T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞANLIURFA İLİ SARIMSAK (*Allium sativum* L.) ÜRETİM ALANLARINDA FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Ferda DANIŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında, Ferda DANIŞ'ın hazırladığı **"Şanlıurfa İli Sarımsak (*Allium sativum* L.) Üretim Alanlarında Fitoplazmaların Moleküler Yöntemlerle Saptanması"** konulu bu çalışma 19/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR ……

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ ……

Üye: Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU ……

Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No : 17162

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 No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
3. MATERYAL ve YÖNTEM 10
3.1.Materyal 10
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller 10
3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için kullanılan materyal 10
3.2. Yöntem 10
3.2.1. Örneklerin toplanması 10
3.2.2. Total DNA ekstraksiyonu çalışmaları 11
3.2.3. PCR Çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonların ayarlanması 12
3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması 12
3.2.5. PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon enzimi ile kesilmesi (RFLP) 14
3.2.7. Agaroz jel elektroforez çalışmaları 15
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 17
4.1. Survey çalışmaları ve örnekleme 17
4.2. Moleküler çalışmalar 21
4.2.1. Total nükleik asit izolasyonu 21
4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 21
4.2.3. PCR ürünlerinin *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilmesi (RFLP) 22
4.2.4. Toplanan örneklerde bulaşıklık oranının belirlenmesi 23
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 27
KAYNAKLAR 28
ÖZGEÇMİŞ 33
EKLER 34

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİ SARIMSAK (*Allium sativum* L.) ÜRETİM ALANLARINDA FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Ferda DANIŞ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Yıl: 2018, Sayfa: 35

Bu çalışma, Şanlıurfa ili sarımsak üretim alanlarında fitoplazma hastalığının belirtisine benzer simptom gösteren sarımsak bitkilerinde fitoplazma varlığını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Birecik ve Harran ilçelerinde sarımsak üretim alanlarında sarımsak bitkilerinin yapraklarında sararma, yaprak ve gövdede kızarma, çoklu yaprak oluşumu, yapraklarda incelme ve dişlerde süngerimsi yapı oluşumu biçiminde simptom gösteren toplam 92 örnek toplanmış ve fitoplazmaların saptanması için testlenmiştir. Toplanan örneklerden elde edilen total DNA'lar R16F1/R0 üniversal primer çifti ile direkt, R16F2n/R2 primerleri ile nested PCR ile testlenmiştir. Simptom gösteren bitkilerin kök dokularının %72.82'i beklenen düzeyde bant verirken, yapraklardan alınan örneklerin hiçbiri beklenen düzeyde bant vermemiştir. Araştırma sonucuna göre patojenin konsantrasyonunun kök dokularından tanılama için yeterli düzeyde bulunduğu, ancak yaprak dokularında tanılama yapılamayacak seviyede düşük olduğu belirlenmiştir. Simptomatolojik olarak toplanan Birecik ve Harran ilçelerindeki hastalık oranı sırasıyla %73.68 ve %68.75 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'de ve Şanlıurfa ilinde sarımsak bitkisinde fitoplazma etmeni ilk kez saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Sarımsak, Fitoplazma, Kök, PCR

ABSTRACT

MSc Thesis

DETECTION OF PHYTOPLASMAS BY MOLECULAR METHODS IN GARLIC (*Allium sativum* L.) PRODUCTION AREAS IN SANLIURFA

Ferda DANIŞ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Year: 2018, Page:35

This study was carried out to determine phytoplasma diseases in garlic plants expressing disease symptoms in garlic production areas in Şanlıurfa province. A total of 92 samples showing redness on leaves of leaves, redness on leaves and hairs, multiple leaf formation, thinning on leaves and spongy structure formation on cloves were collected and tested for the detection of phytoplasmas from garlic production areas in Birecik and Harran districts. Total DNAs from the collected samples were tested directly with the R16F1/R0 universal primer pairs and with the nested PCR using R16F2n/R2 primers. While 72.82% of the root tissues of the symptomatic plants gave the expected level of band, none of the samples taken from the leaves gave the expected level of band. According to the results of the research, it was determined that the concentration of pathogen is sufficient for diagnosis from the root tissues but low in the leaf tissues. Symptomatologically collected disease rates in Birecik and Harran provinces were calculated as 73.68% and 68.75% respectively. According to results of the study, phytoplasma pathogens were first detected from garlic in Şanlıurfa province inTurkey.

KEYWORDS : Garlic, Phytoplasma, Root, PCR

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde engin bilgi ve fikirlerini ve tez yapım aşamasında her türlü desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda ve tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Arş. Görevlisi Eray ŞİMŞEK, doktora öğrencisi Havva GÜMÜŞ'e, arazi çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Ziraat Yüksek Mühendisi Kasım DİLBER'e ve eğitim hayatımda maddi manevi her türlü desteklerinden dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezin maddi olarak desteklenmesine olanak sağlayan Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü (HÜBAK)'ne teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4. 1. Enfekteli bitkilerde sararma ..... ……..17
Şekil 4. 2. Enfekteli bitkilerin toprak üstü (a) ve toprak altı aksamında görülen kızarma (b) 18
Şekil 4.3. Enfekteli bitkilerin yapraklarında incelme(a) ve cadı süpürgesi (Witches' broom) oluşumu(b) 18
Şekil 4. 4. Sarımsak bitkilerinde görülen cadı süpürgesi oluşumu (a,b)……..... 19
Şekil 4.5. Enfekteli bitkilerin dişlerinde süngerimsi yapı oluşumu..... 20
Şekil 4.6. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bç uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.1,3,5,7,9,10,11,12,13,14,18 nolu kuyucuklar sarımsak kök örnekleri; 2,4,6,8,15,16,17 nolu kuyucuklar sarımsak yaprak örnekleri, P; Pozitif kontrol (*Catharanthus roseus*) N; Negatif kontrol (Sağlıklı sarımsak), M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder..... 22
Şekil 4.7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2,5) görüntüsü. 1, 2, 3, 4,5,6,7,8 nolu kuyucuklar çalışmada kullanılan sarımsak bitkilerinin kökünden alınan örneklerin750 bç ve 500 bç uzunluğundaki RFLP deseni. 9, pozitif kontrol. M: GeneRuler 100 bç DNA Ladder.....23

