



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ARMUT YIKIM FİTOPLAZMASI '*Candidatus Phytoplasma pyri*' HASTALIĞININ AŞIYLA  
TAŞINMA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARKLI ANAÇ-ÇEŞİT  
KOMBİNASYONLARININ REAKSİYONLARI

ŞEFİKA YAVUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

TEMMUZ-2011



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ARMUT YIKIM FİTOPLAZMASI '*Candidatus Phytoplasma pyri*' HASTALIĞININ  
AŞIYLA TAŞINMA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE FARKLI ANAÇ-ÇEŞİT  
KOMBİNASYONLARININ REAKSİYONLARI

ŞEFİKA YAVUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

TEMMUZ-2011

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARMUT YIKIM FİTOPLAZMASI '*Candidatus* Phytoplasma pyri'  
HASTALIĞININ AŞIYLA TAŞINMA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE  
FARKLI ANAC-CESİT KOMBİNASYONLARININ REAKSİYONLARI

ŞEFİKA YAVUZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Mona GAZEL danışmanlığında hazırlanan bu tez 20/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

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

Bu tez enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No :**

Prof.Dr. Hüseyin GÖZÜBENLİ  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, TUBİTAK ve MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

**Proje No :** TUBİTAK 109O014, 04 Y 0107

**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

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar.....	5
2.2. Ülkemizde Yapılan Çalışmalar.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Fitoplazma Kaynağı.....	9
3.1.2. AY Fitoplazmasının Aşıyla Taşınma Etkinliğinin Ve Farklı Anaç-Çeşit.... Kombinasyonlarının Belirlenmesi.....	10
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. AY Fitoplazmasının Aşıyla Taşınma Etkinliğinin Saptanması.....	11
3.2.2. Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı ..... Reaksiyonlarının Belirlenmesi.....	12
3.2.3. Moleküler Çalışmalar.....	14
3.2.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu.....	14
3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Testleri.....	15
3.2.3.3. Jel Elektroforez.....	16
3.2.3.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PFUP) Analizi.....	17

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE DEĞERLENDİRME.....	18
4.1. Aşıyla Taşınma Etkinliğinin Saptanması.....	18
4.1.1. Aşıyla Taşınma Denemesinin PZR Sonuçları.....	20
4.1.2. Aşıyla Taşınma Denemesinin RFUP Analizleri.....	24
4.2. Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı .....	
Reaksiyonlarının belirlenmesi.....	27
4.2.1. Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı .....	
Reaksiyonlarının PZR Sonuçları.....	28
4.2.2. Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı .....	
Reaksiyonlarının RFUP Analizleri.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	38
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	47
EKLER.....	48
EK.1.....	48
EK.2.....	50

## ÖZET

**ARMUT YIKIM FİTOPLAZMASI ('*Candidatus Phytoplasma pyri*')  
HASTALIĞINA KARŞI AŞIYLA TAŞINMA ETKİNLİĞİNİN VE FARKLI  
ANAÇ-ÇEŞİT REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada armut yıkım fitoplazması (AYF, '*Candidatus Phytoplasma pyri*') hastalığının aşıyla taşınma etkinliği ve farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının bu hastalığa karşı reaksiyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece doğal koşullarda, vektörler dışında hastalığın taşınma ve yayılma yolları ile ilgili elde edilecek veriler AYF hastalığına karşı kontrol stratejileri geliştirmede yararlı olacaktır. Hastalığa karşı dayanıklı olarak bilinen BA-29 anacı üzerine enfekteli olarak bilinen kaynak bitkiden alınan gözler aşılanarak aşıyla taşınma etkinliği belirlenmiştir. Ayrıca dayanıklı olarak bilinen 3 farklı anaç (*Pyrus communis*, klonal anaçlardan BA-29 ve OHF 333) üzerine ülkemizde üretimi yaygın olarak yapılan yerli ve yabancı çeşitlerden (Deveci, Santa Maria, Williams ve Ankara) aşılama yapılmış ve bu kombinasyonların AY fitoplazmasına karşı reaksiyonları belirlenmiş; bunun yanında tüm bitkilere AY fitoplazması ile enfekteli olarak bilinen kaynak bitkiden alınan gözler de aşılanmıştır. Hem aşıyla taşınma denemesinde hem de anaç-çeşit kombinasyonlarında kullanılan tüm bitkiler belirli aralıklarla Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFUP) yöntemi ile testlenmiştir. Testleme sonuçlarına göre AYF'nın aşı ile taşınma oranı %8, anaç-çeşit kombinasyonlarının bu hastalığa karşı reaksiyonunun belirlenmesinde ise bu oran %4.861 olarak bulunmuştur. OHF 333 anacı üzerine aşı çeşitlerinde en yüksek PD enfeksiyon oranı saptanmıştır. Deveci çeşidi diğer çeşitlerden daha hassas bulunurken; Ankara çeşidinde herhangi bir enfeksiyon bulunamamıştır.

**2011, 51 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Armut, '*Candidatus Phytoplasma pyri*', anaç-çeşit kombinasyonu, aşı ile taşınma, PZR-RFUP.

**ABSTARCT****INVESTIGATION ON TRANSMISSION EFFICIENCY OF PEAR  
DECLINE PHYTOPLASMA ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ BY GRAFTING  
AND REACTIONS OF DIFFERENT ROOTSTOCK-SCION COMBINATIONS**

In this study, transmission efficiency of pear decline phytoplasma (PD, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’) by grafting and reactions of different rootstock-scion to disease were investigated. Thus, in natural conditions, the obtained data on dissemination and spread of this phytoplasma rather than vectors will be useful in order to develop control strategies to PD. Buds taken from an PD infected plant were grafted on BA-29 which is known resistant to disease and transmission efficiency by grafting were investigated. Furthermore, native and foreign cultivars (Deveci, Santa Maria, Williams and Ankara) which were intensively grown in our country were grafted on 3 different PD resistant rootstocks (seedling rootstock, *Pyrus communis* and clonal rootstocks BA-29 and OHF 333) and reactions of different rootstock-scion combinations to PD phytoplasma were determined and beside this all plants were grafted by buds taken from PD infected plant. All plants used in both experiments were periodically tested by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisims (PCR-RFLP). According to the obtained results, transmission rate of PD by grafting was detected as 8% and infection rate of different rootstock-scion combinations inoculated with this phytoplasma was detected as 4.861%. The cultivars grafted on the rootstock of OHF 333 were revealed the highest PD infection rate. The cultivar Deveci was found more sensitive than the other cultivars while the infection was not detected on Ankara cv.

**2011, 51 pages**

**Key words:** Pear, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’, rootstock-scion combinations, grafting, PCR-RFLP.

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

µl	Mikrolitre
AP	Apple proliferation
ASÇSF	Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması
AY	Armut yıkımı
bp	Baz çifti (base pair) mikoplazma
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Çift destile su
DAPI	4-6 diamidino-phenylindole
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
EÇSF	Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid
ESFY	European stone fruit yellows phytoplasması
EtBr	Etidyum bromid
g	Gram
ha	Hektar
HCl	Hidroklorik asit
IRPCM	Karşılaştırılmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi
KCl	Potasyum klorit
M	Molar
MBO	Mikoplazma benzeri organizma

#### IV

mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
PCR	Polimeraz chain reaction
PD	Pear decline
pmol	Piko mol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriction fragment length polymorphisim
RFUP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
sn	Saniye
TAE	Tris asetik asit-EDTA
UV	Ultraviyole

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

- Çizelge 3.1. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan denemede kullanılan anaç-çeşit isimleri ve sayıları
- Çizelge 3.2. Direkt ve Nested-PZR analizlerinde kullanılan universal ve Elma Çoklu Sürgün fitoplazması grubu fitoplazmaları için spesifik primer baz dizileri
- Çizelge 4.1. AY fitoplazmasının aşıyla taşınma denemesinde aşılanan tüm bitkilerden yapılan nested-PZR sonuçları
- Çizelge 4.2. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılannmış tüm bitkilerden yapılan nested-PZR sonuçları

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

- Şekil 3.1. Bursa'nın Gürsu ilçesinden alınan ve inokulum kaynağı olarak kullanılan AYF ile enfekteli ağacın genel görünümü
- Şekil 3.2. Temmuz-2009 döneminde AY fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile yapılan aşılama çalışması.
- Şekil 3.3. Aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi için tel seralarda kurulan denemenin genel görünümü
- Şekil 3.4. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan deneme bitkilerinin seradaki genel görünümü
- Şekil 4.1. AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aşılanmış bitkilerde süren aşılamanın görünümü
- Şekil 4.2. Aşı ile taşıma çalışmasında AYF inokulumu verilen bitkilerde gözlenen gelişme geriliği (solda) ve kontrol olarak kullanılan bitkinin genel görünümü (sağda)
- Şekil 4.3. Aşı ile taşıma çalışmasında AYF inokulumu verilen bitkilerde gözlenen ölümler (solda ve sağda) ve kontrol olarak kullanılan bitkinin genel görünümü (ortada)
- Şekil 4.4. Armut yıkım fitoplazmasının aşı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 1-19: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.5. Armut yıkım fitoplazmasının aşı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 20-38: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.6. Armut yıkım fitoplazmasının aşısı ile taşınma denemesinde bitki köklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 1, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 30, 32, 35, 40: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.7. Armut yıkım fitoplazmasının aşısı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak Nisan 2010'da yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas-SMO403), 3, 6, 7, 9, 12, 31, 34, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 58, 59: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.8. Aşısı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.9. Aşısı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.10. Aşısı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BfmI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

## VIII

- Şekil 4.11. Aşı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ppu21I* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.12. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılanmış bitkilerin genel görünümü
- Şekil 4.13. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 167-186: Testlenen armut örnekleri, AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), T4 (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.14. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 42-61: Testlenen armut örnekleri, AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), T4 (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.15. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 184: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kontrol, W: Su kontrol

- Şekil 4.16. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 208-214: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kotroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.17. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi denemesinde farklı bitki köklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 60, 64, 67, 76, 79, 128, 130, 132, 135, 137, 154, 165, 168, 170, 202, 214: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kotroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.18. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 98, 108, 114, 120, 123, 134, 136, 145, 153, 165, 167, 182, 186, 190, 196, 213, 215: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kotroller, W: Su kontrol
- Şekil 4.19. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 43, 44, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kotroller, W: Su kontrol

Şekil 4.20. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BfmI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.21. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ppu21I* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.22. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Şekil 4.23. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

## 1.GİRİŞ

Türkiye meyveciliğinde ve dış ticaretinde önemli yeri olan armut çeşitli iklim ve toprak koşullarında yetişebilen, bakımı kolay, iç ve dış pazarlarda iyi fiyat bulan, uzun süre ağaçta kalabilen ve depoda muhafaza edilebilen bir meyve türüdür.,

2009 yılı verilerine göre; ülkemizde armut (*Pyrus communis* L.) 33.060 ha alanda yetiştirilmekte ve 384.244 ton üretimi ile yumuşak çekirdekli meyveler içerisinde elma (*Malus communis* L.)' dan sonra 2. sırayı almaktadır (Anonim, 2009).

Armut ağaçlarında hastalık ve zararlılar ekonomik olarak önemli kalite ve verim kayıplarına neden olmaktadır. Zararlı böcekler, fungal ve bakteriyel hastalıklar değişik kimyasallar kullanılarak etkili bir savaşım yöntemi ile başarılı bir şekilde önlenabilmektedir. Ancak; virüs, viroid ve fitoplazma gibi hastalıklarla aynı şekilde kimyasal mücadele yapılamamaktadır.

Virüsler tarafından neden olduğu sanılan bazı bitki hastalıklarının morfolojik olarak insan patojeni olan mikoplazmalara benzeyen ve floemde kolonize olan prokaryotlarla ilişkili olduğu ilk kez 1967 yılında yapılan elektron mikroskop çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Doi ve ark., 1967). Bu tarihten sonra yüzlerce bitki hastalık tablosunun mikoplazma benzeri organizmalar tarafından neden olunduğu bildirilmiştir. Laboratuvar koşullarında gelişmeleri mümkün olmadığından son 10 yıla kadar çok az karakterize edilmiş, ribozomal rDNA baz dizisi tayininin mümkün olmasından sonra bitki floeminde ve böceklerde kolonize olan, hücre duvarından yoksun bu prokaryotların *Mollicutes* sınıfının içinde büyük bir monophyletic grup oluşturduğu görülmüştür. Bu patojenlerin tanısı 20 yıldan fazla bir süre mikroskopik gözlemler (DAPI boyama) ya da elektron mikroskopi yöntemleri ile yapılmıştır. Ancak, son 20 yıldır DNA-temelli teknolojilerin uygulanmasıyla prokaryotlar içerisinde farklı moleküler kümelerin ayırt edilmesi mümkün olmuştur. Karşılaştırmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi (IRPCM)'nin Bitki Mikoplazmaları Birimi bu gruba ait prokaryotları tanımlamak için 'fitoplazma' adını vermiş; '*Candidatus* Phytoplasma' cinsi önerilerek bu prokaryotların resmi sınıflandırılması yapılmaya başlanmıştır (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2004).

