saptanma oranı %97 olarak tespit edilmiştir. ESFY fitoplazmaları, Fransa'nın en önemli sert çekirdekli üretim bölgelerinin olduğu 139 üretim alanından 114'ünde saptanmıştır. Yazın saptanan klorotik yaprak kıvrıcılığı benzeri tipik belirtiler ile kışın saptanan belirtiler fitoplazma varlığı açısından %95 oranında ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte belirtiler göstermeyen ağaçlardan alınan örneklerin % 51'inde fitoplazma saptanmışlardır (Jarausch ve ark., 1998).

PD, ESFY, Rubus stunt, *Picris echioides* (bristly oxtangue) yellows ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) phyllody hastalıklarına sebep olan fitoplazmalar sırasıyla doğal enfekteli bitkilerden deney konukçulara *Cantharanthus roseus* ve *Cuscuta* ssp (küsküt) aktarılmışlardır. Bu fitoplazmaların tanıları çoğaltılmış ribozomal DNA'nın kullanıldığı RFLP-PCR yöntemiyle yapılmıştır. Restriksiyon profilleri incelendiğinde *pamuk phyllody* ajanının, baklagil ve bezelye phyllody'ye sebep olan fitoplazmadan farklı olduğu ayırt edilmiştir. Oysa bu hastalığa daha önce *pamuk phyllody* adlı tek bir etmenden kaynaklı hastalık olduğu sanılmaktaydı (Marccone ve ark., 1999).

Fransız eriğinin (Prune d'Ente) 5 yeni yetiştirme alanında ve Frenk eriğinin (Reine claudie) yeni kolonilerinin yetiştirildiği 11 alanda ESFY fitoplazmaları sürgünlere inoküle edilerek 6 yıl boyunca konukçu reaksiyonu değerlendirilmiştir. Tüm test edilmiş *Prunus domestica* bahçelerinde ESFY enfeksiyonları PCR ve DAPI yöntemleri ile test edilerek hepsinin ESFY'ya duyarlı olduğu saptanmıştır. Yeni Fransız eriği (Prune d'Ente) bahçelerinin tamamının daha duyarlı olduğu, genellikle ESFY belirtileri gösterdiği ve %19 oranında ölümler meydana geldiği gözlenmiştir. Meyve ağırlığı belirgin derecede azalmıştır. Frenk eriği genotiplerinde hiç ölüm izlenmemiş ve sadece iki bahçede hafifi şiddette ESFY belirtileri gözlenmiştir (Jarausch ve ark., 2000).

Farklı sert çekirdekli türlerini enfekte eden ESFY fitoplazmasının genetik değişkenliğini tayin etmek için 927 bç ribozomal olmayan fragman kullanılmıştır. Bunun için 4 farklı Akdeniz ülkesinden 175 izolat, 7 adet restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan PCR-RFLP analizi ile test edilmiştir. ESFY fitoplazmasına ait hiçbir polimorfizm tespit edilmemiştir. Ama ESFY ve AP fitoplazmalarının homolog fragmanları arasında 18 restriksiyon alanının 12'sinde farklılık gösterdiği saptanmıştır. Fransız ESFY'sinin 846 bç olan bir fragmanı tespit edilmiştir. Bu ESFY fitoplazma dizisinin AP grubu fitoplazmaların nükleotid dizisi ile % 89,7 benzerlik gösterdiğini ifade etmektedir. Tüm dizinin G+C içeriği belirgin olarak düşük (%15,4), A+T içeriği ise yüksekti. Bu çalışmada Türkiye'de ESFY fitoplazmasının varlığı ilk olarak tespit edilmiştir. Ayrıca daha önce bildirilmemiş 5 farklı *Prunus* türünde de fitoplazma saptanmıştır. Bu çalışma farklı *Prunus* türlerini etkileyen ESFY fitoplazma izolatlarının genetik olarak homojen olduğunu, ancak AP fitoplazmasından ayırt edilebileceğini göstermiştir. Bu yüzden bunlar farklı taxonları temsil etmektedir (Jarausch ve ark., 2000).

Güneydoğu İngiltere'de bir bölgede badem ağaçlarını enfekte eden fitoplazma, florosan mikroskopu ve PCR ile tespit edilmiştir. Ağaçlardaki patojenler enfeksiyonundan kaynaklanan belirtiler değişkenlik gösterirken, bazılarında hiç belirti yok veya şiddetli belirtiler taşıyorlardı. 16S rRNA gen bölgelerinin çoğaltılmasını sağlayan grup spesifik primerlerin kullanıldığı PCR deneyleri, güney ve doğu Avrupa'da görülen ESFY izolatlarındaki fitoplazmalarla benzerlik gösterdiğini saptamıştır. Bu çalışma birleşik krallıktaki badem türlerinde fitoplazma varlığını bildiren ilk çalışmadır. Enfeksiyonun kaynağı ise bilinmemektedir. Meyve endüstrisi için ise bu yeni hastalık tartışılmaktadır (Davies ve Adams, 2000).

1994-1998 yılları arasında *Kayısı klorotik yaprak kıvrıcılığı* hastalığının yüksek oranda izlendiği güney ve güneybatı Fransa'daki kayısı yetiştirilen iki bölgede, ESFY fitoplazmasının konukçularını tanımlamak için arazi çalışması yapılmıştır. Ellibir farklı bitki türünden toplam 431 örnek, evrensel ve ESFY spesifik primerler kullanılarak PCR ile

test edilmiştir. Tipik ESFY semptomu gösteren 6 farklı yabancı badem türünde ve semptom göstermeyen *Rosa canina*, *Fraxinus excelsior* ve *Celtis australis* türlerinde fitoplazma enfeksiyonu tespit edilmiştir. Fitoplazmasının yayılmasında bu türlerin olası etkileri araştırıldığında *Rubus* spp. türlerinde, Avrupa'daki geriye ölüm semptomları görülen akçağaç ve karaağaçlarda elm yellows, alder yellows ve rubus stunt fitoplazmaları tespit edilmiştir. *Malva sylvestris*'de rubus stunt fitoplazma varlığı ilk defa gösterilmiştir. Ayrıca *Convolvulus arvensis*'te stolbur fitoplazması tespit edilmiştir. *Cornus sanguinea*'da ise daha önce hiç rapor edilmemiş bir fitoplazma tipi tespit edilmiştir. 16SrDNA-RFLP paternine göre bu yeni fitoplazma stolbur fitoplazma grubuna aittir (Jarausch ve ark., 2001).