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri..... 13
Çizelge3. 2. PCR analizlerinde kullanılan primerlerin konsantrasyonları..... 13
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları..... 14
Çizelge.4.1. Birecik ilçesine bağlı köylerden toplanan örneklerin bulaşıklık durumu..... 24
Çizelge 4.2.Harran ilçesinemerkeze bağlı alanlarda toplanan örneklerin bulaşıklık durumu.....25
Çizelge 4.3.Testlenen sarımsak örneklerinde fitoplazma etmeninin bitki dokusunda bulunma oranı..... 25

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	Santigrat derece
da	Dekar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
g	Gram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
mM	Mili molar
pmol	Piko mol

KISALTMALAR

bç	Baz çifti (base pair)
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ddH2O	Çift distile su
d	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromide
ETOH	Ethanol
MLO	Mikoplazma Benzeri Organizma
NaCl	Sodium Chloride
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
PVP	Polyvinylpyrrolydone
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Tarım ürünleri içerisinde yumrulu bitkilerden olan sarımsak (*Allium sativum* L.), ülkemizin birçok yerinde üretimi yapılmaktadır. Sarımsak, zambakgiller (Liliaceae) familyasından olan keskin kokulu bir bitkidir. Sarımsak, ilk yıl birkaç dişten oluşan soğanını oluştururken, ikinci yıl çiçek açıp tohum vermektedir. Ancak sarımsak tarıma alındığı için tohumdan değil diş sarımsaktan üretilmektedir.

Günümüzde, Batı, Güney ve Orta Asya ile Avrupa, Kuzey Afrika, Çin, Hindistan, Mısır, ABD, Meksika ve Türkiye'de yetiştirilmektedir (Taşkaya, 2003). Sarımsağın dünyada yetiştirilen birçok türü bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları, baş sarımsak elde etmek için yetiştirilen beyaz sarımsak, taze yemek için yetiştirilen gri sarımsak ve İspanyol sarımsağı denilen az acılı pembe kabuklu türlerdir. Kaliteli sarımsak germanyum ve selenyumca zengin topraklarda yetişir. Tedavi edici özelliklerinden dolayı hemen hemen bütün dünyaya yayılan sarımsak, eski çağlardan beri mutfağın dışında özellikle beyaz sarımsak ilaç olarak da kullanılmıştır (Taşkaya, 2003).

Türkiye'de sarımsak ekim alanı, 2000 yılında toplam tarım alanının %0,029'unu, toplam işlenen tarım alanının %0,047'sini, sebze ekim alanının %1,25'ini oluşturmaktadır. En fazla sarımsak ekilen iller arasında Kastamonu, Kahramanmaraş ve Balıkesir, üretimde ise Kastamonu, Kahramanmaraş ve Gaziantep bulunmaktadır. Birim alandan en fazla verim Karaman (1924 kg/da), Gaziantep (1683,26 kg/da) ve Hatay (1107,632 kg/da) illerinden sağlanmaktadır. Tüm ülke genelinde sarımsak ekiliş alanları açısından ilk üç sırayı Batı Karadeniz (31277 da), Akdeniz (19205 da) ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi (16859 da) oluşturmaktadır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Gaziantep, Adıyaman, Şanlıurfa illeri toplam sarımsak ekiliş alanının %14.75'ini; üretimin %16.48'ini, karşılamaktadır.

Şanlıurfa'da sarımsak ekilen alan 3825 da olup; toplam üretim ise, 4021 tondur. Şanlıurfa ilinde sarımsak yetiştiriciliği Birecik ve Harran ilçelerinde

yapılmakta olup, Birecik ilçesinde ekilen alan 3800 da, toplam üretim 3976 tondur; Harran ilçesinde ise, ekilen alan 25 da, toplam üretim 45 tondur (TÜİK, 2016).

Ülkemizde yetiştirilen yerli sarımsak çeşitlerinden Kastamonu, Edirne, Balıkesir ve Kara sarımsak çeşitleri genellikle taze tüketim amacıyla kullanılmakta olup, kuru tüketim için ise yabancı ülkelerden ithal edilen çeşitler tercih edilmektedir.

Şanlıurfa'da sarımsak yetiştirilen alanlarda üreticiler tarafından tercih edilen yabancı çeşitler iri dişli ve iri başlı özelliklerinden dolayı Çin ve Endonezya sarımsak çeşitleridir. Şanlıurfa ilinde sarımsak yetiştiriciliği temmuz ayının sonlarına doğru yapılmaktadır. Erken dönemde yapılan ekimler genellikle taze tüketim amacıyla kullanılmakta olup, kuru sarımsak üretimi için ağustos ayı sonlarında ekim yapılmaktadır.

Sarımsak bitkisinde genel olarak beyaz çürüklük hastalığı (*Sclerotium cepivorum*), septorya leke hastalığı (*Septoria apiicola, Septoria lycopersici*), kurşuni küf hastalığı (*Botrytis cinerea*), mildiyö hastalığı (*Peronospora destructor*), Sürme hastalığı (*Urocystis cepula*), soğan rastığı (*Urocystis* spp.) sarımsak bazal çürüklük hastalığı (*Fusarium culmorum*), soğan sineği (*Delia antiqua*), tütün thripsi (*Thrips tabaci*), çiçek thripsi (*Frankliniella occidentalis*), pırasa güvesi (*Acrolepiopsis assectella*), telkurdu (*Agriotes* spp.) gibi hastalık ve zararlılar görülmektedir ve ekonomik anlamda zarara neden olmaktadırlar. Bu hastalıkların yanı sıra son zamanlarda dünyada çeşitli ülkelerde sarımsak ekim alanlarında bazı fitoplazmaların varlığı da rapor edilmiştir.