Fitoplazmalar büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, hücre duvarsız prokaryotlar olup polimorfiktir ve sadece canlı konukçu dokularında yaşayabilen obligat parazit canlılardır. Fitoplazmalar prokaryot canlıların *Mollicutes* sınıfında yer alırlar ve

dünyada yaklaşık 1000 kadar bitki türünde hastalıklar yapmaktadırlar. (Seemüller ve ark., 2002). Bitkilerin floem dokusunda, böceklerin vücut sıvısında çoğalan fitoplazmalar, böcek yumurtaları kanalıyla nesilden nesile taşınabilirler. İnsan ve hayvanları enfekte eden mikoplazmalardan 16S ve 23S ribozomal bölgeler arasında kalan boşluk bölgesi ile genetik olarak ayrılabilirler. Önerilen ilk fitoplazma tanılama ve sınıflandırma sistemleri vektörle taşınmadaki özelleşme, konukçu dizisi ve cezayir menekşesi gibi genel bir konukçudaki simptom oluşumları esasına dayanmaktadır. Önceleri poliklonal antiserum daha sonra da monoklonal antiserumların geliştirilmesi ile fitoplazma grupları arasında ilk farklılıkların ortaya konmasını sağlamıştır.

Fitoplazma teşhisi son yıllara kadar sadece serolojik olarak veya spesifik klonlanmış DNA problemleri ile yapılabilmekteydi. Genel ve güvenilir fitoplazma teşhis ve tanılama sistemini gerçekleştirmek için, korunmuş ribozomal fitoplazma bölgesi (16SrRNA) üzerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (Polimeraz Chain Reaction: PCR) / Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFUP) (Restriction Fragment Length Polymorphism: PFLP) ve Nested-PZR yöntemleri geliştirilerek uygulanmıştır. Bu teşhis yaklaşımları hızlı ve güvenilir yollarla fitoplazma ile ilgili hastalıkların epidemiyolojilerine ışık tutmuştur.

Meyve ağaçlarında ekonomik anlamda zarar yapan ve oldukça yaygın olan üç fitoplazma hastalığı bulunmaktadır. Bunlar: Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması (ASÇSF) (European stone fruit yellows; ESFY), Armut Yıkımı (AYF) (Pear decline=PD) ve Elma çoklu sürgün (EÇSF) (Apple Proliferation=AP) fitoplazması'dır. Bu üç hastalık ile ilgili son yıllarda yapılan ve patojenlerin korunmuş genlerini içeren 16SrDNA'sının baz dizilerinin tayini ve RFLP analizlerini içeren moleküler çalışmalara göre armutlarda PD fitoplazmasının, ESFY ve AP fitoplazmaları ile birlikte 'Apple proliferation (AP)' grubuna (16SrX) ait oldukları belirlenmiştir.

Son yıllarda fitoplazma grubu patojenlerin sınıflandırılması ve bilimsel isimlendirilmesi konusunda yapılan çalışmalar sonucunda ASÇSF şu anda *Candidatus Phytoplasma prunorum*, AYF *Candidatus Phytoplasma pyri*, EÇSF ise *Candidatus Phytoplasma mali* olarak adlandırılmaktadır (Seemüller ve Schneider, 2004).

AYF Kuzey Amerika, Afrika, Asya ve Avrupa'da armut yetiştiriciliği yapılan bir çok ülkede armutların en tahrip edici hastalığı olarak bildirilmiştir (OEPP/EPPO, 2007; Seemüller, 1989; Blomquist ve Kirkpatrick, 2002; Malinowski ve ark., 1996; Avinent

ve ark., 1997; Del Serrone ve ark., 1998; Marcone ve ark., 1999). AYF'nin iki tip simptomu gözlenmektedir; biri hızlı yıkım diğeri ise yavaş yıkım ya da yaprak kıvrılmasıdır. Bu etmenin farklı tipteki simptomlarının ortaya çıkışı anacın hassasiyetine ve kültürel uygulamalara özellikle de psillidlerin kontrol edilebilmesine bağlıdır. Hızlı yıkımlarda aşı bölgesindeki floem gelişme dönemi boyunca bitkiye gerekli besini gönderemeyecek kadar zarar görür, meyve gelişimi durur, meyve ve yaprak hızla solar. Bunu, yaprak yanması ve ölüm takip eder, ağaçlar genellikle birkaç haftada ölürlür. Yavaş yıkımlarda ise ağacın yavaş bir şekilde zayıflaması söz konusudur, uçlarda gelişimler azalır veya tamamen durur. Yapraklar az, küçük, açık yeşil, derimsi görünümlü ve uç kısımlarından hafifçe kıvrılmıştır. Bu yapraklar sonbaharda anormal olarak kırmızılaşır ve erken dökülürler. Patojen saldırısının ilk yıllarında çiçeklenme çok yoğundur, ancak daha sonra daha az çiçek oluşur, meyve tutumu azalır ve normal büyüklüğe ulaşamaz.

AYF armut yetiştiriciliği yapılan bir çok ülkede armutların en tahrip edici hastalığı olarak bildirilmiştir (Seemüller, 1989; Blomquist ve Kirkpatrick, 2002; Malinowski ve ark., 1996; Avinent ve ark., 1997; Del Serrone ve ark., 1998 Marcone ve ark., 1999). AYF şiddetinin anaç/kalem kombinasyonuna bağlı olarak değiştiği (Seemüller, 1989), etmenin aşıyla ve armut psillası *Cacopsylla pyri* ve *C. pyricola* (Carraro ve ark; 1998; Jensen ve ark., 1964) ile taşındığı saptanmıştır.

AYF'sının farklı anaçlar üzerine aşılı çeşitlerde değişik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Hastalık şiddetinin derecesinin enfekteli bitkilerde oldukça değişken olduğu ve kullanılan anaç-kalem kombinasyonlarına göre bu şiddetin değiştiği ortaya koyulmuştur (Seemüller ve ark., 1998). *Pyrus pyrifolia* ve *P. ussuriensis* üzerine aşılı armut ağaçlarında AYF' nın hızlı ölüme neden olduğu oysa *P. communis*, *P. betulifolia* ve *P. calleryana* üzerine aşılı armutlarda ise yavaş ölüm görüldüğü belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1998).

Ülkemiz ekonomisi için önemli olan armutlarda bugüne kadar AYF konusunda yapılan çalışmalar ön çalışma niteliğindeki sörvey çalışmaları olup, bu çalışmaların detaylandırılması ve ilave çalışmaların yapılması gerekmektedir. Armut üreticileri aşığızü alacakları bitkileri fitoplazmaların varlığı açısından testletme imkanına sahip olmadıklarından, enfekteli bitkilerden aşığızü alabilmekte ve bu etmenleri sağlıklı bitkilere bulaştırabilmektedir. Bunun sonucunda ise armut yetiştirilecek yeni alanlara bu

etmenlerin yayılmasına neden olabilmektedirler.

Bu çalışma ile ülkemizde AYF'nin hem aşı yoluyla taşınma etkinliğinin araştırılması hem de farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının bu etmene karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Yurt dışında yapılan çalışmalar

Geçtiğimiz son 25 yıla kadar fitoplazmaların sınıflandırılması ve birbirinden ayırt edilmesi, enfekteli bitkilerde oluşturdukları semptomlara, bitki ve böcek konukçularının spesifikliğı gibi biyolojik özelliklerine dayanılarak yapılyordu. Biyolojik özelliklerinin belirlenmesi uzun zaman almakta ve iş gücü gerektirmekte bazen de güvenilir olmamaktaydı (Lee et al., 1998). Moleküler yöntemlere dayalı analizler son yıllarda giderek artarak fitoplazmaların teşhisinde ve sınıflandırılmasında daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlamıştır.

AYF, EÇSF, *Rubus* bodurlaşma, *Picris echioides* (bristly oxtangue) sarılığı ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) phyllody hastalıklarına sebep olan fitoplazmalar sırasıyla doğal enfekteli bitkilerden deney ortamındaki konukçulara *Catharanthus roseus* (pervane çiçeğı) ve *Cuscuta* spp. (küsküt) aktarılmışlardır. Bu fitoplazmaların tanıları çoğaltılmış ribozomal DNA'nın kullanıldığı PZR-RFUP yöntemiyle yapılmıştır. Restriksiyon profilleri incelendiğinde pamuk phyllody vektörünün baklagil ve bezelye phyllody'e sebep olan fitoplazmalardan farklı olduğu ayırt edilmiştir. Oysa pamuk phyllody adlı tek bir etmeden kaynaklı hastalık olduğu sanılmaktaydı (Marccone ve ark., 1999).

AYF Kuzey Amerika, Afrika, Asya ve Avrupa'da armut (*Pyrus communis*) yetiştiriciliğı yapılan bir çok ülkede armutların en tahrip edici hastalığı olarak bildirilmiştir (OEPP/EPPO, 2007; Seemüller, 1989; Blomquist ve Kirkpatrick, 2002; Malinowski ve ark., 1996; Avinent ve ark., 1997; Del Serrone ve ark., 1998; Marccone ve ark., 1999). AYF şiddetinin anaç/kalem kombinasyonuna bağılı olarak değıştiğı (Seemüller, 1989), etmenin aşıyla ve armut psillası *Cacopsylla pyricola* (Jensen ve ark., 1964) ile taşındığı saptanmıştır. Avrupa'da yerli armut çeşitlerine ilaveten birçok yabancı armut türleri ve ayvaların AY fitoplazmasının konukçusu olduğu bildirilmiştir (OEPP/EPPO, 2007; Seemüller, 1989). AYF'nin psylla beslenmesi ve küsküt yolu ile Cezayir menekşelerine taşındığı belirlenmiştir (Kaloostian ve ark., 1971; Marccone ve ark., 1999).

*Pyrus pyrifolia* ve *P. ussuriensis* üzerine aşılı armut ağaçlarında AYF'nin hızlı ölüme neden olduğu oysa *P. communis*, *P. betulifolia* ve *P. calleryana* üzerine aşılı armutlarda ise yavaş ölüm görüldüğü belirlenmiştir (Seemüller ve ark., 1998).

Quince A anacı üzerine aşılı armutların AYF enfeksiyonuna daha hassas oldukları, Franco comune anacı üzerine aşılı William ve Decana del Comizio çeşitlerinin daha az hassas olduğu ve %29-43 oranında enfeksiyon görüldüğü, oysa Farold 40 ve Farold 87 üzerine aşılı William armut çeşitlerinde enfeksiyon oranının %57 olduğu ve fitoplazma pozitif ağaçların tümünün simptomsuz olduğu saptanmıştır (Pastore ve ark., 1998).

AYF'nın şiddetinin anaç ve üzerine aşılı olan çeşide bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. *P. communis*, *P. betulifolia*, *P. calleryana* ve *Cydonia oblongata* (ayva) üzerine aşılı ağaçlar AYF ile etkelenmişler, ancak bunlar AY fitoplazmasının en tolerantlarıdır, aşı noktasında ve taç kısmında (en az şiddette) geriye doğru ölüm belirtilerini göstermişlerdir. *P. ussuriensis* ve *P. serotina* gibi Asya anaçları üzerine aşılı olanların en hassas olduğunu ve ağaçta hızlı ya da ilerleyen geriye ölüm belirtilerinin görüldüğünü ve aşı noktasında belirgin bir kahverengi hat oluştuğunu saptamışlardır. Bu anaçların (AYF'nın bulunduğu bölgelerde) aşırı hassas oluşlarından dolayı artık kullanılmadığını bildirmişlerdir (Seemüller ve ark., 1998; Westwood ve ark., 1971).

Hastalığın şiddetinin derecesi enfektali bitkilerde değişken olduğunu; ve kullanılan anaç-kalem kombinasyonları ve çeşide göre bu şiddetin değiştiğini ortaya koymuşlardır (Seemüller ve ark; 1998).