Güney Fransa'da (Languedoc-Roussillon) 1994 ve 2000 yılları arasında badem ağaçlarını enfekte eden ESFY fitoplazması hakkında epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Hastalığın yayılmasına havadaki vektörlerin etkili olduğunu ve hastalığın başlangıçta yayılma oranlarının ise düşük olduğu saptanmıştır. ESFY'nin yüksek oranda enfekte ettiği kayısı bahçelerinden ve etrafından homopter familyasından olan 7000 böcek toplanmıştır. ESFY fitoplazmasının tespiti içinse, bunlardan 1000 tanesi, evrensel ribozomal ve ribozomal olmayan spesifik primerler kullanılarak yapılan nested-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Diğerleri ise test bitkilerine bulaştırılarak araştırılması için kafeslere yerleştirilmiştir. Yakalanmış olan hiçbir çekirge türünde PCR yöntemiyle ESFY fitoplazmasına rastlanmamıştır. Kayısı ağaçlarının anaç fidanları olan *Prunus domestica*, *P. cerasifera* ve *P. spinosa* üzerinde yakalanmış olan *Cacopsylla pruni* psyllid'inde ise fitoplazma tespit edilmiştir. Nested-PCR yöntemi kullanılarak, bir kayısı ağacında yakalanmış olan *Synophosis lauri*'de ESFY fitoplazmasını açığa çıkarmışlardır. Fransa'daki epidemiyoloji çalışmalarında ESFY fitoplazma vektörü olarak *Cacopsylla pruni*'nin rol oynadığı belirlenmiştir. İki yıl süresince nisan–kasım ayları arasında kayısı fidanları konukçu bitki olarak kullanıldığında hiçbir doğal bulaşma gözlenmemiştir. Fakat tüm yıl boyunca bahçede bırakılmış kayısı fidanlarının 50 tanesinin biri hariç hepsinde enfeksiyon gelişmiştir. Erken ilkbaharda ESFY enfeksiyonu, *Cacopsylla pruni*'nin hayat döngüsü ile doğal bulaşma sonuçları ortak görülmüştür (Jarausch ve ark., 2001).

ESFY fitoplazmasının 20 çeşidi şeftali, şeftali hibrid GF677 ve *P. marianna* GF 8/1 ağaçlarına aşılama yöntemi ile bulaştırılarak test edildiğinde, virulent etkilerinde belirgin farklılıklar olduğu görülmüştür. En virulent türler şeftali fidanlıklarındaki tüm ağaçları öldürmüştür. Hafif türler ise ölüme sebep olmamıştır ama orta dereceli yaprak semptomlarına ve ağacın direncinde azalmaya sebep olmuştur. Virulent özellik, genellikle patojen-sürgün kombinasyonuna dayanmaktadır ve sürgünün, patojenin esas konukçusu olduğu birçok vakada çok şiddetlidir. Sert çekirdekli meyve ağaçlarının direncini araştırmak için 23 adet fidan ESFY ile inoküle edilmiştir. *Prunus domestica* fidanlarından Ackermann, Brompton, P1275 ve *Prunus cerasifera* fidanından Myrabolan daha az etkilenmiştir. GF677, GF8/1 ve *P. insititia* fidanlarından St Julien A ve St Julien GF655/2 fidanlarında daha az hasar oluşmuştur. Istihara, *P. cerasifera* fidanından Myrabolan ve şeftali fidanları Higama ve GF305 az çok hassasiyet; Montclar fidanlığındaki şeftali ağaç ve fidanlarında, St Julien 2'de yüksek derecede hassasiyet izlenmiştir. Farklı fidanlıklardaki kiraz ağaçlarından Gisela 3 ve F 12/1 en az hassas çeşitlerdir. Oysa Gisela 1 ve Weihroot 158 ve Gisela 5 ise daha çok etkilenmiştir. Test edilmiş tüm kök ve filizlerde fitoplazmalar ya DAPI ya da PCR yöntemi ile test edilmiştir. Bununla birlikte saptanma sıklığı ve fitoplazma konsantrasyonları, hassas genotiplere göre dirençli konukçularda

genellikle daha azdır (Kison ve Seemüller, 2001).

ESFY fitoplazmasının *Cacopsylla pruni* vektörü ile taşınma parametrelerini inceleyen çalışmada seralarda, psyllid grupları kullanıldığında en az kazanım periyodu 2-4 gün, en düşük latent periyod 2-3 hafta ve en düşük inokülasyon periyodu ise 1-2 gün olduğu görülmüştür. Vektörler infektivitesini ölene kadar sürdürmektedirler. Doğal şartlar altında *C. pruni* infektivitesini kış boyunca ve devam eden bahar boyunca saklar. Diğer kış geldiği zaman ise böcek sert çekirdekli meyve ağacına ulaşmıştır ve infekte edebilecek kabiliyettedir. Araştırma *C. pruni* vektörünün ESYF fitoplazmasının devamlı taşıyıcısı olduğunu göstermiştir (Carraro ve ark., 2001).

Uzun yıllardır Avusturya'daki kayısı bahçelerinde, sürgünlerde görülen şiddetli geriye ölüm hastalığından etkilenen ağaçlardaki başlangıç belirtileri su ve besin kaynaklarının eksikliğine benzemektedir. Genel belirtiler yaprak kıvrıkcılığı, kloroz ve erken kırmızılaşma belirtilerini tarif etmektedir. Büyüme sezonunda ani ölümlere sebep olmaktadır. Küçük meyve oluşumu ve kurumuş yapraklar yine sonbahar boyunca devam etmektedir. ESYF fitoplazmasının 16SrXB alt grubuna ait fitoplazmalar, nested PCR/RFLP analizi ile Avusturya'nın 2 farklı bölgesindeki etkilenmiş ağaçlarda yüksek oranda saptanmıştır (Laimer ve ark., 2001).