Mikoplazma benzeri organizmalar (Mycoplasma Like Organisms-MLO) olarak isimlendirilen fitoplazmalar 1994'te Seemüller ve ark. tarafından "fitoplazma" olarak adlandırılmıştır. Gram-pozitif bakteriler olarak bilinen fitoplazmalar Mollicute sınıfının *Candidatus* Phytoplasma cinsine girmektedir. Fitoplazmalar Hemiptera takımına giren böcek türlerinde ve bikti floem dokularında obligat parazit olarak yaşayan hücre duvarlarından yoksun, değişken şekilli olup çapları 1 mikrometreden

az, çok küçük genomlardan (680-1.600 kb) oluşmaktadır. Bitkiden bitkiye taşınmalarının floem dokusuyla beslenen psyllidler (yaprak pireleri) yoluyla (Ploaie 1981), aşı ile ya da *Cuscuta* spp. gibi parazit bitkilerle olduğu saptanmıştır (Marwitz ve ark. 1974, Heintz 1986, Seemüller 1990). Ayrıca taşınmada doğal yollarla gerçekleşen kök birleşmesinin de etkili olduğu tespit edilmiştir (Ciccotti, 2006). Birçok böcek ve bitkide hastalıklara neden olan fitoplazmalar, cansız ortamda kültüre alınamazken 2012 yılında axenic kültürde geliştirilmişlerdir (Contaldo ve ark., 2012). Fitoplazmayla enfekteli bitkilerde sarılık, cadı süpürgesi (witches' broom), phyllody, virescence, yaprak bükülmesi, bodurlaşma ve geriye doğru ölüm şeklinde simptomlar görülmektedir (Bertaccini ve ark., 2005). Fitoplazmalar başlıca *Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae* ve *Derbidae* familyalarına dahil böcekler tarafından persistent olarak taşınırlar (Weintraub ve Beanland, 2006). 1990' larda, fitoplazma DNA'sının ilk klonlamasını takiben (Kirkpatrick ve ark., 1987), nükleik asit bazlı probları (rasgele klonlanmış DNA ya da tamamlayıcı RNA), bitki ve vektörlerdeki fitoplazmaları tespit edip ayırmak için farklı deneyler kullanılmıştır (Lee ve Davis, 1988; Bertaccini ve ark.,1990; Bonnet ve ark.,1990; Harrison ve ark.,1992). 1980'lerde ELISA tabanlı yöntemlerle fitoplazmaların tespiti için serolojik tanısal teknikler ortaya çıkmaya başlamıştır. 1990'ların başında PCR ve RFLP analizlerinin birleşmesi ile fitoplazma türlerinin ve farklı ırkların tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Namba ve ark., 1993; Lee ve ark., 1993; Schneider ve ark., 1993).

Fitoplazmalar içerisinde Aster sarılıkları (AY) grubu (16SrI) birçok sebzede ve meyve ağaçlarında üretimi kısıtlayan dünya çapında 100'den fazla ekonomik açıdan önemli hastalıklara neden olan en geniş kapsamlı fitoplazma grubudur (Lee ve ark., 2006).

ABD'de 2012 yılında sarımsak ekim alanlarında görülen yapraklarda morarma, bitkide büyüme geriliği, yaprak uç nekrozu ve yumuşak diş oluşumu biçiminde simptom sergileyen sarımsak bitkilerini PCR ile testlenip, 16SrI grubuna ait olduğu saptanmıştır (Mollov ve Lockhart, 2014).

Dünya çapında sarımsakla ilgili fitoplazma çalışması yok denecek kadar az olup, ülkemizde sarımsak bitkilerinde fitoplazma etmeni üzerine çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, gerek Türkiye'de gerekse bölgede sarımsak ekim alanlarındaki fitoplazma etmenini saptamak amacıyla yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Önceleri mikoplazma benzeri organizmalar olarak adlandırılan fitoplazmalar 600'den fazla bitki türünde hastalıkla ilişkilendirilen hücre duvarından yoksun 500 nm çapında prokaryotlardır (Lee ve ark., 2000; Bertaccini 2007; Hogenhout ve ark, 2008).

Fitoplazma ile enfekteli bitkilerde phyllody, gövdede yassılaşma, cadı süpürgesi ve cüceleşme şeklinde simptomlar görülmektedir (Bertaccini ve ark., 1996;Lee ve ark., 1997).

Fitoplazma DNA'sının 1990'larda ilk klonlanmasını takiben (Kirpkpatrick, 1987), nükleik asit bazlı problar bitki ve vektörlerde fitoplazmaları belirlemek ve teşhis etmek için geniş çapta kullanılmışlardır (Lee ve Davis, 1988; Bertaccini ve ark, 1990a; Bonnet ve ark., 1990; Harrison ve ark., 1992). Ayrıca diagnostic amaçlar için sekansa özgü oligonükleotidler geliştirilmiştir (Schaff ve ark., 1992; Firrao ve ark., 1993). Klonlanmış DNA kısımlarına dayalı olarak yapılan PCR testleri fitoplazma teşhisi için hassas bir yöntemdir. PCR testlerinde korunmuş gen dizilerine (16S rRNA, ribozomal protein, *tuf*, 16S-23S gen bölgesi gibi) dayalı olarak geniş çaplı primerler dizayn edilmesine karşın bitki ve böceklerle ilişkilendirilen çok sayıda fitoplazmaların teşhisine izin verir (Bertaccini ve ark., 1992a; Gunderser ve Lee, 1996; Gundeser ve ark., 1996; Schneider ve ark., 1997). PCR testlerinde kullanılan universal primerler fitoplazma hastalıklarının ön teşhisi için kullanışlıdır. Birkaç üniversal ve çoğu fitoplazma grup spesifik primerler 16S ribosomal gen üzerinde fitoplazmaların rutin teşhisi için dizayn edilmiştir (Deng ve Hiruki, 1991; Ahvens ve Seemüller, 1992; Nanba ve ark., 1993; Davis ve Lee, 1993; Lee ve ark., 1993a, 1998a; b; Lorens ve ark., 1995; Schneider ve ark., 1997).

16S rRNA geni, robozomal protein geni, *tuf* ve *sec*Y geni gibi çeşitli korunmuş dizilere dayalı olarak primerlerin dizayn edilmesi fitoplazmaların saptanması, teşhisi ve sınıflandırılmasında kullanılan büyük bir buluştur (Gundersen ve ark., 1996; Schneider ve ark., 1997; Marcone ve ark., 200; Wei ve ark., 2004a; Martini ve ark., 2002;2007).