AYF'nın vektörleri olan *C. pyri* ve *C. pyricola* (Carraro ve ark., 1998; Jensen ve ark., 1964) ile insektisit kullanarak mücadele etmek oldukça zor olup, hastalığın yayılmasını önlemede yeterli olmamaktadır. Enfeksiyon kaynaklarını uzaklaştırmak için hastalıklı ağaçların budanması gibi alınacak diğer önlemlerde yeterli etkiye sahip değildir. AYF kontrolünde en ümit verici yaklaşımın dayanıklı bitkilerin kullanımı olarak saptanmıştır. Fitoplazmalar bozulmamış floem kalbur borularında buldukları için patojenin, floemin dejenere olduğu toprak üstü aksamında kış aylarında azaldığını, bunun aksine fitoplazmaların fonksiyonel kalbur borularının tüm yıl boyunca köklerde yaşadığını, takip eden ilkbaharda ise köklerden sürgünlere yeniden kolonize olabildiğini bildirmişlerdir (Schaper ve Seemüller, 1982, Seemüller ve ark., 1984).

EÇSF'de olduğu gibi dayanıklı anaç kullanımının AYF mücadelesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Seemüller ve ark., 1992, 2008).

Geçtiğimiz yüzyılda (50'li ve 60'lı yıllarda) Güney Amerika'da meyve yetiştiriciliği yapılan Pasifik kıyılarında AYF hastalığına armut anaçlarının farklı reaksiyon verdiği yapılan ilk gözlemlerle belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda oriental anaçlar *P. pyrifolia* ve *P. ussuriensis* üzerine aşılı ağaçların hastalıktan oldukça etkilendiği ve çok sayıda ağaçta geriye doğru ölüm gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçların aksine bazı *P. communis* çeşitleri ve *P. betulifolia* çöğürleri üzerindeki ağaçların daha az etkilendiği ortaya koyulmuştur (Blodgett ve ark., 1962).

*P. communis* cvs. Old Home X Farmingdale'nin hibritlerinden elde edilen bitkilerde dayanıklılık gözlenmiştir. Böyle genotipler AYF'na dayanıklı olarak tanımlanmıştır. Aksine ithal edilen Fransız tohumlarından yetiştirilen *P. communis* çöğürlerine aşılı bitkiler hassasiyet göstermiştir (Westwood ve ark., 1976, Westwood ve Lombard, 1982).

AYF tahrip edici bir hastalık olup; psillidler ve aşı ile taşınmaktadır (Hibino ve ark., 1971, Davies ve ark., 1992, Carraro ve ark., 1998a). Bu hastalık dünyada armut yetiştirilen alanların birçoğunda yaygın olarak görülmektedir (Hibino ve Schneider, 1970, Schaper ve Seemüller, 1982, Davies ve ark., 1992, Guinchedi ve ark., 1994, Malinowski ve ark., 1996, Schneider ve Gibbs, 1997, Del Serrone ve ark., 1998, Marcone ve ark., 1999, Ember ve ark., 2004, Seemüller 1989, Nemeth 1986).

## 2.2. Ülkemizde yapılan çalışmalar

Günümüze kadar ülkemizde sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki fitoplazmaların saptanması konusundaki çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmış ve ilk simptomolojik bulgular Çağlayan ve Gazel (1999) tarafından bildirilmiştir.

Bursa ilinde ticari Deveci armut çeşitlerinden toplanan örneklerde ve bu bitkilerin üzerindeki armut psillidi *Cacopsylla pyri* L.'de armut yıkım fitoplazması saptanmıştır (Ulubas Serce ve ark., 2006).

Bursa ilinde yapılan ön çalışma niteliğindeki araştırmanın devamında patojenin hastalık oranı belirlenmiş ve testlenen 116 armut ağacının, % 52.58'inin AY fitoplazması ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Etmen testlenen Deveci, Santa Maria, Comice and William armut çeşitlerinde sırasıyla % 58.06, 48.57, 44.44 ve 40 oranında saptanmıştır (Gazel ve ark., 2007).

Ülkemizde yapılan bir diğer sörvey çalışması 2005-2006 yıllarında yürütölmüş ve Ankara ilinden 5, Yalova ilinden 6 armut örneği DAPI ve Nested-PZR / RFUP yöntemleriyle testlenerek örneklere tümünde AYF saptanmıştır (Canik ve Ertunç, 2007).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nden alınan 2 armut örneğinin bir tanesinde PZR/PFUP yöntemi kullanılarak AYF tespit edilmiştir (Sertkaya ve ark., 2005).

Armut çöğürü (*Pyrus communis* L.) üzerine aşılı Deveci çeşidinde 'Candidatus Phytoplasma pyri' enfeksiyonunun meyve kalitesi, toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasitesine olan etkisi araştırılmış ve meyve iriliğinin azaldığı, pH'nın arttığı, abortif ve sağlıklı tohum sayısında ve ağırlığında, suda çözülebilir kuru madde ve asiditede önemli bir değişiklik olmadığı, enfekteli kabuk dokusunda sağlıklı dokuya oranla toplam fenolik ve antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Gazel ve ark., 2010).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Fitoplazma kaynağı

Bu araştırmanın arazi çalışmaları Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünün Araştırma Tül Serasında (screenhouse), tüm testlemeler ise aynı bölümün Viroloji laboratuvarında yapılmıştır.

'*Candidatus Phytoplasma pyri*' inokulumu olarak Bursa'nın Gürsu ilçesinden sağlanan Deveci çeşidine ait bir bitki (Gazel ve ark., 2007) kullanılmıştır (Şekil 3.1). İnokulum kaynağı olarak kullanılan bu bitki önceki çalışmalarda AYF ile enfekteli olarak saptanmış olmakla birlikte bu çalışma kapsamında yeniden Nested-PZR ve RFUP ile testlenmiş ve AYF ile enfekteli olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.1. Bursa'nın Gürsu ilçesinden alınan ve inokulum kaynağı olarak kullanılan AYF ile enfekteli ağacın genel görünümü

### **3.1.2. AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliği ve farklı anaç-çesit kombinasyonlarının belirlenmesi**

AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi için ülkemizde yaygın olarak kullanılan klonal ayva anaçlarından BA-29 anaçları fidan üreten özel firmalardan sağlanmıştır.

Anaç-çesit kombinasyonlarının AYF'na karşı reaksiyonlarının belirlenmesi çalışmasında ise armut çöğürü (*Pyrus communis* L.), klonal anaçlardan BA-29 ve OHF 333 ile bu anaçlar üzerine aşılacak olan Deveci, Ankara, Williams ve Santa Maria armut çesitlerinin aşı kalemleri fidan üretimi yapan özel firmalarından sağlanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan tüm anaçlar ve çesitlerin alındığı ağaçlar testlenmiş ve AYF açısından negatif bulunmuştur.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin saptanması

AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin saptanması için Bursa'nın Gürsu ilçesinde bulunan ve AYF ile enfekteli olduğu saptanan armut ağacından alınan inokulumlar Temmuz 2009' da 50 adet BA-29 anacı üzerine durgun göz aşısı tekniği ile aşılanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Temmuz-2009 döneminde AY fitoplazması ile enfekteli ağaçtan alınan gözler ile yapılan aşılama çalışması.

AYF ile enfekteli olmayan sağlıklı armutlardan alınan aşıgözleri 2 adet anaca aşılanarak kontrol bitki olarak yetiştirilmiştir.

Aşılanan tüm bitkiler böcek girişlerinin engellendiği tül seralara alınmış ve düzenli olarak bakımları yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi için tel seralarda kurulan denemenin genel görünümü

### 3.2.2. Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi

Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının saptanabilmesi için MKÜ tül seralarında kurulan denemede armut çöğür anaçlarından (*Pyrus communis* L.), klonal anaçlardan BA-29 ve OHF 333 kullanılmıştır. Bu anaçlar üzerine sağlıklı Deveci, Ankara, Williams ve Santa Maria çeşitlerinden gözler alınarak inokulum etkinliğini arttırmak amacıyla Temmuz 2009, Mart 2010 ve Kasım 2010 olmak üzere toplam 3 kere aşılama yapılmıştır.

Her anaçtan 68 adet olmak üzere toplam 204 anaç toprak ve gübre karışımı içeren 15 litrelik saksılara dikilmiştir. Her anaç ise 17'şerli 4 gruba ayrılmış ve her grup üzerine Deveci, Ankara, Williams ve Santa Maria çeşitlerinden alınan gözler durgun göz aşısı tekniği ile Temmuz 2009 döneminde aşılanmıştır-

Farklı anaç-çeşit kombinasyonu ile elde edilen 17'şer grup bitkiden 2 tanesi kontrol bitki olarak ayrılmış ve toplam 180 (3 anaç × 4 çeşit × 15 bitki = toplam 180 bitki) bitkiye AY inokulumu verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan denemede kullanılan anaç-çeşit isimleri ve sayıları

<b>ANAÇLAR</b>						
<b>ÇEŞİTLER</b>	<b>Çögür Anacı</b>		<b>BA-29</b>		<b>OHF 333</b>	
	İNOKULUM VERİLEN	İNOKULUM VERİLMEYEN	İNOKULUM VERİLEN	İNOKULUM VERİLMEYEN	İNOKULUM VERİLEN	İNOKULUM VERİLMEYEN
<b>DEVECİ</b>	15	2	15	2	15	2
<b>ANKARA</b>	15	2	15	2	15	2
<b>WILLIAMS</b>	15	2	15	2	15	2
<b>SANTA MARIA</b>	15	2	15	2	15	2

İnokulum etkinliğinin arttırılması amacı ile Mart 2010 döneminde aynı 180 bitkiye sürgün göz aşısı tekniği ile aşılama yapılmıştır.

Son olarak fitoplazma konsantrasyonunun yoğun olduğu Kasım ayında (2010) aynı 180 bitkiye kabuk inokulasyonu yapılmıştır. Aşılanan tüm bitkiler böcek girişlerinin engellendiği tel seralara alınmış ve düzenli olarak bakımları yapılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan deneme bitkilerinin seradaki genel görünümü

### 3.2.3. Moleküler Çalışmalar

#### 3.2.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu

- DNA izolasyonu için 0.10-0.25 g yaprak orta damarı veya sürgünden kazınan doku örneği alınarak sıvı azotla ezilir.
- Doku erimedenden her örnek üzerine 1200 µl 2XCTAB, %1 mercaptoetanol, 2 µl RNase eklenerek 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılır.
- Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında veya 37 °C'de bekletilir.
- 500 µl chloroform oda sıcaklığındaki ekstrakta eklenir. Tüpler en az 1 dakika karıştırılarak 14.000 rpm'de 30-60 saniye santrifüj edilir.
- Üst faz yeni tüplere aktarılır ve üzerlerine 150 µl silica eklenerek 5 dakika karıştırılır.
- Tüpler maksimum hızda 2-3 saniye santrifüj edilir.

- Üstteki sıvı atılır ve tüplere ağzına kadar Silika yıkama buffer'ı eklenir. Yıkama buffer ile doldurulan tüpler vortex edilir ve 2-5 saniye. maksimum hızda santrifüj edilir.
  - Üstteki sıvı atılır.
  - Yıkama işlemi tekrar edilir.
  - Yapılan ikinci yıkamanın ardından tüpler 37 °C'de 10 dakika kurutulur.
  - 800 µl steril su ile DNA'lar sulandırılır. Sulandırılan DNA'lar 68 °C'lik su banyosunda 5 dakika tutulur ve ardından tüpler vortexlenir.
  - Tüpler maksimum hızda 2-3 saniye santrifüj edilir ve üstteki sıvı yeni tüpe aktarılır.
  - Tüplerdeki DNA'nın çökeltilmesi için 0.1 hacim (80 µl) 5M NaCl eklenir ve toplam hacme 0.666 hacim isopropanol eklenir.
  - Tüpler en az 1 dakika karıştırılır ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilip üstteki sıvı atılır.
  - 1 ml %70'lik soğuk alkol eklenir ve pelletin yerinden oynamamasına dikkat edilerek tüpler yavaşça alt üst edilerek alkol dökülür. Kısa bir santrifüjden sonra kalan sıvı pipetle alınır.
  - Tüpler 37 °C'de 20-30 dakika etüvde bekletilir.
  - Tüplere 30-200 µl steril su eklenir.
  - Tüpler PZR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilir (Rogstad, 1992).
- Ekstraksiyonda kullanılan tüm tampon çözeltilerin içerikleri EK 1'de verilmiştir.

### 3.2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testleri

İzole edilen DNA'ların PZR işlemi iki aşamada (direkt- ve nested-PZR) gerçekleştirilmiştir. (Lee ve ark., 1992). Direkt-PZR'da 1800 bp ürün veren P1 ve P7 primer çifti, Nested-PZR'de ise 1050 bp ürün veren F01 ve R01 primer çiftleri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizileri çizelge 3.2'de verilmiştir.

Direkt-PZR aşamasında nükleik asitler 1/50 oranında sulandırılarak hazırlanan karışımdan 1µl alınarak 24 µl'lik reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 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 oluşturulmuştur.