ESFY infekteli bahçelere komşu kültüre alınmamış ağaçlarda ve kültürü yapılan sert çekirdekli meyvelerin izolasyonu sırasında, *P. spinosa*, *P. domestica* ve *P. cerasifera* türlerinin, ESYF fitoplazması tarafından enfekte edildiği saptanmıştır. Bu türler aynı zamanda ESYF ajanının vektörü olan *C. pruni* tarafından istila edilmişlerdir. Buna karşılık *P. avium*, *P. cerasus*, *P. mahaleb* gibi kültüre alınmamış türlerde ise patojen ve vektörü saptanmamıştır. Kontrollü şartlarda ESYF fitoplazmasının böceklerle ve aşılama ile bulaşmasının incelendiği çalışmalarla, arazide elde edilen bilgiler doğrulanmıştır (Carraro ve ark., 2002).

Lübnan'da sert çekirdekli meyvelerin sağlık durumlarını araştırmak amacıyla yürütülen arazi çalışmaları sırasında Bekaa bölgesinde badem ağaçlarında yaprak sararması, sürgünlerde geriye doğru ölüm belirtileri gözlenmiştir. Belirtilen belirtileri taşıyan bütün ağaçlarda karakteristik "cadı süpürgesi" oluşumu dikkat çekmektedir. Toplanan örnekler PCR yöntemiyle analiz edildiklerinde badem dokuları fitoplazma enfeksiyonu bakımından pozitif reaksiyon vermişlerdir. Çoğaltılan fitoplazma DNA'sı RFLP ile analiz edilmiş ve restriksiyon profillerinin Batı Avrupa'daki badem ağaçlarını enfekte eden fitoplazmalardan farklı olduğu saptanmıştır. Saptanan fitoplazmanın çoğaltılmış DNA analizleri sonucunda PPWB grubuyla yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu hastalık Bekaa vadisinin orta ve doğu kısımlarına yayılırken son arazi çalışmaları, bu hastalığın kuzey Lübnan'da hızlı bir şekilde ilerlediğini, çok şiddetli enfeksiyona sebep olduğunu göstermiştir. Raskifa ve Dair Amar bölgelerinin ise en çok etkilenen bölgeler olduğu ortaya konulmuştur (Choueiri ve ark., 2003).

Badem (*P. amygladus*), birçok Akdeniz ülkesinde kazançlı bir meyve olma özelliğini sürdürmektedir. Yakın zamanda Lübnan'daki badem ağaçlarını harap eden yeni bir hastalık bildirilmiştir. Hastalık birkaç yıl içerisinde bitkiyi öldüren, meyve ya da çiçeğin gelişmediği sürgünlerde cadı süpürgesi oluşumuna benzer gelişimi ile karakterize edilen belirtilerle ifade edilmektedir. Etmenin rRNA operon dizilimlerinin PCR ile

çoğaltılmasıyla ağaçlarda görülen hastalığın fitoplazma enfeksiyonundan kaynaklandığı saptanmıştır. RFLP analizleri ile de bu fitoplazmanın *Pigeon pea witches-broom* (PPWB) grubuna ait olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada semptomlu bitkilerdeki fitoplazma varlığı elektron mikroskopu ile doğrulanmıştır. Bu fitoplazma badem, erik ve şeftali fidanlarına aşı ile taşınmaktadır. Bu fitoplazmanın özelliği rRNA dizilimi analizi ile araştırıldığında PPWB grubunda daha önce rapor edilen diğer fitoplazmalardan farklı olduğu saptanmıştır. 16SrDNA filogenetik ağacı, mollicutes sınıfının farklı bir alt sınıfının üyesi olarak badem ağacı fitoplazması tanımlanmıştır. Bu yeni fitoplazmanın tespiti için yeni oligonükleotid dizinler kullanılmıştır. Lübnan'daki badem fitoplazması İran'da *Almond brooming* olarak adlandırılan hastalığa sebep olan fitoplazma ile benzerlik göstermektedir. Bu benzerliklerinden dolayı İran ve Lübnan'daki *Almond witches' broom* ile ilişkili fitoplazmanın *Candidatus ph. phonicium* olarak adlandırılması önerilmiştir (Verdin ve ark., 2003).

Ürdün'de, Al-Jubiha ve Homret bölgelerindeki şeftali ağaçlarında Aster Yellows fitoplazması saptanmıştır. Enfekteli ağaçların yapraklarında sararma, kızarma ve düzensiz ıslak lekeler izlenmiştir. Şiddetli enfeksiyonlarda yapraklar ve meyveler olgunlaşmadan dökülmüştür. Tüm semptomlu şeftali ağaçlarından, R16F2/R2'yi takip eden P1/P7 evrensel primerlerinin kullanıldığı nested-PCR yöntemiyle fitoplazmalar saptanmıştır. Semptom gözlenmeyen şeftalilerden ise PCR ürünleri elde edilememiştir. Endonükleaz *AluI*, *HpaII*, *KpnI* ve *RsaI*'nin kullanıldığı RFLP analizinde tüm örnekler için aynı restriksiyon profili üretilmiştir. Bunlar Amerikan Aster Yellows (16SrI) fitoplazma zinciri ile aynıdır. Bu yayın Ürdün'deki şeftali ağaçlarının aster yellows fitoplazma tarafından etkilendiğini gösteren ilk yayındır (Anfoka ve Fattash, 2004).

Fitoplazmanın etken olduğu, AP, PD ve ESYF ekonomik olarak önemli olan bitki hastalıkları arasındadır. Filogenetik analizler bu patojenlerin her birinin 16SrDNA zincir dizilimlerinin aynı ya da birbirlerine çok yakın olduğunu ortaya koymuştur. Bu üç fitoplazma arasındaki nükleotid pozisyon farkları %1 ile %1,5 arasında değişmektedir. Bu yüzden %2,5'luk eşik değerin altındadır. *Candidatus* sınıfındaki fitoplazma türlerini ayıran fakat AP, PD ve ESYF ajanlarının türlerini ayırt edebilmek için destekleyen bilgiler, diğer moleküler markörlerin çalışılmasıyla elde edilmiştir. Bu üç fitoplazma serolojik olarak birbirinden ayrılır, vektörlerle taşınma ve konukçu geçişleri açısından belirgin farklılıklar gösterirler. Bu sonuçlardan AP, PD ve ESYF fitoplazmaları birbirlerine yakın türlerdir ama farklı taksondardır ve tür seviyesinde ayırt edilebilirler. *Candidatus phytoplasma mali*, *Candidatus phytoplasma pyri*, *Candidatus phytoplasma prunorum* isimleri sırasıyla teklif edilmiştir (Seemüller ve Scheneider, 2004).