Günümüzde olası fitoplazmaların farklılaşması, ayırt edilmesi için birkaç endonükleaz restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP analizleri ile rutin olarak uygulanmaktadır (Lee ve ark., 1998a;b). Her fitoplazmanın RFLP deseni korunduğundan dolayı bilinmeyen fitoplazmalar tüm referans fitoplazmaların analizi yapılmadan bilinen fitoplazmalar için geçerli RFLP desenleriyle karşılaştırılarak teşhis edilebilir (Lee, 1998a;b; Wei ve ark., 2007; 2008a; Cai ve ark., 2008).

Lee, (1993) tarafından mikoplazma benzeri organizmalardan biri olan Aster Sarılığı'nın monoklonal antikorlar ve serolojik testlerle 16SrI grubuna ait olduğu saptanmıştır.

Teksas'ta çeşitli ürünlerde epidemi yapan aster sarılıkları fitoplazmalarının ekolojik etkileri çalışılmıştır. Kabak, havuç, soğan, maydanoz, dereotu ve bazı yabancı otların AY fitoplazmaları tarafından enfektelendiği ortaya çıkarılmıştır. Enfekteli bitkilerde Nested-PCR ve RFLP analizlerine dayalı olarak aster sarılıkları grubunda 16SrI-A ve 16srI-B saptanmıştır. Havuç, maydanoz ve dereotu her iki alt grup ile enfekteli olarak bulunmuştur. Soğan, yabani marul, papatya ve kanarya otunda 16SrI-A saptanırken, kabakta 16SrI-B fitoplazması saptanmıştır. Ayrıca epidemi döneminde o bölgede var olan üç yaprak piresinde her iki fitoplazma alt grubu teşhis edilmiştir. Sonuç olarak epidemiye yol açan fitoplazmaların aynı havuzdan geldiğini ve üç yaprak piresinin epidemiye katılmış olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Lee ve ark., 2003).

Aster sarılıkları grubu (16SrI) fitoplazmaları 16S rRNA, *tuf* geni ve ribozomal protein (*rp*) dizi analizleri ve RFLP analizleri ile farklı filogenetik alt gruplara ayrılmış ve aster sarılıkları ile ilişkili olan yeni bir fitoplazma türü *'Candidatus* Phytoplasma asteris' saptanıp 16SrI-B alt grubuna dahil olduğu bulunmuştur (Lee ve ark., 2004).

Daha önceden ribozomal protein gen dizilerine göre alt gruplara ayrılan aster sarılıkları grubu (16SrI) fitoplazmalarının 10 türü arasındaki farklılıklar *secY* gen dizi analizleri vasıtasıyla genetik olarak daha detaylı bir şekilde açıklığa kavuşturulmuştur (Lee ve ark., 2006).

Güney Kore'de *Ampelopsis brevipedunculata* var. *heterophylla* bitkisinde görülen cadı süpürgesi simptomuna neden olan fitoplazma, PCR'a dayalı teknikler ile aster sarılıkları fitoplazmasının alt grubu olarak sınıflandırılmıştır (Jung ve ark., 2003).

İspanya'da çeşitli ürünlerde RFLP ve Nested-PCR analizleri ile '*Candidatus* Phytoplasma asteris (16SrI-B)' ve stolbur fitoplazması (16SrXII-A) teşhis edilmiştir. Yanlızca yabani havuçta stolbur saptanmış olup, marul ve hinhiba bitkilerinde '*Candidatus* Phytoplasma asteris' saptanmıştır (Fernández ve ark., 2011).

Aster sarılıkları ve yonca phyllody ile enfektelenmiş saraypatı bitkisinin kök ve yaprak sapı dokularının dondurup kırmatekniği ile elektron mikroskobu vasıtasıyla incelenerek bu dokularda mikoplazma benzeri organizmaların varlığı tespit edilmiştir (Haggis ve Sinha, 1997).

Kanada ve Alberta'da tıbbi amaçlarla yetiştirilen kedi otu ve eşek marulu bitkilerinde görülen aster sarılıkları simptomlarına neden olan fitoplazmanın 16S rRNA geni ve 16/23S genler arası bölgelerinin PCR ve RFLP sonuçlarına göre 16SrI-A alt grubuna ait olduğu saptanmıştır (Khadhair ve ark., 2008).

Aster sarılıklarının rRNA ve *tuf* gen dizi analizleri ile önceden belirlenmiş 7 alt grubuna (16SrI-A, -B, -C, -D, -E, -F ve –K) üç yeni alt grup 16SrI-L, 16SrI-M ve 16srI-N saptanıp eklenmiştir (Marcone ve ark., 2000).

Sırbistan'da havuçlarda görülen yapraklarda sararma ve kızarıklıklar, köklerde boyut ve kalitede azalma biçiminde simptomlara neden olan fitoplazmaların yapılan çoklu gen analizleri ile 16SrI-A ve 16srI-B alt gruplarına ait oldukları bulunmuştur (Duduk ve ark., 2009).

Dünya çapında sarımsakla ilgili fitoplazma çalışması yok denecek kadar az olup ülkemizde sarımsak bitkilerinde fitoplazma etmeni üzerine çalışma bulunmamaktadır.

Conci ve ark., (1998) Còrdoba (Arjantin) yakınlarındaki sarımsak üretim alanlarında sarımsak bitkilerinde çöküş, sarımsak dişlerinin boş olması, yapraklarda sararmave kırmızılaşma biçiminde simptom gösteren bitkilerde elektron mikroskobu ile çok sayıda fitoplazma hücreleri gözlemlemişlerdir. Simptom gösteren sarımsak bitkilerinin yaprak ve dişlerinden elde edilen total DNA'lar fitoplazmaya özgü universal primerler kullanılarak PCR aracılığıyla çoğaltmışlardır. Çoğaltılan PCR ürünleri *Alu*I restrüksiyon enzimi ile kesilip Polyacrylamide jel anlizleri sonucunda patojenin 16SrIII grubunda yer aldığını saptamışlardır.