Direkt-PZR’dan sonra uygulanan Nested-PZR aşamasında F01/R01 primerleri kullanılmıştır. Direkt-PZR ürünleri 1/50 oranında sulandırıldıktan sonra, bundan 1 µl alınarak yeni hazırlanan reaksiyon karışımına eklenmiştir. Nested-PZR’da ise tüpler 94°C’de 2 dk; 94°C’de 30 sn denatürasyon, 55°C’de 30 sn. bağlanma, 72°C’de 1 dk uzama 35 döngü şeklinde gerçekleştirilmiş ve son uzama 72°C’de 5 dk olacak şekilde yapılmıştır. (Lee ve ark., 1998).

Çizelge 3.2. Direkt ve Nested-PZR analizlerinde kullanılan universal ve Elma Çoklu Sürgün fitoplazması grubu fitoplazmaları için spesifik primer baz dizileri

	Çoğalan DNA uzunluğu (bp)	Evrensel primerler	Baz dizimleri ve referans
Direkt-PZR	1800	P1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3' (Deng ve Hiruki, 1991)
		P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' (Smart ve ark.,1996)
Nested-PZR	1050	F01	5'-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3' (Lee ve ark., 1995)
		R01	5'- AGGTGCCCAACTAAATGAT-3' (Lee ve ark., 1995)

### 3.2.3.3. Jel Elektroforez

PZR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla ürünler %1.2’lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez 1XTAE ortamında gerçekleştirilmiş ve jelin hazırlanmasında da yine aynı ortam kullanılmıştır.

Jele 3 µl yükleme tamponu ile birlikte 12 µl Nested-PZR ürünü karıştırılarak yüklenmiş ve 120 Voltta 35 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Jelde ürünlerin yürütülme işlemi bittikten sonra jel 1 mg/µl Etidyum bromid içeren 1XTAE ortamında 3-5 dakika süreyle boyanmıştır.

Boyama işleminden sonra jeller UV transilluminatörde gözlenerek fotoğraflanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir (Lee ve ark. 1992). Jel elektroforezde kullanılan tampon çözelti, yükleme tamponu ve etidyum bromid’in içeriği EK 2’de verilmiştir.

#### 3.2.3.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFUP analizi)

PZR ürünlerinin RFUP analizleri amacıyla Nested-PZR sonucu referans izolatlarla aynı seviyede bant oluşturan fitoplazma pozitif örnekleri PZR ürünlerinden 5-15 µl'si restriksiyon endonükleaz enzimleri *RsaI*, *BfmI* (*SfcI*), *BsaAI* (*Ppu21I*) ve *SspI* ile kesilmiştir. PZR ürünleri firmanın önerileri doğrultusunda *BfmI* (*SfcI*) ve *SspI* enzimleri ile 37°C'de 1-16 saat, *BsaAI* (*Ppu21I*) enzimi ile 30°C'de 1-16 saat kesime tabi tutulmuştur.

Elde edilen restriksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş, ethidium bromide ile boyanmış ve sonuçlar UV trans-illuminatörde gözlenerek fotoğraflanmıştır.

Enzim kesimi sonucu pozitif kontrollerden AY fitoplazması ile aynı bant profili oluşturan örnekler AYF ile enfekteli olarak kabul edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışma ile armutlarda önemli kayıplara neden olan Armut Yıkım Fitoplazma hastalığı ile enfekteli armutlardan alınan aşı gözü kullanımı ile aşıyla taşınma oranları ve kullanılan farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının bu etmene karşı reaksiyonları araştırılmıştır.

##### 4.1. Aşıyla Taşınma Etkinliğinin Saptanması

AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi için 50 adet BA-29 klonal anacı üzerine Gazel ve ark. (2007) tarafından enfekteli olduğu belirlenmiş Deveci armut çeşidi ile yapılan aşılamalarda tüm aşıların tuttuğu ve sürdüğü saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. AY fitoplazmasının aşıyla taşınma etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aşılanmış bitkilerde süren aşıların görünümü

AYF inokulumu verilen bazı bitkilerde kontrol bitkilerine oranla gelişme geriliği saptanmış ancak AYF hastalığına spesifik tipik kızarma belirtileri gözlenmemiştir (Şekil 4.2). Ancak bu bitkilerin aşılardan yaklaşık 1,5 yıl sonra öldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Aşı ile taşıma çalışmasında AYF inokulumu verilen bitkilerde gözlenen gelişme geriliği (solda) ve kontrol olarak kullanılan bitkinin genel görünümü (sağda)

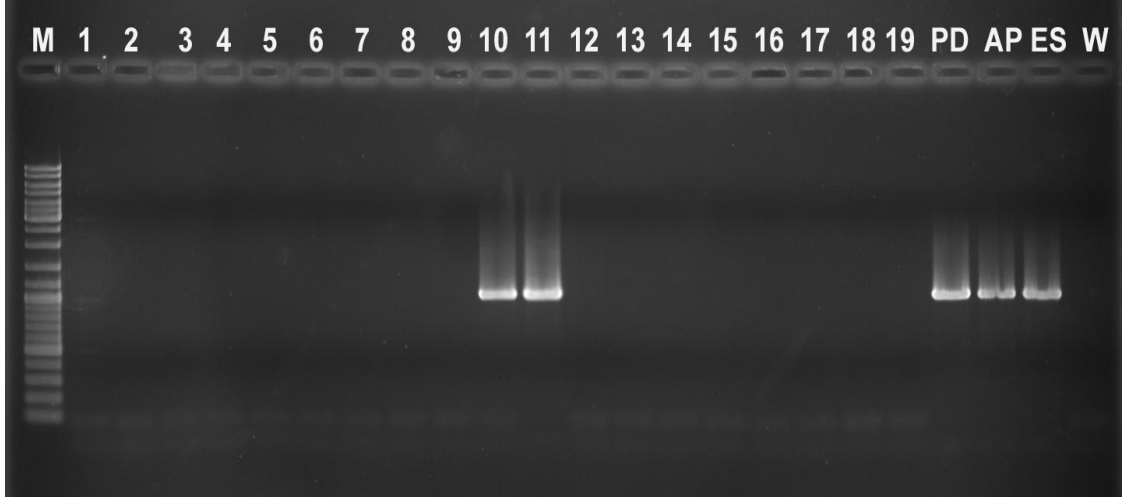


Şekil 4.3. Aşı ile taşıma çalışmasında AYF inokulumu verilen bitkilerde gözlenen ölümler (solda ve sağda) ve kontrol olarak kullanılan bitkinin genel görünümü (ortada)

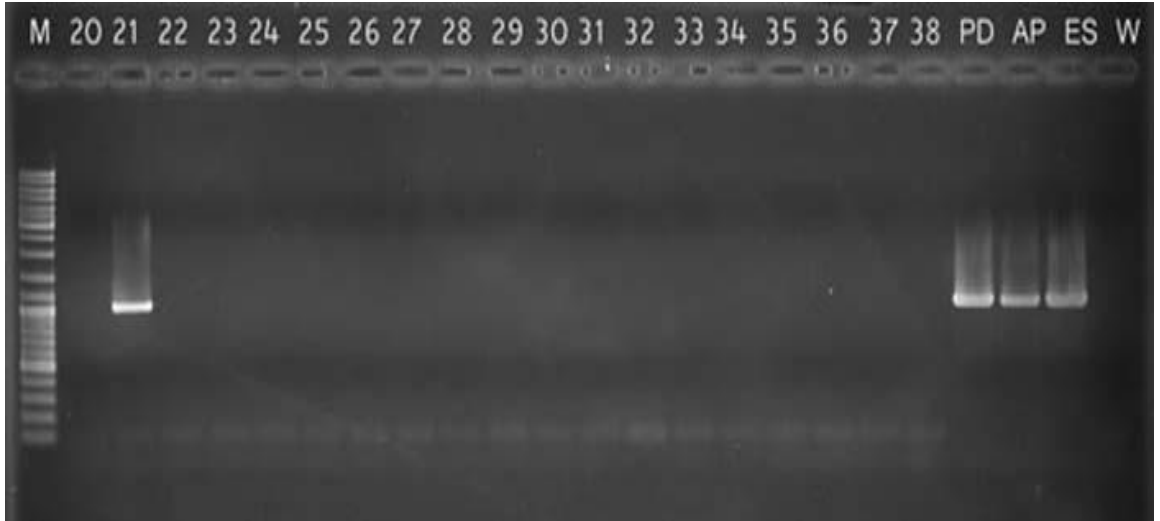
#### 4.1.1. Aşıyla Taşınma Denemesinin PZR Sonuçları

Aşıyla taşınma denemesinde kullanılan tüm bitkiler 4 aylık periyotlarla F01\R01 primerleri kullanılarak Nested-PZR ile testlenmiştir.

Yapılan testlemeler sonucunda aşılamaadan yaklaşık 10 ay sonra Haziran 2010' da ilk pozitif sonuçlar alınmış ve Ekim 2010 dönemlerinde yapılan testlemelerde de yine aynı sonuçlar elde edilmiştir. Her 2 dönemde yapılan testlemelerde 10, 11, 21 nolu toplam üç bitki fitoplazma pozitif bulunmuş ve enfeksiyon oranının % 6 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5). Şubat 2011 döneminde yapılan testlemelerde tüm bitkilerde sonuçlar negatif bulunmuştur.

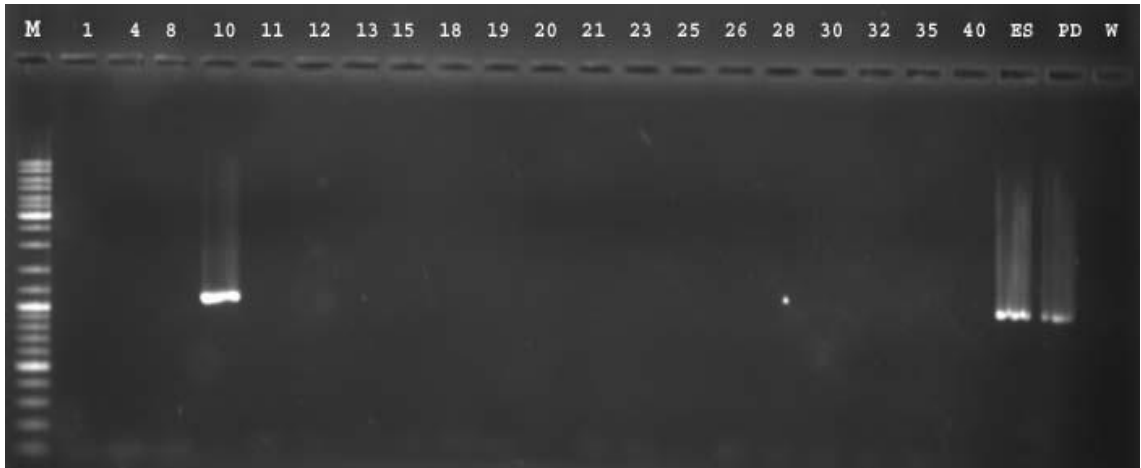


Şekil 4.4. Armut yıkım fitoplazmasının aşılı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 1-19: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



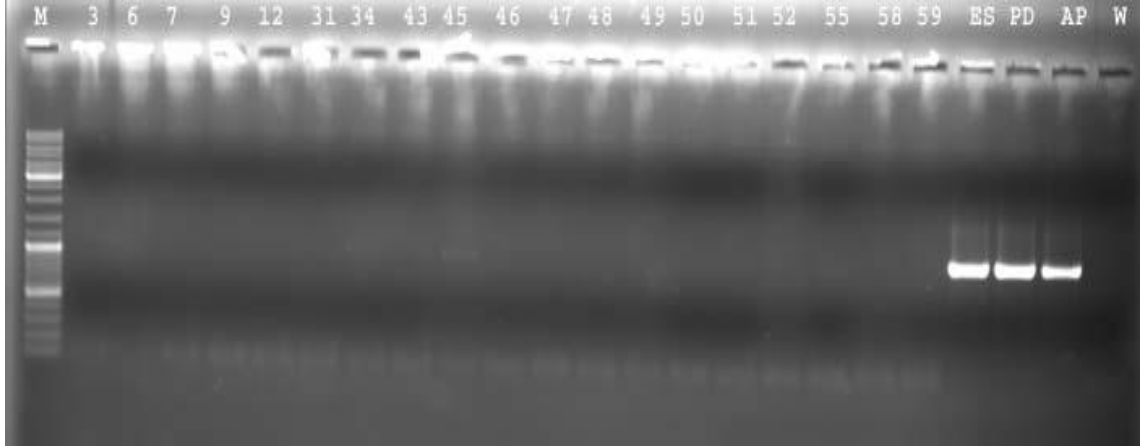
Şekil 4.5. Armut yıkım fitoplazmasının aşılı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 20-38: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Fitoplazmaların bitki içinde düzensiz dağıldığı ve enfeksiyonun mevsimsel olarak farklılık gösterdiği göz önüne alındığında, Şubat 2011 döneminde yoğunluğun toprak altı aksamalarda (Schaper ve Seemüller, 1982; Seemüller ve ark., 1984) olabileceği düşünülerek Haziran ve Ekim 2010'da fitoplazma pozitif saptanan 3 bitkiye ilaveten 17 adet bitki tesadüfen seçilmiş ve toplam 20 bitkinin kılcal köklerinden ekstraksiyon yapılmış ve nested-PZR işlemine tabi tutulmuştur. Daha önceki testlemelerde fitoplazma ile enfekteli olarak saptanan 3 bitkiden sadece 10 nolu bitki pozitif sonuç vermiş, diğer 2 bitkide (11 ve 21 nolu bitkiler) herhangi bir bant oluşumu görülmemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Armut yıkım fitoplazmasının aşı ile taşınma denemesinde bitki köklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 1, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 30, 32, 35, 40: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Nisan 2011 döneminde yapılan testlemeler sonucunda 10 nolu bitkinin yanı sıra 45 nolu bitkide de fitoplazma pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Armur yıkım fitoplazmasının aşılı ile taşınma denemesinde F01/R01 primerleri kullanılarak Nisan 2010'da yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 3, 6, 7, 9, 12, 31, 34, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 58, 59: Testlenen armur örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armur Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif controller, W: Su control