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1 Survey ve Bitki Örneklerinin Toplanması**

Bu araştırma Kahramanmaraş'a bağlı köylerde kurulmuş olan ev ve kapama bahçeleri ile Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (K.S.Ü.) Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nün Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) araştırma projesi desteğiyle kurmuş olduğu Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Merkezi (SEKAMER)'nde yer alan badem, şeftali ve erik bahçelerinden alınan örneklerle yürütülmüştür. K.S.Ü. SEKAMER'deki badem plantasyonu 1999 yılında Çukurova Üniversitesi (Adana), Harran Üniversitesi (Şanlıurfa), Akdeniz (Merkez), Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü (Yalova)'nden sağlanan aşılı-tüplü fidanlarla tesis edilmiştir. Ağaçlar üzerindeki simptomatolojik gözlemler ve örnek toplanması çalışmaları 2007 yılı nisan ayından itibaren başlayıp, kasım ayının sonuna kadar sürmüştür. Araştırma materyalini oluşturan yaprak örnekleri ve odun çelikleri toplam 204 badem (123 örnek SEKAMER' den), 30 erik ve 30 şeftali ağacından alınmıştır. SEKAMER badem koleksiyon parselinden alınan bitki örnekleri Laurene, NK/111, Ferrognes, 48/2, Masbovera, Garrigues, Texas gibi badem çeşitlerini içeren ağaçlardan alınmıştır. Diğer örneklerin toplandığı köylerde bulunan ev bahçelerindeki badem ağaçlarının ve SEKAMER bulunan erik ve şeftali koleksiyon parselindeki ağaçlarının çeşitleri ise bilinmemektedir. İlkbahar ve yaz döneminde kapsayan (Nisan ve Ağustos ayları arasında ağaçlardan yaprak örnekleri, kış döneminde ise (Eylül ve Aralık ayları arasında) odun çelikleri örnek olarak alınmıştır. SEKAMER' den alınan örnek poşetlerinede ağaçların sıra üzeri ve ağaç numarası yazılmış; Kahramanmaraş'tan alınan örneklerle ise doğrudan numara verilmiştir.

Alınan örnekler buz kapları içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Toplanan örnekler DNA izolasyon işlemi yapılabilecek kadar +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Kahramanmaraş'a bağlı köylerdeki bahçeler ile K.S.Ü. SEKAMER koleksiyon parselinden alınan bitkisel örnekler

Bölge	Badem örnek sayısı	Erik örnek sayısı	Şeftali örnek sayısı
Ayaklıcaoğlu köyü	1	-	-
Gafarlı köyü	6	-	-
Yassıpınar	2	-	-
Ağyar yaylası	1	-	-
Bademli-I yaylası	20	-	-
Bademli-II yaylası	21	-	-
Kandıl	30	-	-
SEKAMER	123	30	30

3.2. Metot**3.2.1.Bitki Örneklerinden DNA İzolasyonu**

Örneklerle uygulanan DNA izolasyon işlemi aşağıda belirtildiği şekildedir. DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri ve hazırlanma yöntemleri Ek 1'de yer almaktadır.

(i) Araziden toplanan simptom gösteren ve göstermeyen badem yapraklarının orta damarları bisturi vasıtasıyla kesilip, her birinden 0,1 gr'lık örnekler hazırlanmıştır. Örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur.

(ii) Ependorf tüplere konulan örnekler, plastik çubuk vasıtasıyla 750 µl örnek ezme tampon çözeltisinden (Ek.1) eklenip vorteks de iyice karıştırılmıştır. Vortekslenen tüpler 60°C'de termoblok üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.

(iii) Bu işlemten sonra tüpteki örnekler 10000 devir/dak hızda 5 dak. santrifüj edilerek tüp içindeki sıvı iki faza ayrılır. Üstte kalan sıvı fazdan 750 µl sıvı alınıp 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Sıvı fazın üstüne eşit hacimde kloroform/isoamilalkol (24:1) eklenerek, tekrar vorteksleme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 14000 devir/dak hızda 10 dak. santrifüj edilir.

(iv) Üstte kalan sıvıdan 750 µl kadar alınıp eşit miktarda kloroform/eklenmiştir. Daha sonra vorteksleme işlemine tabi tutulup karışım 10000 devir/dak hızda 10 dak. santrifüj edilmiştir. Tüpte üstte kalan temiz sıvı kısımdan 500 µl alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.

(v) Sıvı örnekler üzerine eşit hacimde 500 µl kloroform eklenip, 10.000 devir/dak hızda 10 dak. santrifüj edilmiştir. Örneklerde DNA çökmesi -20°C'de 1 gün veya -80°C'de 2 saat bekletilip daha sonra 14000 devir/dak hızda 10 dak. santrifüje tabi tutulmuştur. Altta kalan çökelti üzerine 1 ml %70'lik etilalkol konularak yıkama yapılmıştır. Daha sonra 10000 devir/dak hızda 3 dak. santrifüj edilerek oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Kuruyan tüplerin herbirinin içerisine 50 µl steril deiyonize su eklenip, pipetle karıştırılarak homojen hale getirilip daha sonra -20°C'de PCR analizi yapılncaya kadar depolanmıştır.

İzole edilen DNA kalitesi % 1'lik agaroz jelde elektroforez vasıtası ile kontrol edilmiştir. Son hacimdeki DNA'ların 1/10'luk kısmı elektroforez analizi ile test edilmiştir.

3.2.2. PCR Analizi

İzole edilen DNA'lar ile PCR analizi badem cadı süpürgesine spesifik primerler (AlmF1/ AlmR1) ve fitoplazma evrensel primerleri (P1/P7) kullanılarak analiz edilmiştir.

AlmF1/AlmR1 spesifik primerleri kullanılarak hazırlanan PCR reaksiyonu toplam 20 µl içerisinde 5 µl DNA ile yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 2µl 10x termofilik buffer (Fermentas), 1.6 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas), 0,4 µl 10mM dNTP (Deoxynucleotidetriphosphate) 0.6 µl AlmF1/AlmR1 badem cadı süpürgesi fitoplazmasına

spesifik primerler, 0.2 µl *Taq* DNA polimeraz (Fermentas) enziminden ve 9.6 µl dH₂O'dan oluşmuştur.