Khadhair ve ark., (2002) yaptıkları bir çalışmada Edmonton, Alberta ve Kanada' da sarımsak ve yeşil soğanda Aster sarılığı (AY) fitoplazmasının PCR yöntemi ile tanımlamışlardır. Bitkilerin yaprak dokularından elde edilen total DNA'ları üniversal primer çiftiyle (R16F2n/R2 ve R16 (I)F1/R1) çoğaltılmışlardır. Çoğaltılmış PCR ürünlerini (RFLP) analizinde tanımlamak için *Alu*I, *Kpn*I, *Mse*Ive *Rsa*I enzimleriyle kesmişlerdir. PCR ve RFLP analizleri sonucunda enfekteli sarımsak ve soğanda AY fitoplazmasını saptamışlardır ve bu fitoplazmanın 16SrI-A alt grubuna ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Galdeano ve ark., (2004) Arjantin'de Tespih ağacında (*Melia azedarach* L.) ve sarımsak çöküşlerine neden olan fitoplazmaların 16S rDNA dizilerinin moleküler karakterizasyonuna dayalı filogenetik çalışmalar yapmışlardır; her iki organizmanın birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu saptamışlardır. 16S rDNA 'nın nükleotit dizileri ve RFLP analizlerinden elde edilen sonuçlara göre tespih ağacının 16SrIII-B alt grubunda, sarımsağın ise 16SrIII-J alt grubunda olduğunu tespit etmişlerdir.

Galdeano ve ark, (2009) Arjantin'de Asya (Chino) ve Arjantin sarımsak çeşitlerinde (Blanco ve Colorado) sarımsak çöküşlerine neden olan fitoplazma hastalıklarının epidemiyolojisiyle ilgili yaptıkları çalışmada sarımsak çöküşünün patojeni 16SrIII grubu fitoplazması olarak tanımlamışlar, Chino ve Blanco sarımsak çeşitlerinin hastalığa karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. PCR yöntemi ile hastalığın tohumla taşınabildiğini; elektron mikroskobu, dot blot ve PCR testleriyle patojenin bitkinin tüm kısımlarında bulunduğunu, kök dokularında ise yoğunluğun fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

ABD'de 2012 yılında sarımsak ekim alanlarında görülen yapraklarda morarma, bitkide büyüme geriliği, yaprak uç nekrozu ve yumuşak diş oluşumu biçiminde simptom sergileyen sarımsak bitkilerini PCR ile testleyip, 16SrI grubuna ait olduğunu saptamışladır (Mollov ve Lockhart, 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller

Çalışmada kullanılan bitkiler Şanlıurfa ili sarımsak yetiştiriciliğinin yapıldığı Birecik ve Harran ilçesine bağlı sarımsak üretim alanlarından toplanan örneklerden oluşmuştur.

Laboratuar çalışmaları Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuarında yürütülmüştür.

3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için kullanılan materyal

Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin yaprak ve köklerinden elde edilen total DNA'lar ve DNA eldesinde kullanılan kimyasallar, PCR ve RFLP çalışmaları için materyal olarak kullanılmıştır.

RFLP çalışmalarında *EcoR*I enzimi (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması

Şanlıurfa iline bağlı Birecik ve Harran ilçeleri sarımsak üretim alanlarında 2017 yılının Mayıs ayında örnekler toplanmıştır. Sarımsak bitkilerinde yoğun olarak yapraklarda sararma, yaprak ve gövdede kızarma, çoklu yaprak oluşumu, yapraklarda incelme ve dişlerde süngerimsi yapı oluşumu biçiminde simptom

gösteren ve fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu şüphelenilen bitkilerden güdümlü örneklemeler yapılmıştır. Güdümlü örnekleme her tarladan farklı sayıda örnek alınarak yapılmıştır. Birecik ilçesine bağlı 9 köyden ve her köyden iki farklı tarladan olmak üzere toplam 76 örnek, Harran ilçesi merkezine bağlı 4 farklı tarladan toplam 16 örnek toplanmış olup ve bu örneklerden hastalık oranı yüzde olarak hesaplanmıştır. Belirti gösteren bitkilerin yanısıra herhangi bir belirti göstermeyen sağlıklı sarımsak bitkilerinden de örnekler alınmıştır. Simptom göstermeyen örnekler PCR çalışmalarında negatif örnek olarak kullanılmıştır.

Fitoplazma ile bulaşık olduğundan şüphelenilen örnekler ayrı ayrı polietilen poşetlere konularak, alındığı yer ve tarihe ilişkin verileri içerecek şekilde etiketlenerek laboratuara getirilmiştir. Laboratuvarda kayıt altına alınan örnekler fotoğraflanmış ve testleninceye kadar (1 gün) +4ºC'de muhafaza edilmiştir.

Örnek alınan bitkiler, köklerini içerecek biçimde yıkanarak saf sudan geçirilip kağıt havlu üzerinde nemi gidene kadar kurutulmuştur. Fitoplazma etmeninin bitkinin hangi dokusunda daha iyi saptanacağını belirlemek için, örnek alınan sarımsak bitkilerinin yaprak ve kök dokularından ayrı ayrı 1g alınarak total DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.2. Total DNA ekstraksiyonu çalışmaları

Total DNA ekstraksiyonu çalışmalarında Ahrens ve Seemüller (1992)'nın kullandığı yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır;

a- İnfekteli bitkilerin yaprak ve köklerinden alınan örnek (1 g örnek için 5 ml) CTAB buffer (EK1) ile ekstraksiyon poşetinde ezilmiştir.

b- Ekstraksiyon dan 600 mikrolitre alınıp, 1.5 ml lik Eppendorf tüplerine konulmuş ve 35 dakika 65°C de su banyosunda inkübe edilmiştir.

c-İnkübasyonu takiben tüpler içerisine 600 mikrolitre chloroform / izoamylalkol (24:1) ilave edilerek 1-2 dakika vortex yapılmıştır.

d-Vortexlenen tüpler 12.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (c-d aşamaları 2 kez tekrarlanmıştır).