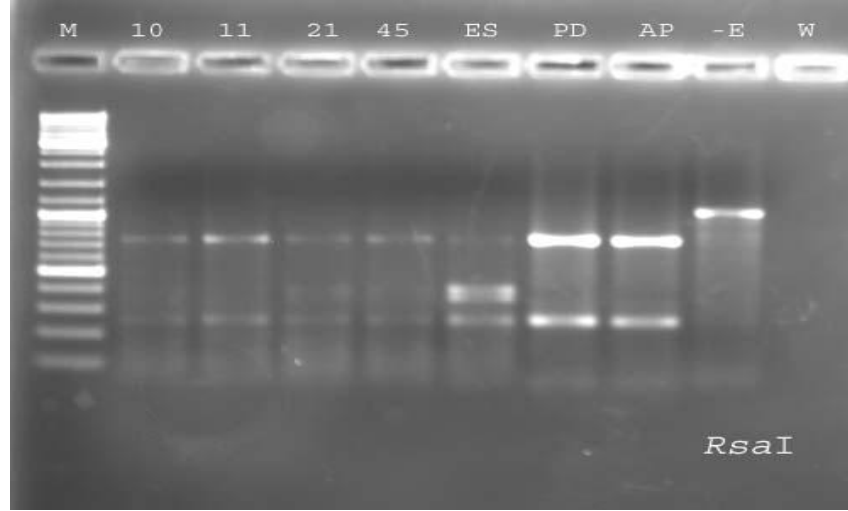
AY fitoplazmasının aşılı ile taşınması denemesinde elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir

Çizelge 4.1. AY fitoplazmasının aşılı ile taşınma denemesinde aşılana tüm bitkilerden yapılan nested-PZR sonuçları

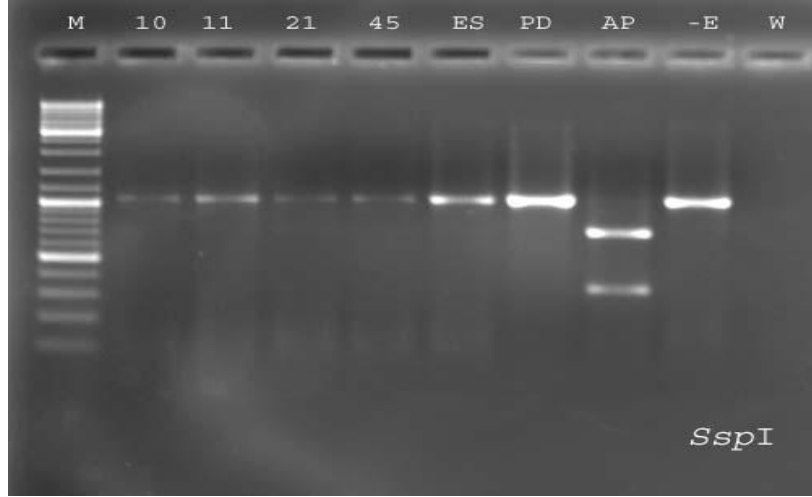
Testlenen Aylar	ÇEŞİT/ANAÇ
	DEVECİ/BA-29
	Enfekteli/Aşılana tüm bitkiler
Haziran 2010	3/49
Ekim 2010	3/49
Şubat 2011	-/49
Nisan 2011	2/49
Haziran 2011	1/49

#### 4.1.2. Aşıyla Taşınma Denemesinin RFUP Analizleri

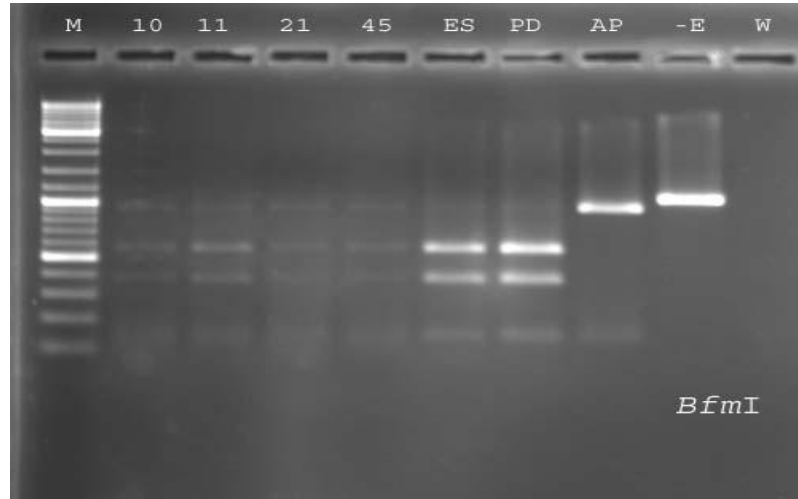
F01\R01 primer çifti ile yapılan Nested-PZR ürünlerinden fitoplazma pozitif bulunan örnekler *RsaI*, *SspI*, *Bmf1* ve *Bsa1* (*Ppu21I*) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak RFUP ile analiz edilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



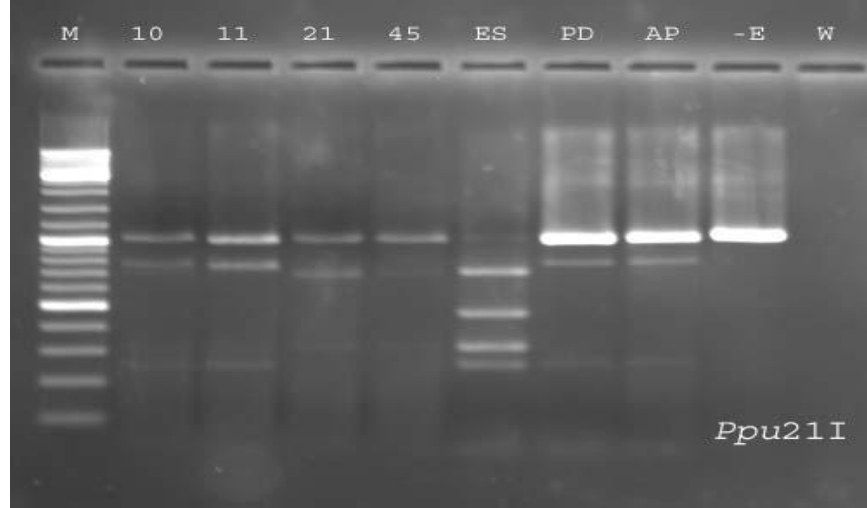
Şekil 4.8. Aşı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.9. Aşı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.10. Aşı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BfmI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.11. Aşı ile taşınma (10, 11, 21, 45 nolu örnekler) örneklerinin F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ppu21I* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Bu çalışma sonucunda AYW'nın aşılama yapıldıktan yaklaşık 10 ay sonra PZR ile saptanabildiğini görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre enfekteli aşı gözü kullanılması ile hastalığın %8 oranında taşınabildiği ve bu oranın ileriki yıllarda daha artabileceği göz önüne alındığında daha tehlikeli sonuçların ortaya çıkabileceği görülmektedir. Fitoplazmalar odunsu bitkiler içinde düşük konsantrasyonda olduğu ve düzensiz dağıldıkları için enfeksiyondan sonraki ilk yıllarda moleküler yöntemlerle dahi saptanamadıkları Berges ve ark. Tarafından ortaya konulmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre aşıyla taşıma yapılan bitkilerde aşılama yapıldıktan 10 ay sonra sadece 3 bitkide enfeksiyon saptanırken zaman ilerledikçe bu sayının arttığı görülmüştür. Bu bitkilerin gözlemlerinin ve periyodik olarak PZR ile testlemelerinin önümüzdeki yıllarda yapılması gerekmektedir.

#### 4.2. Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan aşılamalarda 180 adet bitki aşılanmış ve aşısı tutmayan bitkilere yeniden aşılama yapılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılanmış bitkilerin genel görünümü

Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla AYF inokulumu verilen bitkilerde kontrol bitkilerine oranla yine gelişme geriliği saptanmış ancak AYF'na spesifik tipik kızarma belirtileri gözlenmemiştir.

#### 4.2.1. Farklı Anaç-Çeşit kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi için yapılan PZR Sonuçları

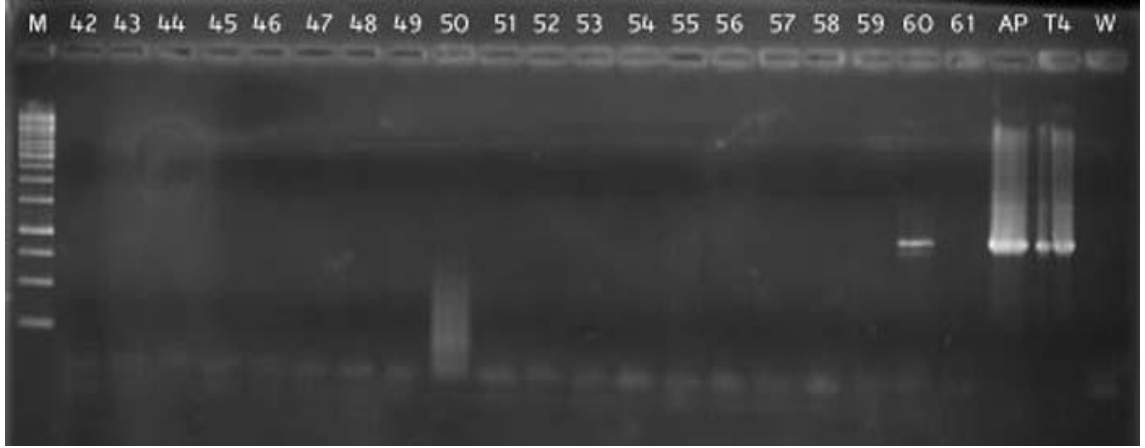
Anaç-çeşit kombinasyonu denemesinde kullanılan tüm bitkiler 4 aylık periyotlarla F01/R01 primerleri kullanılarak Nested-PZR ile testlenmiştir.

Yapılan testlemeler sonucunda Haziran 2010 döneminde 170 nolu örnek (PD inokulumu verilmiş OHF 330 üzerine aşılı Santa Maria) fitoplazma pozitif bulunmuştur (Şekil 4.13).