P1/P7 evrensel primerleri kullanılarak hazırlanan PCR reaksiyonu toplam 20 µl içerisinde 3 µl DNA ile yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 2µl 10x termofilik buffer (Fermentas), 1.2 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas), 0,4 µl 10mM dNTP (Deoxynücleotidetriphosphate) 1µl P1/P7 evrensel primerleri, 0.2 µl *Taq* DNA polimeraz (Fermentas) enziminden ve 11.2 µl dH₂O'dan oluşmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan P1/P7 evrensel primer dizinleri ve badem cadı süpürgesi fitoplazmasına spesifik hazırlanmış primer dizinleri

Primer	5'den 3'e doğru	Moleküler büyüklüğü (bp)	Kaynak
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1831	Smart ve ark.,1996
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		
AlmF1	CCTTTTTCGGAAGGTATG	1512	Verdin, 2003
AlmR1	GATAACACGCTTAAGACG		

AlmF1/AlmR1 primerleri için kullanılan PCR reaksiyon profili termocycler'da (MJ Research, Texas); 94°C'de 2 dak. (ilk denatürasyon), 92°C'de 45 sn (denatürasyon), 53°C'de 45 sn (hibridizasyon), 72°C'de 60 sn (uzama), 35 döngü ve son uzama adımı da ise 72°C'de 5 dak. olarak belirlenmiştir.

P1/P7 primerleri için kullanılan PCR reaksiyon profili termocycler'da (MJ Research, Texas); 94°C'de 4 dak. (ilk denatürasyon), 95°C'de 30 sn (denatürasyon), 58°C'de 30 sn (hibridizasyon), 72°C'de 120 sn (uzama), 35 döngü ve son uzama adımı da ise 72°C'de 7 dak. olarak belirlenmiştir.

3.2.3. PCR Ürünlerinin Analizi

PCR ile çoğaltılmış olan DNA örneklerinin 10 µl lik miktarları %1 lik agaroz jel üzerinde elektroforez ile analiz edilmiştir. Elektroforez analizi 1x TAE (Ek1) tamponu kullanılarak 5v/cm de 90 dak. süreyle uygulanmıştır. Fragmentlerine ayrılmış olan DNA örnekleri etidium bromit (10mg/ml) boyamasından sonra ultraviyole üzerinde görselleştirilmiş ve fotoğrafı (GelDoc-It imaging system) çekilmiştir. DNA parçalarının büyüklüğü "250 bp DNA standartı "(Favorgen) kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Simptomatolojik Gözlem**

İlkbahar ve yaz dönemini kapsayan (Nisan-Ağustos) badem gelişim periyoduyla ve kış dinlenme döneminde (eylül-aralık) ağaçlar gözlem altına alınarak belirtiler takip edilmiştir (Şekil 4.1). Ağaçlarda gözlenen başlıca olumsuzluklar sürgün uçlarında kuruma ve geriye doğru ölüm (Şekil 4.2), yapraklarda sararma ve küçülme (Şekil 4.3), meyvelerde renk değişikliği (Şekil 4.4), meyvelerde küçülme ve deformasyondur (Şekil 4.5). İlkbaharda en sık rastlanan semptom yaprak boyutlarında küçülme ve kıvrılma, yaz sonuna doğru yapraklarda kırmızılaşma ve beneklenme belirginleşmektedir. Meyve hasadının olduğu dönemde ise meyvelerde deformasyon, küçülme renk değişiklikleri gözlenmiştir. Kışın ise sürgün uçlarında çalılama benzeri belirtiler izlenmiştir. Ev bahçelerinde izlenen belirtiler benzer olarak SEKAMER koleksiyon parselindeki ağaçlarda da izlenmiştir. SEKAMER koleksiyon parselinde yabancı otlara ve vektörlere karşı mücadele yapılmasına rağmen diğer örneklerin toplandığı ev bahçelerinde bu zararlılara karşı belirgin mücadelenin yapılmadığı gözlenmiştir. Yine aynı şekilde SEKAMER koleksiyon parselinde ağaçların düzenli bakım ve sulamaların yapıldığı buna karşın ev bahçelerinde ise rastgele bir bakım ve sulama sisteminin olduğu izlenmiştir. Ayrıca sağlıklı görünümde olan bitkiler ve hasta görünümlü ağaçların genel görünüşleri arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Simptomatolojik gözlem sırasında 8 farklı lokasyonun tümünde de bazı ağaçlarda bu görünüş bozuklukları saptanmıştır. Ancak saptanan belirtilerin şiddetinin ise çok çeşitli olduğu izlenmiştir. Bazı ağaçlarda hafif belirtiler mevcutken bazılarında daha ağır belirtiler mevcuttu. Hatta bazı badem ağaçlarında sebebi tespit edilemeyen ölümler izlenmiştir. Bölgede bu çalışmanın yapıldığı tüm badem çeşitlerinde (Laurenne, NK/111, Ferrognes, 48/2, Masbovera, Garrigues, Texas) simptomatolojik bulgular saptanmış olup, tüm bu sağlıklı ve hasta görünümlü badem ağaçlarından örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. SEKAMER Badem koleksiyon parselinden genel bir görünüş



Şekil 4.2. Ağaçlarda gözlenen başlıca olumsuzluklar sürgün uçlarında kuruma ve geriye doğru ölüm



Şekil 4.3. Yapraklarda sararma ve küçülme



şekil 4.4. Meyvelerde renk değişikliği



şekil 4.5. Meyvelerde küçülme ve deformasyon

4.2. PCR Analizi

Yapılan surveyde toplam 264 adet bitkiden alınan örneklerden izole edilen DNA'lar ilk olarak *badem cadı süpürgesi* hastalığına neden olan fitoplazmanın doğrudan teşhisi için fitoplazmaya spesifik hazırlanmış primerlerle (AlmF1/AlmR1) PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Kahramanmaraş'a bağlı köylerdeki ev bahçeleri ile K.S.Ü. SEKAMER badem koleksiyon parselindeki badem ağaçlarından alınan hiçbir örnekte fitoplazma enfeksiyonu gösterecek 1512 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmemiştir. Aynı DNA örnekleri olası başka fitoplazma enfeksiyonu araştırmak amacıyla evrensel primerler (P1/P7) kullanılarak PCR analizleri tekrar edilmiştir. Bu primerlerle de fitoplazma varlığını gösterecek 1831 bp büyüklüğünde DNA fragmenti elde edilmemiştir.