e-Üstte kalan sıvı kısımdan 500 mikrolitre alınarak yeni Eppendof tüplere aktarılmış ve üzerine 2/3 oranında soğuk isopropanol ilave edilip -20 °C de 1 saat bekletilmiştir.

f-Daha sonra tüpler 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

g-Pellet %70' lik etil alkol ile yıkanacak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan pellet 50 µl TE (1X) buffer içinde çözdürülmüş ve elde edilen total DNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. PCR Çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonların ayarlanması

PCR çalışmaları 200 µl'lik Eppendorf tüplerinde 25 µl hacimde yürütülmüştür. Çalışmalarda kullanılan DNA miktarları, nükleik asit izolasyonu sonucunda elde edilen yoğunluk dikkate alınarak, preparasyonlar spektrofotometre ile ölçülüp 20 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

Hedef bölgelerin çoğaltımı için gerekli olan ve 100'er mM Deoksiribonükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lardan 20' şer µl alınarak 25 mM olan 80µl lik dNTP karışımına 120µl ddH_2O ilave edilmek suretiyle son oran 10 mM olacak biçimde 200 µl ye tamamlanmıştır. DNA'nın çoğaltılması sırasında kullanılan Green Buffer son hacimde 1X olacak konsantrasyonda, Dream Taq DNA Polimeraz (5u/µl) enzimi 1,25u ve son olarak ddH_2O ile son hacmi 25µl olacak miktarda kullanılmıştır.

3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması

1/10 (V/V) oranında 1X TE ile sulandırılarak hedef nükleik asit olarak elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmaları patojenin 16S rDNA geni üzerinden yapılmıştır. PCR çalışmaları direkt ve nested olmak üzere 2

aşamalı olarak yürütülmüştür. Direkt-PCR'de 1400 bç ürün veren üniversal R16F1/R16R0 primerleri, Nested-PCR'de ise 1250 bç ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Pimerlerin baz dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

16S rDNA bölgelerini hedefleyen üniversal ve grup spesifik primerler, bitki ve vectör içinde bulunan çok az miktardaki fitoplazmaları bile geniş bir aralıkta gösterebilmektedirler. 16S rDNA'lar birbirine çok benzer olduklarından, 16S ve 23S rDNA bölgesi arasındaki daha az korunmuş intergenik aralayıcı bölge de özellikle bazı fitoplazma grupları için daha spesifik primerler tasarlanırken dikkate alınmıştır. Amplifikasyon için gerekli olan fitoplazma DNA'nın miktarı azalırken, reaksiyonun spesifitesi nested primerleri kullanılarak arttırılmıştır (Smart ve ark.,1996; Gunders ve Lee, 1996).

Çizelge 3.1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri

Primer Adı	Dizilimi (5'-3')	Referans
R16F1	5'-AAGACGAGGATAACAGTGG-3'	(Lee ve ark., 1994)
R16R0	5'GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3'	(Davis ve ark., 1997)
R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	(Gundersen ve Lee, 1996)
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	(Gundersen ve Lee, 1996)

Çizelge3. 2. PCR analizlerinde kullanılan primerlerin konsantrasyonları

Primer	**Stok konsantrasyonu**	**Son konsantrasyon**
R16F1	100 μM	10 μM
R16R0	100 μM	10 μM
R16F2n	100 μM	10 μM
R16R2	100 μM	10 μM

PCR çalışmaları sonucunda beklenen molekül ağırlığına sahip (1250 bç) DNA bantlarının elde edilmesinden sonra Nested-PCR ürünleri RFLP çalışmalarında materyal olarak kullanılmıştır

PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. Örneklere uygulanan thermocycler programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı primerin erime sıcaklığı değeri dikkate alınarak

hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları

Primer	İlk Denatürasyon	**Denatürasyon**	**Primer bağlanması**	**Uzama**	Son uzama
	(1 döngü)		**(35 döngü)**		(1 döngü)
R16F1 R16R0	94°C 2 dk	**94°C 1 dk**	**52°C 2 dk**	**72°C 3 dk**	72°C 10 dk
R16F2n R16R2	95°C 3 dk	**94°C 1 dk**	**55°C 2 dk**	**72°C 3 dk**	72°C 10 dk

Çalışma sonucunda çoğaltılan üniversal PCR ürünleri 1/30 oranında sulandırılıp buradan 1 µl PCR ürünü alınarak Nested-PCR çalışmasında hedef DNA olarak kullanılmıştır. Nested PCR çalışması yukarda belirtildiği şekliyle yürütülmüştür. Nested PCR sonucunda çoğaltılan DNA'lar 1X lik TAE (pH 8.3) de hazırlanmış %1' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.2.5. PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon enzimi ile kesilmesi (RFLP)

Fitoplazmaların tanısı ve sınıflandırılmasında 16S rDNA bölgesinin RFLP analizleri, rutin olarak kullanılmaktadır. Belli restriksiyon enzimleriyle RFLP analizi, fitoplazmanın teşhisi ve karekterizasyonu için kullanılır. Bilinmeyen bir fitoplazmanın RFLP profilleri bilinen fitoplazmalarla kıyaslanır ve onların farklılıklarına göre sınıflandırılır (Lee ve ark., 1998).

RFLP çalışmalarında PCR çalışması sonucunda elde edilip agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilerek görüntülenen DNA örnekleri kullanılarak öncelikle etmenin fitoplazma olup olmadığı *Eco*RI enzimi ile kontrol edilmiştir (Nejat ve ark, 2009). RFLP çalışmaları enzimin alındığı üretici firmanın (Thermo scientific, ABD) önerdiği protokol dikkate alınarak yürütülmüştür.

Bu işlemlerin sırası aşağıda verilmiştir.