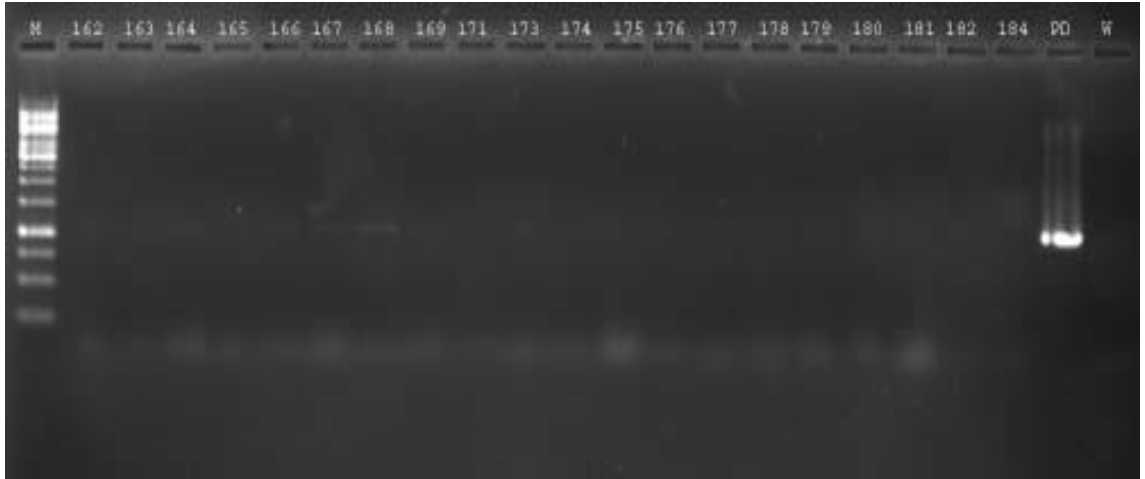


Şekil 4.13. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 167-186: Testlenen armut örnekleri, AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), T4 (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

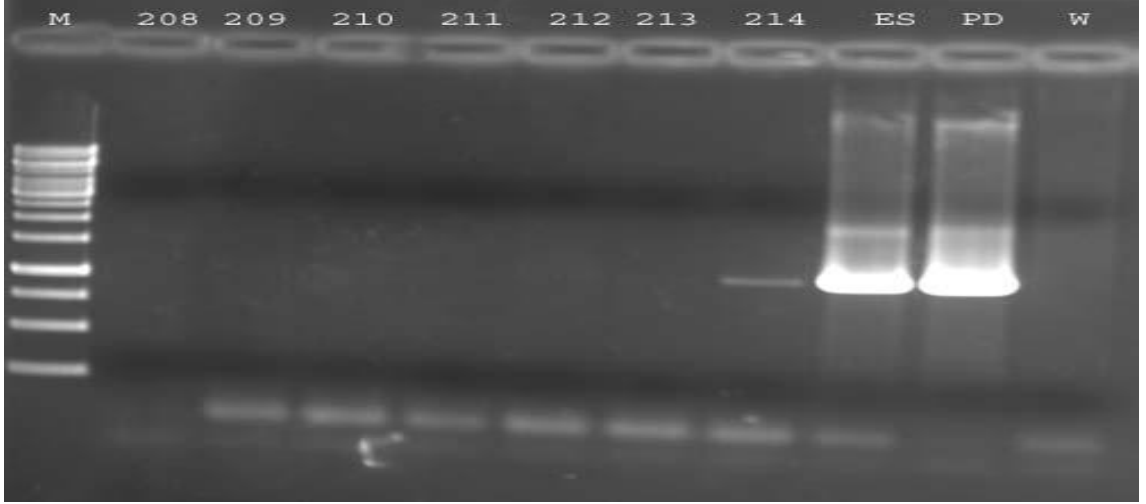
Ekim 2010 döneminde yapılan testlemelerde 60 (PD inokulumu verilmiş *Pyrus comunis* üzerine aşılı Deveci), 168 (PD inokulumu verilmiş OHF 333 üzerine aşılı Santa Maria) ve 214 (PD inokulumu verilmiş OHF 333 üzerine aşılı Williams) numaralı bitkiler fitoplazma pozitif bulunmuş, daha önce fitoplazma pozitif bulunan 170 nolu örnek ise negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.14. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), Testlenen armut örnekleri: 42-61, Pozitif kontroller: AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması), T4 (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), W: Su kontrol

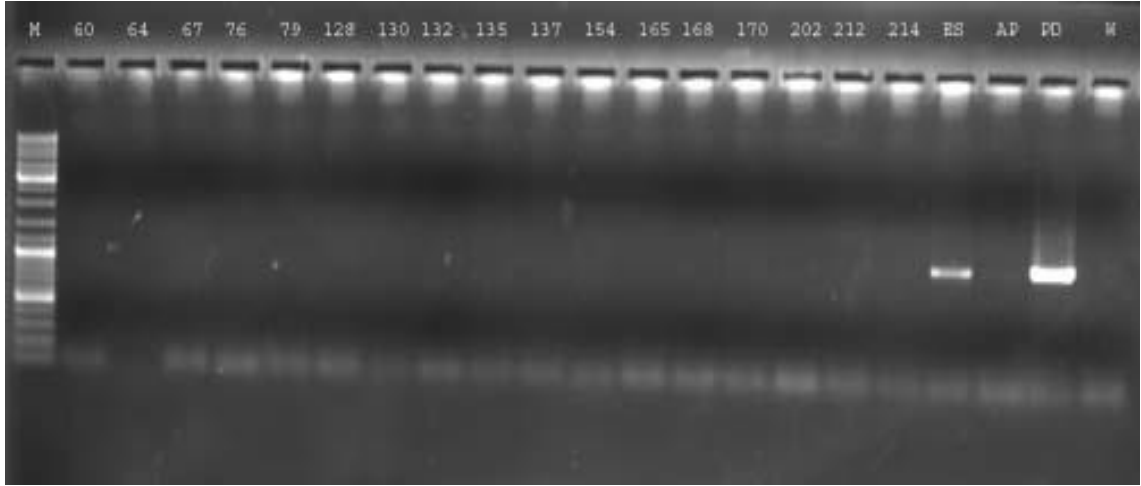


Şekil 4.15. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 184: Testlenen armut örnekleri, PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kontrol, W: Su kontrol



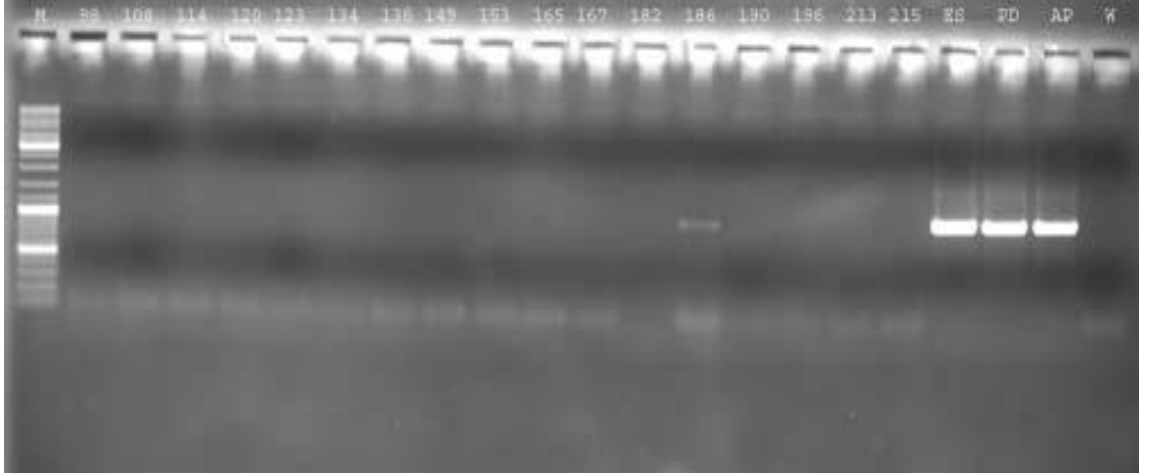
Şekil 4.16. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 208-214: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Fitoplazmaların bitki içinde düzensiz dağıldığı ve enfeksiyonun mevsimsel olarak farklılık gösterdiği göz önüne alındığında, fitoplazma pozitif saptanan 4 bitkiye (60, 168, 170 ve 214 numaralı bitkiler) ilaveten 16 adet bitki daha tesadüfen seçilmiş ve toplam 20 bitkinin kılcal köklerinden ekstraksiyon yapılmış ve nested-PZR işlemine tabi tutulmuştur. Daha önceki testlemelerde fitoplazma ile enfekteli olarak saptanan 4 bitkiden hiç birisinden pozitif bant elde edilememiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi denemesinde farklı bitki köklerinden elde edilen DNA'ların F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 60, 64, 67, 76, 79, 128, 130, 132, 135, 137, 154, 165, 168, 170, 202, 214: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Nisan 2011 döneminde yapılan testlemlerde testlenen tüm bitkilerden sadece 186 nolu (PD inokulumu verilmiş OHF 333 üzerine aşılı Deveci) fitoplazma pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 98, 108, 114, 120, 123, 134, 136, 145, 153, 165, 167, 182, 186, 190, 196, 213, 215: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Haziran 2011 döneminde yapılan nested-PZR testlemelerinde daha önceden fitoplazma ile enfekteli olarak saptanmamış 176 ve 183 nolu (PD inokulumu verilmiş OHF 333 üzerine aşılı Deveci) örneklerde beklenen seviyede band elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla bitki DNA'larının F01/R01 primerleri ile yapılan Nested-PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü. M: Moleküler marker (DNA ladder mix MBI Fermentas- SMO403), 43, 44, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188: Testlenen armut örnekleri, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

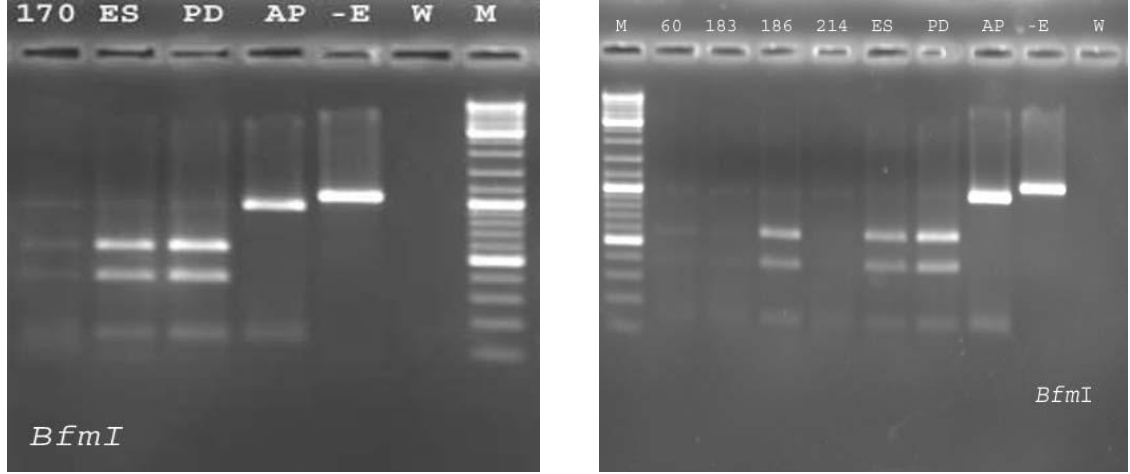
Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılanmış tüm bitkilerden yapılan nested-PZR testlemelerinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının armut yıkım fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılınmış tüm bitkilerden yapılan nested-PZR sonuçları

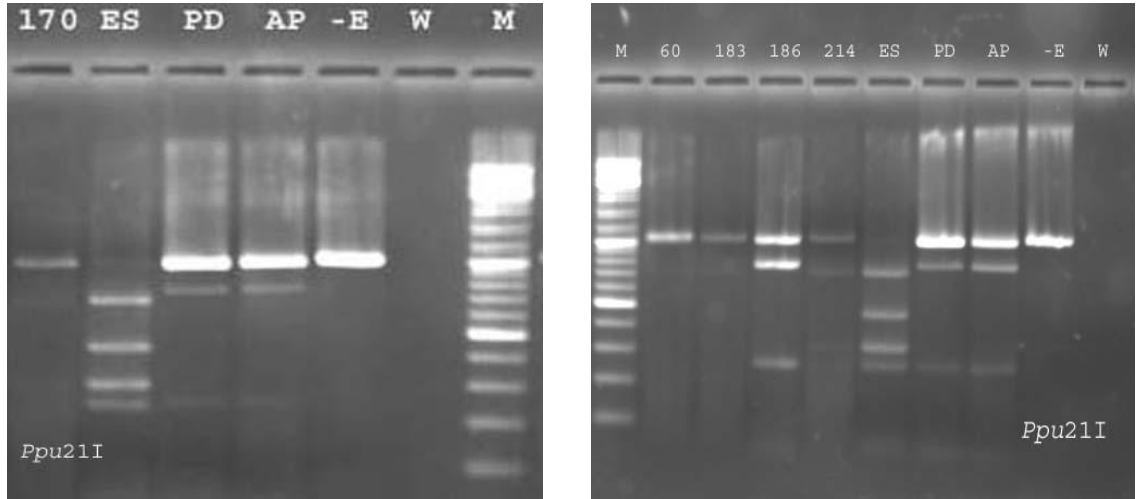
	<b>ANAÇLAR</b>		
	<b>Çöğür Anacı</b>	<b>BA-29</b>	<b>OHF 333</b>
<b>ÇEŞİTLER</b>	Enfekteli/Tüm Bitkiler	Enfekteli/Tüm Bitkiler	Enfekteli/Tüm Bitkiler
<b>DEVECİ</b>	1/15	-/15	3/15
<b>ANKARA</b>	-/15	-/15	-/15
<b>WILLIAMS</b>	-/15	-/15	1/15
<b>SANTA MARIA</b>	-/15	-/15	2/15