Deng ve Hiruki 1991 yılında, Ahrens ve Seemüller 1992 yılında, Prince ve arkadaşları ise 1993 yılında yaptıkları çalışmalarında MBO'ların zincirlerinin tespit ve ayırımında PCR analizi ile çoğaltılmış DNA'lar kullanmışlardır. Bu araştırmaların öncülüğünde PCR halen bu MBO'ların tespitinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Bizde bu çalışmamızda, bu patojenin tespitinde evrensel ve spesifik primerlerin kullanıldığı DNA çoğaltım yöntemi olan PCR yöntemini kullandık.

Verdin ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmalarında, mollicutes sınıfının farklı bir alt sınıfının üyesi olarak badem ağacı fitoplazması tanımlamışlardır. Bu yeni fitoplazmanın tespiti için yeni oligonükleotid dizinler kullanmışlardır. Ve bu çalışmada Lübnan'daki badem fitoplazması İran'da *Almond brooming* olarak adlandırılan hastalığa sebep olan fitoplazma ile benzerlik göstermiştir. Bu benzerliklerinden dolayı İran ve Lübnan'daki *Almond witches' broom* ile ilişkili fitoplazmanın *Candidatus ph. phonicium* olarak adlandırılması önerilmiştir. Biz de bu çalışmamızda Verdin ve arkadaşlarının kullandığı *Candidatus phytoplasma phoenicium*' a spesifik olan AlmF1 ve AlmR1 primerlerini kullandık. Yaptığımız surveylerde, Verdin ve arkadaşlarının tarif ettiği badem cadı süpürgesi oluşumuna benzer semptomların izlendiği badem ağaçlarından alınan örnekler, bu patojene spesifik primerler kullanılarak test edilmesine rağmen hastalık etmeni saptanmamıştır.

Smart ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları çalışmalarında, evrensel primer ile birlikte test edildiğinde fitoplazmaların teşhisinin güvenilir şekilde yapılabileceğini göstermişlerdir. Bu primerlerin, arazi örneklerinde belirli gruptaki fitoplazmaların teşhisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, Smart ve arkadaşlarının tarif ettiği P1 ve P7 evrensel primerleri kullanılarak tüm bitki örnekleri ayrıca test edilmiştir. Fakat bu primer ile de herhangi bir fitoplazma ajanı tespit edilmemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Badem cadı süpürgesi hastalığı 1995 yılında ilk olarak İran'da "badem süpürgesi (Almond brooming)" hastalığı olarak bildirilmiştir. Aşılama ile taşınması, tetrasiklin ve dienes boyama tedavilerine olumlu cevap vermesi, bu hastalığın fitoplazma enfeksiyonundan kaynaklandığı kanaatini oluşturmıştır. Badem süpürgesi hastalığını taşıyan İran'daki badem ağaçlarında fitoplazma PCR yöntemiyle 2000 yılında teşhis edilmiştir. Lübnan'da 2001-2002 yıllarında badem ağaçlarında benzer hastalığın epidemi yaptığı bildirilmiştir ve 2003 yılında bu fitoplazma ajanı *Candidatus phytoplasma phoneicium* olarak adlandırılmıştır. Bunu takiben 2006 yılında yine İran'da badem ağaçlarını etkileyen 2 farklı fitoplazma tanılanmıştır. Cadı süpürgesi hastalığı ile de ilişkili olan bu yeni fitoplazma aynı zamanda 2001 yılında İtalya'da Marccone tarafından tespit edilmiş olan *Knautia arvensis* phylloidy (KAP) nin ajanı ile yakın ilişkilidir.

Lübnan ve İran'da 1990'lardan sonra badem cadı süpürgesi hastalığı ile badem üretimi ciddi şekilde zarar görmüştür. Ülkenin güneyinde epidemi başlangıcından itibaren, Lübnan'da son 15 yıl içerisinde binlerce badem ağacı ölmüştür. Her iki ülkede de hasta badem ağaçlarında gözlenen semptomları kök ve gövdeden başlayarak güçsüzleşen dalların artması ve cadı süpürgesi oluşumunun belirginleşmesini kapsamaktadır. Bu semptomlar ağaçların budanmasıyla şiddetlenmektedir. Ağaçlarda aynı zamanda yaprak boyutlarının küçülmesi ve sararması, büyümenin engellenmesi, geriye ölüm, sezon dışı büyüme, yaprak rozetleşmesi ve erken çiçeklenme görülür. Ağaçların ya da dalların etkilenen kısımları az meyve verir ya da hiç meyve vermez. Badem cadı süpürgesine neden olan fitoplazmanın doğal konukçusu kültüre alınmış bademler (*P. dulcis* syn.*P. amygladus* ya da *amygdalus communis*) ve yabani bademdir (*P. orientalis*). Ancak Lübnan'da bu fitoplazma *amygladus* alt grubunda olan şeftalide (*P. persica*) ve nektarin'de de (*P. nucipersica*) saptanmıştır. Aşılama uygulamaları fitoplazmanın badem, şeftali ve nektarin ağaçlarına bulaşması ve yayılmasını sağlamıştır. Ama hastalık hiçbir şekilde, prunus ve cerasus altgrup üyeleri olan kayısı, erik ve kiraz ağaçlarına bulaştırılamamıştır. Deneysel küsküt metoduyla *Catharanthus roseus* yabancı otlarına *Solanum melongena* bitkisine Lübnan'da hastalığını taşınması başarılmıştır.

Badem ağaçlarını enfekte eden fitoplazma hastalıkları ürün kaybına sebep olmaktadır. Yaklaşık 20 yıldır yapılan çalışmalar, bu hastalığa neden olan fitoplazmanın erken dönemde saptanıp, zararlı etkilerinin önlenmesine yöneliktir. Fransa, İtalya, Almanya, Amerika, İran ve Lübnan'da bu hastalığın tespiti ve kontrolüne yönelik geniş araştırmalar yapılmıştır.