I. *Eco*RI enzimi 37˚C de çalıştığı için örnekler bu enzimle 12saat bekletilmiştir.
II. Her bir tüpe10 µl. kalıp DNA, 2 µl. buffer, 2 µl. Restriksiyon enzimi, 18µl. distile su karıştırılmıştır.
III. Daha sonra tüpler içlerindeki restriksiyon enzime ait sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.
IV. Bir gece bekletildikten sonra tüpün içindeki kesilmiş amplikonlar 1X lik TAE (pH 8.3)'de hazırlanmış %2.5' lik agaroz jelde 85 voltta yürütülmüştür.
V. Örneklerin enzimle kesilmiş hali UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.7. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Agaroz Jel Elektroforez çalışmalarında PCR ve RFLP ürünleri kontrol edilmiştir. Nested-PCR ürünleri 1X lik TAE (pH 8.3, EK2) de hazırlanmış %1' lik agaroz jelde (EK2) kontrol edilmiştir. Agaroz Jel Elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra, (1994)'e göre yapılmıştır. İşlem sırası aşağıda maddeler halinde gösterilmiştir.

a- Agaroz 0.8 g olacak şekilde 80 ml 1x TAE buffer içerisine konulmuştur.

b- Agaroz-TAE buffer karışımı kaynayıncaya ve eriyinceye kadar mikrodalgalı bir fırın içerisinde ısıtılmıştır.

c- Karışım tekrar 40ºC ye kadar soğumaya bırakılarak ve elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirilmiştir.

d- Jel donduktan sonra (20-25 dakika) tarak dikkatli bir şekilde çekilip jel'in üzerini 1-2mm kadar kaplayıncaya kadar tank içerisine 1X TAE buffer ilave edilmiştir.

e- 6 µl örnek jel deki çukurlara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk çukura 6 µl DNA Ladder konulmuştur. Yükleme tamponundaki sarı renk jel'in sonuna gelene kadar jel tankına 85 volt elektrik akımı verilmiştir.

f-Koşum işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 5 dakika 1000 ml H_2O +50µl EtBr (10mg/ml) karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla EtBr uzaklaştırıncaya kadar 5 dakika distile su içinde tutulmuştur.

Sonuçlar UV transilluminatör ile kontrol edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Survey çalışmaları ve örnekleme

Bu çalışmada Şanlıurfa ilinin Birecik ve Harran ilçelerinde sarımsak üretim alanlarında simtomatolojik gözlemler yapılmış ve fitoplazma etmeninin neden olduğu simptomları gösteren bitkilerden örnek alınmıştır. Gözlenen en yaygın simptomlar sararma (Şekil 4.1), bitki genelinde kızarma (Şekil 4.2), yapraklarda cadı süpürgesi oluşumu (Şekil 4.3), yapraklarda incelme (Şekil 4.3) ve dişlerde süngerimsi yapı oluşumu (Şekil 4.5) şeklinde olmuştur.



Şekil 4. 1. Enfekteli bitkilerde sararma



Şekil 4. 2. Enfekteli bitkilerin toprak üstü (a) ve toprak altı aksamında görülen kızarma (b)



Şekil 4.3. Enfekteli bitkilerin yapraklarında incelme(a) ve cadı süpürgesi (Witches' broom) oluşumu(b)



Şekil 4. 4. Sarımsak bitkilerinde görülen cadı süpürgesi oluşumu (a,b)



Şekil 4.5. Enfekteli bitkilerin dişlerinde süngerimsi yapı oluşumu

Survey yapılan alanlarda gözlenen bu simptomlar daha önce Mollov ve Lockhart (2014), tarafından bildirilen simptomlara benzerlik göstermektedir. Bu araştırıcılar 2012 yılında ABD'de sarımsak ekim alanlarında görülen sarımsak bitkisinin yapraklarında morarma, bitkide büyüme geriliği, yaprak uç nekrozu ve yumuşak diş oluşumu biçiminde simptom sergileyen sarımsak bitkilerini fitoplazma açısından pozitif olduğunu teşhis etmişlerdir.

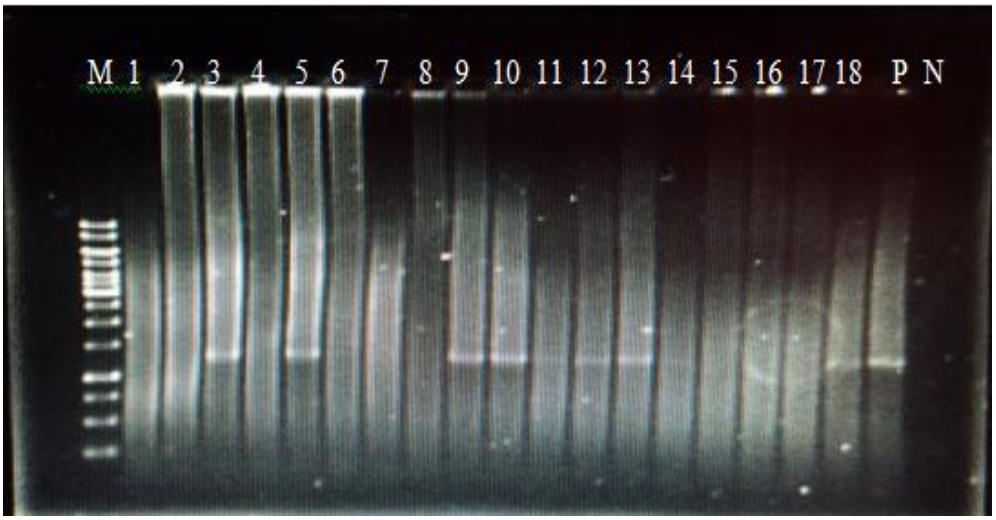
4.2. Moleküler çalışmalar

4.2.1. Total nükleik asit izolasyonu

Sarımsak bitkilerinde fitoplazma etmenini saptamak amacıyla simptom gösteren bitkilerinin kılcal kök dokuları ve yapraklarından total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Total nükleik izolasyonunda Ahrens ve Seemüler 1992, yönteminde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