#### 4.2.2. Farklı Anaç-Çesit kombinasyonlarının AY Fitoplazmasına Karşı Reaksiyonlarının RFUP Analizleri

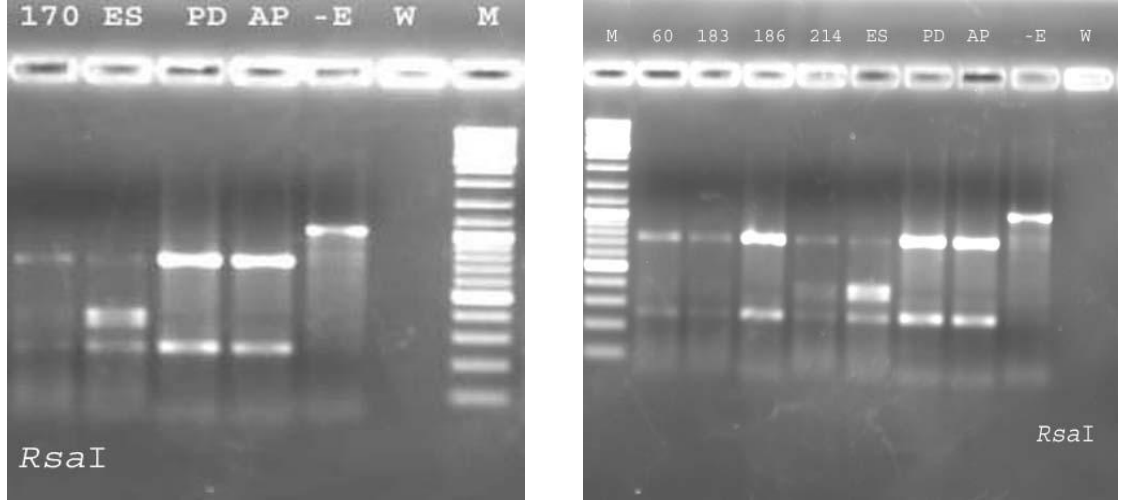
Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının AY fitoplazmasına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla aşılınmış bitkilerden F01\R01 primer çifti ile yapılan Nested-PZR testlerinde fitoplazma pozitif bulunan örnekler *RsaI*, *SspI*, *BmfI* ve *BsaI* (*Ppu21I*) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak RFUP ile analiz edilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



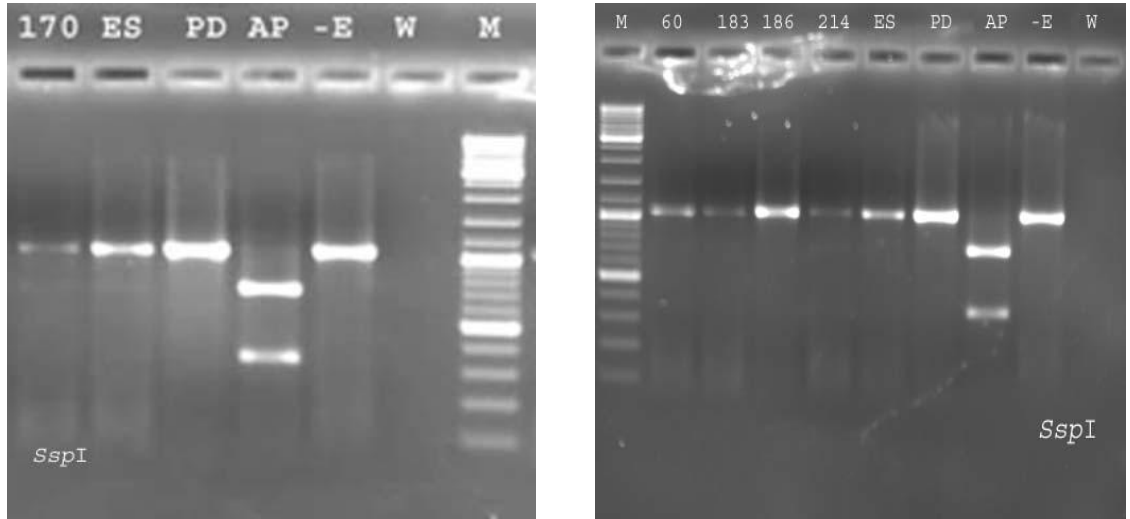
Şekil 4.20. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *BfmI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.21. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *Ppu21I* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.22. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol



Şekil 4.23. Farklı anaç-çeşit kombinasyonu deneme bitkilerinin (170, 60, 183, 186 nolu bitkiler) F01/R01 primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin *SspI* enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri. M: DNA markırı (MBI Fermentas), -E: Negatif kontrol, ES (Avrupa Sert Çekirdekli Sarılık Fitoplazması), PD (Armut Yıkım Fitoplazması), AP (Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması): Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AYW'na karşı reaksiyonlarının belirlenmesi kapsamında yapılan aşılama çalışmalarında AYW'nın aşılama yapıldıktan yaklaşık 10 ay sonra 1 bitkide saptanabildiği ve bu sayının zaman ilerledikçe arttığı görülmüştür. Bu durum belkide fitoplazma konsantrasyonunun bitkide yeterli seviyeye ulaşamadığından kaynaklanmış olabilir. AYW'nın farklı anaçlar üzerine aşılı çeşitlerde değişik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Hastalık şiddetinin derecesinin etkili bitkilerde oldukça değişken olduğu ve kullanılan anaç-kalem kombinasyonlarına göre bu şiddetin değiştiği ortaya koyulmuştur (Seemüller ve ark., 1998).

Yapılan bu çalışmada AYW'na en hassas anaç OHF 333 olarak bulunurken, yurt dışında yapılan bir çalışmada OHF 333 hibritlerinden elde edilen bitkilerde AYW'na karşı dayanıklılık gözlenmesine rağmen ithal edilen Fransız tohumlarından yetiştirilen *P. communis* çöğürlerine aşılı bitkilerde AYW'na karşı hassasiyet gözlenmiştir (Westwood ve ark., 1976, Westwood ve Lombard, 1982).

Bu çalışmada OHF 333 anacı üzerine Williams, Santa Maria, Deveci çeşitleri aşılandığında enfeksiyon oranları sırasıyla %6.6, %13.3, %20 olarak bulunurken Ankara çeşidi aşılandığında herhangi bir enfeksiyon saptanmamıştır. Ankara çeşidinin aşılandığı diğer iki anaçta da herhangi bir enfeksiyon belirlenmemiştir.

Çöğür anacı üzerine çeşitler aşılandığında Ankara, Santa Maria ve Williams çeşitlerinde herhangi bir enfeksiyon saptanmamasına rağmen Deveci çeşidi aşılandığında enfeksiyon %6.6 oranında belirlenmiştir. Ayrıca bu denemede aşılın bitkilerde fitoplazmaya spesifik bir simptom gözlenmemiştir. Seemüller ve ark., (1998)'nin yaptıkları bir çalışmada *Pyrus pyrifolia* ve *P. ussuriensis* üzerine aşılı armut ağaçlarında AYW'nın hızlı ölüme neden olduğu oysa *P. communis*, *P. betulifolia* ve *P. calleryana* üzerine aşılı armutlarda ise yavaş ölüm görüldüğü belirlenmiştir. Pastore ve ark., (1998)'nin yaptıkları bir çalışmada ise Quince A anacı üzerine aşılı armutların AYW enfeksiyonuna daha hassas oldukları, Franco comune anacı üzerine aşılı William ve Decana del Comizio çeşitlerinin daha az hassas olduğu ve %29-43 oranında enfeksiyon görüldüğü, oysa Farold 40 ve Farold 87 üzerine aşılı William armut çeşitlerinde enfeksiyon oranının %57 olduğu ve fitoplazma pozitif ağaçların tümünün simptomsuz olduğu saptanmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye sahip olduğu ekolojik koşullardan dolayı kayısı, kiraz, erik, elma, armut gibi birçok meyve türünün merkezidir. Sert ve yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde koşullar elverişli olmasına rağmen yüksek verimli ve kaliteli meyve elde etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu durumun en önemli sebeplerinden birisi de virüs, fitoplazma ve diğer aşı ile taşınan patojen enfeksiyonlarıdır. Bu etmenlerden özellikle fitoplazmalar verim kayıplarına ve meyve kalitesinde önemli azalmalara neden olmaktadır. Bunun yanında fitoplazmaların bitki içinde düzensiz dağılımları ve mevsimsel değişkenlik göstermeleri nedeniyle teşhislerinde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenlerden dolayı özellikle damızlık parsellerin ve koleksiyon bahçelerinin fitoplazma hastalıkları açısından testlenmelerinde, hızlı ve güvenilir bir şekilde bu patojenlerin tanılanmasına olanak sağlayan moleküler yöntemlerin mutlak surette kullanılması gereklidir. Fitoplazma teşhislerinde günümüzde en çok kullanılan PZR-RFUP analizleri ile doğru ve hızlı teşhis yapılabilmektedir. Böylece mevsimlere bağlı olmaksızın, bitkide düşük konsantrasyonda bulunan fitoplazmalar teşhis edilebilecek ve sonuçta fitoplazma enfeksiyonunun sağlıklı bitkilere yayılması önenebilecek ve ekonomik kayıplar azaltılabilecektir.

Armut ağaçlarının en önemli fitoplazma hastalığı armut yıkımı fitoplazması (AY; *Candidatus Phytoplasma pyri*)'dir. Ülkemizde ticari armut bahçelerinde Armut yıkımı fitoplazmasının varlığı konusunda 2005'li yıllardan beri sörvey niteliğinde çalışmalar yapılmakta, ancak etmenin aşıyla taşınması ve anaç-çesit kombinasyonlarının bu etmene karşı reaksiyonlarının belirlenmesi konusunda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında önemli bir fitoplazma hastalığı olan AYF etmeni *Ca. Phytoplasma pyri*'nin arazi koşullarında etkili bitkilerden alınan aşı gözleri kullanıldığında ne oranda taşıma gerçekleştiği, ayrıca farklı anaç-çesit kombinasyonlarının bu etmene karşı reaksiyonları araştırılmıştır.

AY fitoplazmasının aşıyla taşınması çalışmalarında etmen aşılama yaklaşık 10 ay sonra önce 3 bitkide saptanmış, daha sonra ise ilave bir bitkide daha (%8'lik enfeksiyon oranı) saptanmıştır. Farklı anaç-çesit kombinasyonlarının bu etmene karşı reaksiyonlarının belirlenmesi kapsamında yapılan aşılama çalışmalarında ise aşılama ve sürmüş 144 bitkiden 7 tanesinde AY fitoplazması (% 4.861'lik enfeksiyon oranı) saptanmıştır. İlk yapılan testlemelerde sadece 1 bitki (170 numaralı bitki) AY pozitif

bulunurken aylar ilerledikçe diğerk 6 bitkide daha enfeksiyon saptanmıştır.

Bu bulgulara bakıldığında gerek AYP'nın aşıyla taşınma araştırmalarında kurulan denemede gerekse farklı anaç-çeşit kombinasyonlarının AYP'na karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla kurulan denemede aşılama yapıldıktan yaklaşık 10 ay sonra fitoplazma enfeksiyonlarının saptanabildiği; etmenin başlangıçta düşük konsantrasyonda olduğu ve bu oranın zaman ilerledikçe giderek yükselerek moleküler testlerle saptanabilecek düzeye geldiği görölmüştür.

Aşıyla taşınma denemesinde kullanılan BA-29 anacına inokulum verildiği zaman taşınma %8 oranında gerçeleşirken anaç üzerine çeşitler aşıldığında herhangi bir enfeksiyon gerçeleşmediği saptanmıştır.

Anaç-çeşit kombinasyonlarında elde edilen bulgulara bakıldığında 7 pozitif bitkiden 6 tanesinin anacının OHF 333 olması nedeniyle OHF 333 AYP'na en hassas anaç olarak belirlenmiştir. OHF 333 anacı üzerine Williams, Santa Maria, Deveci çeşitleri aşıldığında enfeksiyon oranları sırasıyla %6.6, %13.3, %20 olarak bulunurken Ankara çeşidi aşıldığında herhangi bir enfeksiyon saptanmamıştır. Diğer 2 anaç üzerine aşılan Ankara çeşidinde de herhangi bir enfeksiyon belirlenememiştir.