Fitoplazma hastalığının semptomları belirli antibiyotik uygulamaları ile hafifletilebilir veya ertelenebilir. Fakat bu yaklaşım genellikle pratik değildir. Bitkiler bu yöntemle gerçekte tedavi edilmez, tedavi uygulamalarına son verildiği zaman bitkilerde tekrar semptomlar ortaya çıkar. Antibiyotikleri toprağa ve yapraklara uygulama yöntemi etkili değildir. Ağaçlar için gövde içine enjeksiyon çok daha etkilidir. Enfekte bitkiler veya dormant çoğaltım materyalleri (çelik) termoterapi yöntemi ile fitoplazmadan arındırılabilir. Bu teknik ülkeye ithal edilen meyve fidanlarında şüpheli fitoplazma enfeksiyonu olduğunda karantina alanlarında kullanılır. Fitoplazma hastalığından korunabilmenin en güvenilir yolu dayanıklı bitki çeşitlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesidir. Hastalığın kontrolünde; bitkilerin fitoplazmadan arı olarak üretilmesi, yabancı ot konukçularının yok

edilmesi, semptomlu bitkilerin yok edilmesi, hastalıklı alanlara yakın alanlara hassas bitkilerin ekiminden kaçınılması, bitkilerde vektör kontrolü yapılması, erken sezonda yabancı ot kontrolü yapılması ve hastalığa daha dayanıklı bitki çeşitleri kullanılması önerilmektedir (Welliwer, 1999).

Lübnan ve İran'da yakın tarihte bademi enfekte eden bu fitoplazmanın tespit edilmiş olması ve ülkemizde bitkisel materyallerin ulusal ve uluslararası boyutta taşınmasında kontrol mekanizmasının yeterli olmamasından dolayı hastalığın yakın çevremizde görülebileceğini bize düşündürmüştür. Nitekim Jaraush ve ark., (2000) bir çalışmada Türkiye'de *Prunus* cinsindeki türleri enfekte eden ESFY fitoplazmasının varlığını ilk olarak göstermiştir. Yine Ankara ve Yalova illerindeki armut bahçelerinde görülen PD hastalığına neden olan fitoplazma enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu nested-PCR ve RFLP yöntemini kullanılarak yapılmıştır. Sipahioğlu ve ark., (2006) Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki illerde yaptıkları çalışmada sert çekirdeklielerde fitoplazma varlığını tespit etmişlerdir.

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalar ülkemizde *Prunus* cinsinde yer alan türlerde fitoplazma enfeksiyonlarının varlığını ortaya koymuştur. Kahramanmaraş ilindeki badem ağaçlarında badem cadı süpürgesi hastalığına neden olan fitoplazma enfeksiyonunu PCR yöntemiyle ile araştırdığımız bu çalışma, hastalığın yöredeki mevcudiyetini göstermeye yönelik önem taşımaktadır. Çalışmamızda Kahramanmaraş ev ve kapama bahçeleri ile SEKAMER badem, erik ve şeftali bahçelerindeki ağaçlardan alınan toplam 264 adet örnekten farklı dönemlerde alınan yaprak ve dormant çeliklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. PCR çalışmalarında öncelikle badem cadı süpürgesi hastalığına neden *Candidatus phytoplasma phoenicum* fitoplazmasını teşhis etmek amacıyla etmene spesifik hazırlanmış AlmF1/AlmR1 primer çifti kullanılmıştır. Analizler sonucunda toplanan badem, şeftali ve erik örneklerinde badem cadı süpürgesi etmeninin enfeksiyonlarının bulunmadığı tespit edilmiştir. Aynı örnekler olası diğer fitoplazma enfeksiyonlarını araştırmak üzere fitoplazma evrensel primerleri P1/P7 ile tekrar PCR'da analiz edilmişlerdir. Bu çalışmada da örneklerde fitoplazma enfeksiyonlarının olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda bu etmenin varlığının tespit edilmemiş olması hastalığın olmadığını anlamına gelmemektedir. Araştırma alanı genişletilerek özel tarım firmaları ve tarım bakanlığına bağlı enstitülere üreticilerden gelecek şikayetler değerlendirilerek badem ağaçları ile şeftali ve erik ağaçlarından yapılacak örnekleme sayısı da arttırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- ANFOKA, G.H., FATTASH, I. 2004. Detection and Identification of aster yellows (16SrI) Phytoplasma in Peach Trees in Jordan by RFLP Analysis of PCR Amplified Product (16S rDNAs). J.Phytopathology, 152: 210-214.
- AHRENS, U., SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of DNA of Plant Pathogenic Mycoplasma-like Organisms by a Polymerase Chain Reaction that Amplifies a Sequence of the 16S rRNA Gene. Phytopathology, 82: 828-832.
- ANONİM, 2000. Tarımsal Yapı v Üretim. T.C. Başbakanlık D.İ.E. Yayınları, Ankara.
- ANONİM, 2008. Türkiye Ziraatçılar Derneği sebze meyve raporu 2008.
http://www.ziraatcilerdernegi.org.tr/index.php?Itemid=143&id=111&option=com_content&task=view.
- CARRARO, L., OSLER, R., LOİ, N., ERMACORA, P., REFATTİ, E. 1998. Transmission of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. Journal of Plant Pathology, 80: 233-239.
- CARRARO, L., LOİ, 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., FERİNİ, F., ERMACORA, P., LOİ, N. 2002. Role of wild Prunus species in the epidemiology of European Stone fruit yellows, Plant Pathology, 51: 513-517.
- CHOUEİRİ, E., VERDİN, E., DANET, J.L., JREİJİRİ, F., EL-ZAMMAR, S., SALARD, P., BOVE, J.M., GARNIER, M. 2003. A Phytoplasma Disease of Almond in Lebanon. Options Mediterraneennes, serie B 45: 123-125 .
- DAVİES, D.L., ADAMS, A.N. 2000. European Stone fruit yellows phytoplasma associated with a decline disease of apricot in southern England. Plant Pathology, 49: 635-639.
- DENG, S., HIRUKİ, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14: 53-61
- DUNEZ, J. 1988. Fruit crop sanitation in the Mediterranean and Near east Region. Status and Requirements. FAO. United Nations Development Programme, s. 251-259.
- DUNEZ, J. 2000. Virus and virus-like diseases of stone fruits. Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Italy, 67 s.
- FOİSSAC, X., CHOUEİRİ, E., BOVE, J-M. 2008. Almond witches' -broom phytoplasma in coming Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits-APS.
- JARAUSCH, W., LANSAC, M., SAİLLARD, C., BROQUAİRE, J.M., DOSBA, F. 1998.