Çögür anacı üzerine çeşitler aşıldığında Ankara, Santa Maria ve Williams çeşitlerinde herhangi bir enfeksiyon saptanmamasına rağmen Deveci çeşidi aşıldığında enfeksiyon %6.6 oranında belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara bakıldığında en hassas anaç OHF 333 olarak tespit edilmiş ve en fazla enfeksiyonların Deveci çeşidi aşılanan bitkilerde olduğu saptanmıştır. Anaç olarak OHF 333 anacı kullanılacaksa Deveci, Santa Maria ya da Williams çeşitleri yerine Ankara çeşidi tercih edilerek AYP bulaşıklılığının önlenilme ihtimali arttırılabilmektedir.

Çögür anacı kullanımlarında Deveci çeşidi ile kombinasyon yapmak yerine Santa Maria, Williams ya da Ankara çeşitlerinden herhangi biri kullanılarak AYP enfeksiyonu ihtimali önlenililmektedir.

Aşıyla taşınmanın %8 oranında bulunması fidan üretimlerinde sağlıklı aş gözü kullanımının ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca hastalığın arazide vektör böceklerle etkin olarak taşınması nedeniyle sadece temiz fidan kullanımının da hastalık kontrolünde yeterli olamadığı bilinmektedir. Bu nedenle dayanıklılık çalışmalarına da ağırlık verilmeli ve tüm önlemlerin birlikte alınmasına özen

gösterilmelidir.

Ülkemizde armut yetiştiriciliğinde önemli rol üstlenen özellikle Bursa ili için tehlike arz eden kontrolsüz fidanın ithalatının yapılması, bakanlık kontrolündeki damızlık blokların ve fidan üretim merkezlerinin kontrollerinin düzenli yapılmaması, sertifikasyon programlarına önem verilmemesi, ilgili kurum ve kuruluşlar arasında yeterince bilgi alış verişi yapılmaması ve sağlıklı olmayan bitki materyallerinin kullanılması fitoplazma hastalığının yayılmasını daha uygun hale getirmektedir.

Armutlarda sanitasyon ve sertifikasyon programlarının ülkemizde de acilen başlatılması ve bakanlık- üniversite işbirliği çerçevesinde yapılacak kontrollü üretim ile diğer virüs ve benzeri hastalıkların yanı sıra AYP'nin da yayılması engellenerek ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Anonim, 2009. TÜİK, Tarımsal Yapı, Üretim, Fiyat, Değer.
- Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Tora, R., 1997. Pear decline in Spain. **Plant Pathology**, 26, 694-698.
- Blodgett, E. C., Schneider, H., & Aichele, M. D., 1962. Behavior of pear decline disease on different stock-scion combinations. **Plantpathology** 52, 679-684.
- Canik, D., Ertunç, F., 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. **Bullettin of Insectology**. 60 (2), 335-336.
- Carraro, L., Loi, N., Eemacora, P., Gregoris, A., Osler, R., 1998a. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. **Acta Horticulturae**. 472, 665-668.
- 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.
- Davies, D. L., Guise, C. M., Clark, M. F., Adams, N. A., 1992. Parry's disease of pear is similar to pear decline and associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. **Plant Pathology**. 41, 194-203.
- Del Serrone, P., La Starza, S., Kristai, L., Kolber, M., Barba M., 1998. Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. **Journal of Plant Pathology**. 80, 53-58.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches broom, aster yellows of pawlownia witches broom. **Ann. Phyopath Soc. Japan** 33:259-266.
- Ember, I., Nemeth, M., Krizbai, L., Kolber, M., Botti, S., Bertaccini, A., Bohar, Gy., Szakal, M., Zsovak-Hangyal, R., 2004. Identification of Phytoplasmas on Parnaceous Fruit Tree Species in Hungary. Proc. XIXth IS on Fruit Trees Virus Diseases. **Acta Horticulturae**. 657, 443-448.

- Giunchedi, L., Poggi Pollini, C., Biondi, S., Babini A. R., 1994. PCR detection of MLOs in quick decline affected pear trees in Italy. **Ann. Appl. Biol.** **124**, 399-403.
- Hibino, H., Kaloostian, G. H., Schneider, H., 1971. Mycoplasma bodies in the pear psylla vector of pear decline. **Virology** **43**, 33-40.
- Hibino, H., Schneider, H., 1970. Mycoplasma-like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. **Plant Pathology.** **60**, 499-501.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-phytoplasmaTaxonomy group description of the genus *Candidatus Phytoplasma* a taxon for the wall-less nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol** **54**:1243-1255.
- Kaloostian, G.H., Hibino, H., Schneider, B., 1971. Mycoplasma bodies in periwinkle their etiology and transmission by pear psylla from pear trees affected by pear decline. **Phytopathology.** **61**: 1177-1179.
- Kison, H., Kirkpatrick, B. C., Seemuller, E., 1997. Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. **Plant Pathology.** **46**, 538-544.
- Lee I.M., Gundersen D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **Plant Pathology(2007)** **56**, 721
- Lee, I.M., Davis, R.E., Chen, T.-A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., and Schaff, D.A., 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. **Phytopathology.** **82**, 977-986.
- 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.
- Malinowski, T., Zandarski, J., Komorowaska, B., Zawadzka, B., 1996. Detection of pear decline phytoplasma in declining pear trees in Poland. **Plant Dis.** **80**, p. 464.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1992. Molecular Cloning, A laboratory Manual. **CSH Laboratory.** 554p.

- Marcone, C., Ragozzino, A., Crulli, M., 1999. Widespread occurrence of pear decline disease in Southern Italy. **Inf. Fitopatol.** 49, 50-52.
- Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees Martinus Nijhoff Publishers, Budapest, Hungary.
- OEPP/EPPO, 2007. Pear decline phytoplasma. EPPO A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests. No.95, Version 2007-09.
- Schaper, U., Seemüller, E., 1982. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Phytopathology.** 72, 736-742.
- Schneider, B., Gibbs, K., 1997. Detection of phytoplasmas in declining pears in southern Australia. **Plan Dis.** 81, 254-258.
- Seemüller E., Garnier M., Schneider B., 2002. Mycoplasmas of plants and insects, pp. 91-116. In *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas* (Razin S., Herrmann R., Eds). Kluwer Academic / Plenum Publishers, London, UK.
- Seemüller, E., 1989. Pear decline. Pages 188-201 in: Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders. P.R. Fridlund, ed. Wash. State Univ. **Coop. Ext. Spec. Publ.** SP0003. 330pp.
- Seemüller, E., & Schneider, B., 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European Stone fruit yellows, respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 54, 1217-1226. doi:10.1099/ijs.0.02823-0.
- Seemüller, E., Kartte, S., & Kunze, L., 1992. Resistance in established and experimental apple rootstocks to apple proliferation disease. **Acta Horticulturae.** 309, 245-251.
- Seemüller, E., Kunze, L., & Schaper, U., 1984. Coonization behavior of MLO, and symptom expression of proliferation diseased apple trees and decline diseased pear trees over a period of several years. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.** 91, 525-532.
- Seemüller, E., Lorenz, K. H., & Lauer, U., 1998. Pear decline resistance in *Pyrus communis* rootstocks and progenies of wild and ornamental *Pyrus* taxa. **Acta Horticulturae.** 472, 681-691.

- Seemüller, E., Moll, E., & Schneider, B., 2008. Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. **European Journal of Plant Pathology**. 121, 109-119. doi:10.1007/s10658-007-9250-5.
- Seemüller, E., Scahaper, U., Zimbelmann, F., 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. **Z. PflKrankh. PflSchutz**. 91: 371-382.
- Seemüller, E., Schneider, B., 2004. *Candidatus* Phytoplasma mali, '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. **In J. Syst and Evol. Microbiol**, 54: 1217-1226.
- Sertkaya E. 2005. Doğu akdeniz Bölgesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında sorun olan fitoplazma kökenli hastalıkların yaygınlığının, böcek vektörlerinin belirlenmesi ile bunların populasyon gelişmesi ve vektör etkinliğinin araştırılması. **TUBİTAK- TOGTAG-3205 (2003-2005) proje raporu**.
- Sertkaya G., Martini M., Ermacora P., Musetti R., Osler R., 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and Ppear by PCR-RFLP analysis in Turkey. **Phytoparasitica**. 33:380-390.
- 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.
- Ulubas Serce, Gazel, M., Caglayan, K., Ozgen, M., 2010. Effect of '*Candidatus* Phytoplasma pyri' infection on fruit quality, total phenolic content and antioxidant capacity of 'Deveci' pear, *Pyrus communis* L. **21st International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, fulius-Kühn-Archiv**. 427, 407-411.
- Westwood, H. N., Cameron, H. R., 1978. Environment-induced remission of pear decline symptoms. **Plant Dis. Rep.** 62, 176-179.
- Westwood, M. N., & Lombard, P. B. 1982. Rootstocks for pear. **Proceedings of the Oregon Horticultural Society**. 37, 64-79.

Westwood, M. N., Cmeron, H. R., Lombard, P. B., & Cordy, C. B., 1971. Effects of trunk and rootstock on decline, growth and performance of pear. **Journal of the American Society for Horticultural Science.** 96, 147-150.

Westwood, M. N., Lombard, P. B., & Bjorstand, H. O., 1976. Performance of 'Bartlett' pear on standart and Old Home x Farmingdale clonal rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science.** 101, 161-164.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik sabır ve özveri ile bana destek olup yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında değerli görüş katkı ve bilgilerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a ve hocam Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım da bana destek olan arkadaşlarım Ziraat Müh. Melisa MUKANNASGİL ve Ziraat Yük. Müh. Hacer GÜLTEKİN'e teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında olduğu gibi çalışmalarım sırasında da benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay ilinin Antakya ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 2004 yılında girdiğim Musatafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2008 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim dalı Fitopatoloji alanında Yüksek Lisans eğitimime başladım. 2011 yılında mezun oldum.

**EKLER****EK 1. Fitoplazma DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler (Rogstad, 1992)****2 X CTAB Solüsyonu (500 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
CTAB	10 g
NaCl (5M)	140 ml
Tris-HCl (1M) (ph 7.4)	25 ml
EDTA (0.5M) (pH 8.0)	20 ml

\*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

**Silika Yıkama Solüsyonu (Silica Wash Buffer) (100 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
Ethanol (%25)	25 ml
NaCl (5 M)	2 ml
Tris-HCl (1 M) (pH 7.4)	1 ml
EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	400 µl

**Silica Hazırlanışı :**

60 g silica üzerine 500 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O eklenir. Karışımın çökmesi için 24 saat beklenir. Üst fazın 470 ml'si atılır ve üzerine 500 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O eklenir. Karışımın tekrar çökmesi için 5 saat beklenir. Solüsyonun üst fazından 440 ml alınarak atılır. Geriye kalan çamurlu kısım otoklav edilir ve kullanılıncaya kadar stok 1.5 ml'lik tüpler içerisinde +4 °C'de saklanır.

**5 M NaCl (100 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
NaCl	29.2 g

\*29.2 g NaCl 80 ml H<sub>2</sub>O'da çözündürülür.

\*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

\*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

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

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
Tris base	12.1 g

\*12.1 g Tris base 80 ml H<sub>2</sub>O'da çözündürülür.

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

\*Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

\*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

**0.5 M EDTA (100 ml) (pH 8.0) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
EDTA	18,6 g

\*18.6 g EDTA 80 ml H<sub>2</sub>O'da çözündürülür.

\*Magnetik karıştırıcı ile kuvvetli bir şekilde karıştırılır.

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

\*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

## Ek 2. AGAROSE JEL ELEKTROFOREZ ÇÖZELTİLERİ VE HAZIRLANMASI

(MANIATIS ve ark., 1982)

**50 X TAE (100 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
Trizma Base	24.2 g
EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	10 ml
Glacial Acetic Acide	5.71 ml

\*Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

**Yükleme buffer (6 X Stok İçin) (15 ml) :**

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
Bromophenol blue	150 mg
Glycerol	18 g
50 X TAE	6 ml

\*-20 °C'de saklanır.

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

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
0.5 X TAE	200 ml
Ethidium Bromide (Sigma E-50) (Son konsantrasyon 1mg/ml)	200 µl

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

kadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.

**% 1.2'lik Agorose Jelin Hazırlanması :**

\*1.2 g agaroz, 100 ml 1 X TAE içinde mikrodalga fırında eritilir.

\*Yaklaşık 40 °C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülerek agarozun donması beklenir (15-20 dakika).

\*1 X TAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilen agaroz jelin çukurlarına PZR ürünleri yüklenir.

\*Örnek yüklemesi, 12 µl PZR ürünü 2 µl yükleme bufferı ayrı bir yerde karıştırılarak yapılır.

\*PZR ürünlerinin 120V'da 35 dakika elektroforezinden sonra ethidium bromide solüsyonu ile 3-5 dakika boyanır ve UV transilluminatörde sonuçlar gözlenir.

\*İstenildiği takdirde kamera ile paloroid fotoğraf çekilir.