- PCR assay for spesific detection of European Stone fruit yellows phytoplasmas and its us efor epidemiological studies in France. Eur.J.Plantpathology, 104: 17-27.
- JARAUSCH, W., EYQUARD, P., LANSAC, M., MOHNS, M., DOSBA, F. 2000. Susceptibility and Tolerance of new French *Prunus domestica* Cultivars to European Stone Fruit Yellows Phytoplasmas. J.Phytopathology, 148: 489-493.
- JARAUSCH, W., SAÏLLARD, C., BROQUAÏRE, J.M., GARNIER, M., DOSBA, F. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European Stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. Molecular and Cellular Probes, 14: 171-179.
- JARAUSCH, W., DANET, J.L., LABONNE, G., DOSBA, F., BROQUAÏRE, J.M., SAÏLLARD, C., GARNIER, M. 2001. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll(ACLR) in southern France and implication of Cacopsylla as a vector of European Stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. Plant Pathology, 50: 782-790.
- JARAUSCH, W., JARAUSCH -WEHRHİM, B., DANET, J.L., BROQUAÏRE, J.M., DOSBA, F., SAÏLLARD, C., GARNIER, M. 2001. Detection and İdentification of European Stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. European Journal of Plant Pathology, 107: 209-217.
- KİSON,H., SEEMÜLLER, E. 2001. Differences in Strain Virulence of the European Stone Fruit Yellows Phytoplasma and Susceptibility Fruit Trees on Various Rootstocks to this Pathogen. J.Phytopathology, 149: 533-541.
- KÜDEN, A.B., KÜDEN, A. 2000. Badem Yetiştiriciliği. TÜBİTAK TARP Yayınları. Ankara,18s.
- LORENZ, K.H., SCHEİNER, B., AHRENS, U., SEEMÜLLER, E. 1995. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. The american Phytopathological Society, 85:7.
- LAİMER DA CAMARA MACHADO, M., PALTRİNİERİ, S., HANZER, V., ARTHOFER, W., STROMMER, S., MARTİNİ, M., PONDRELLİ, BERTACCİNİ, A. 2001. Presence of European Stone fruit yellows (ESFY or 16SrX-B) phytoplasmas in apricots in Austria. Plant Pathology, 50:130-135.
- MAİXNER, M., AHRENS, U., SEEMÜLLER, E. 1995.Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. European Journal of Plant Pathology, 101: 241-250.
- MARCONE, C., HERGENHAN, F., RAGOZZİNO, A., SEEMÜLLER, E. 1999. Dodder Transmission of Pear Decline, European Stone Fruit Yellows, Rubus Stunt, Picris echioides Yellows and Cotton Phyllody Phytoplasmas to Periwinkle.

- J. Phytopathology, 147: 187-192.
- PRINCE, J.P., DAVIS, R.E., WOLF, T.K., ING MING LEE, MOGEN, B.D., DALLY, E.L., BERTACCINI, A., CREDI, R., BARBA, M. 1993. Molecular Detection of diverse Mycoplasma-like Organism (MLOs) Associated with Grapewine Yellows and Their Classification with Aster Yellows, X-Disease, and Elm Yellows MLOs. Phytopathology, 83:1130-1137.
- SEEMÜLLER, E., SCHEINER, B. 2004. Candidatus Phytoplasma mali Candidatus Phytoplasma pyri and Candidatus phytoplasma prunorum, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European Stone fruit yellows, respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1217-1226.
- SİPAHIOĞLU, H. M., DEMİR, S., MYRTA, A., AL RWAHNİH, M., POLAT, B., SCHENA, L., USTA, M., AKKOPRU, A., SELCUK, M., IPPOLITO, A., MİNAFRO, A., 2006. Viroid, phytoplasma, and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34:1-6.
- SMART, C.D., SCHEINER, B., BLOMQUIST, C.L., GUERRA, L.J., HARRISON, N.A., AHRENS, U., LORENZ, K.H., SEEMÜLLER, E., KIRKPATRICK, B.C. 1996. Phytoplasma-Specific PCR primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. Applied and Environmental Microbiology, 62(8): 2988-2993.
- THE IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM- PHYTOPLASMA TAXONOMY GROUP 2004. Candidatus Phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1243-1255.
- VERDİN, E., SALAR, P., DANET, J.L., CHOEİRİ, E., JREIJİRİ, F., EL-ZAMMAR, S., GELİE, B., BOVE, J.M., GARNIER, M. 2003. Candidatus Phytoplasma phoenicium sp.nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 833-838.
- WELLIVER, R. 1999. Diseases Caused by Phytoplasmas. Regulatory Horticulture, Plant Pathology, circular No:82,25(1): 17-22.

EKLER**EK:1****1. Fitoplazma DNA izolasyonun kullanılan tampon çözelti, pH 8.0 (100ml)**

Kimyasal	Miktar
CTAB (%2)	2 gr
NaCl (1,4M)	8,18 gr
EDTA (20Mm)	0,74gr
Tris-HCl (100Mm)	1,21 gr
*β-mercaptoethanol	% 2

Hazırlanan çözeltinin pH değeri ayarlandıktan sonra otoklav edilir ve +4°C’de muhafaza edilir.

*β-mercaptoethanol, çözelti hazırlandıktan sonra bitkisel örneklerde ezme işlemi yapılmadan az önce karışıma taze olarak eklenir.

2. TAE (50X) tampon çözeltisi , pH 8.0

Kimyasal	Miktar
Tris base	242 gr
Glacial acetic acid	57,1 ml
EDTA	18.5 gr

Yukarıda verilen miktarlar 1000 ml saf su içinde hazırlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kahramanmaraş' ta doğdu. İlköğretim ve Lise öğrenimini K.maraş' ta tamamladıktan sonra 2000 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitkisel Üretim Programına kayıt yaptırdı. 2005 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı anabilim dalında eğitimine devam etmektedir.