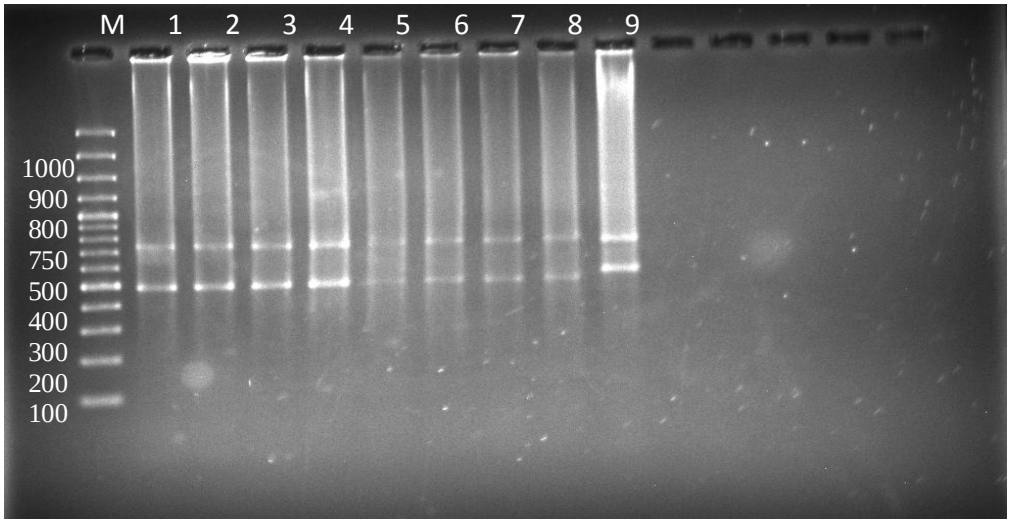
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi, Direkt-PCR ve Nested-PCR aşamalarıyla yapılmıştır. Direkt-PCR'da 1.4 kb ürün veren üniversal R16F1/R16RO primerleri, Nested-PCR'da ise 1.25 kb ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, fitoplazma açısından daha önce pozitif olarak saptanmış olan Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) bitkilerinin DNA'sı, negatif kontrol olarak sağlıklı sarımsak bitkilerinden alınan örnekler kullanılmıştır. Direkt-PCR ürünleri 1/30 oranında sulandırılarak Nested-PCR yapıldığında; sarımsak bitkilerinin yapraklarından alınan ve sağlıklı olduğu gözlenen örnekler beklenen düzeyde bant vermezken; simptom gösteren sarımsak bitkilerinin kök dokularından alınan örneklerde beklenen düzeyde bant (1250 bç) elde edilmiştir.



Şekil 4.6. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bç uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.1,3,5,7,9,10,11,12,13,14,18 nolu kuyucuklar sarımsak kök örnekleri; 2,4,6,8,15,16,17 nolu kuyucuklar sarımsak yaprak örnekleri, P; Pozitif kontrol (*Catharanthus roseus*) N; Negatif kontrol (Sağlıklı sarımsak), ,M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

4.2.3. PCR ürünlerinin *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilmesi (RFLP)

Çalışma sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek beklenen düzeyde (1250 bç) bant veren DNA örnekleri, etmenin fitoplazma olup olmadığını konusunda kesin kanıya varmak için *Eco*RI enzimi kullanılarak kontrol edilmiştir (Nejat ve ark.,2009; Marzachi 2004; Seemüler 1998; Christensen ve ark., 2004). RFLP çalışmasında kullanılan enzimin temin edildiği üretici firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yürütülmüştür. Çalışmada pozitif olduğu saptanan sarımsak bitkilerinin kök dokularından elde edilen 1250 bç'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde 750 bç ve 500 bç'lik bantlara ayrılarak fitoplazma hastalığının varlığı kesinleşmiştir.



Şekil 4.7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2,5) görüntüsü. 1, 2, 3, 4,5,6,7,8 nolu kuyucuklar çalışmada kullanılan sarımsak bitkilerinin kökünden alınan örneklerin750 bç ve 500 bç uzunluğundaki RFLP deseni. 9, pozitif kontrol. M: GeneRuler 100 bç DNA Ladder.

4.2.4. Toplanan örneklerde bulaşıklık oranının belirlenmesi

Nested PCR sonuçlarına göre survey yapılan Şanlıurfa ili Birecik ilçesinde sarımsak ekim alanlarında testlenen 76 örnekten yaprak örneklerinin tümü fitoplazma açısından negatif bulunurken, aynı örneklerin kök dokularından 56 tanesi fitoplazma açısından pozitif olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4). Harran ilçesinde ise testlenen 16 örneğin tüm yaprak dokuları fitoplazma açısından negatif; aynı örneklerin kök dokularından 11 tanesi fitoplazma açısından pozitif olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5). Güdümlü örneklemeler yapılan Birecik ve Harran ilçelerinden toplanan örneklerin hastalık ile bulaşıklık oranı sırasıyla %73.68 ve % 68.75 olarak saptanmıştır..

Çizelge.4.1. Birecik ilçesine bağlı köylerden toplanan örneklerin bulaşıklık durumu

Köyler	Tarla Sayısı	Örnek Sayısı	Pozitif Çıkan Örnek Sayısı	Negatif Çıkan Örnek Sayısı
Mezra	1.Tarla	7	6	1
	2.Tarla	2	2	0
Tibil	1.Tarla	6	4	2
	2.Tarla	5	3	2
Karababa	1.Tarla	4	3	1
	2.Tarla	2	2	0
Çepçepi	1.Tarla	3	3	0
	2.Tarla	4	3	1
Surtepe	1.Tarla	6	5	1
	2.Tarla	4	2	2
İncirli	1.Tarla	2	2	0
	2.Tarla	3	2	1
Karşıyaka	1.Tarla	9	6	3
	2.Tarla	3	2	1
Tilves	1.Tarla	4	3	1
	2.Tarla	5	2	3
Akarçay	2.Tarla	3	2	1
	1.Tarla	4	4	0
Toplam	**18**	**76**	**56**	**20**

Çizelge 4. 2.Harran ilçesinemerkeze bağlı alanlarda toplanan örneklerin bulaşıklık durumu

Köyler	Tarla Sayısı	Örnek Sayısı	Pozitif Çıkan Örnek Sayısı	Negatif Çıkan Örnek sayısı
Merkez	1.Tarla	3	2	1
	2.Tarla	6	4	2
	3. Tarla	4	2	2
	4.Tarla	3	3	0
Toplam	**4**	**16**	**11**	**5**

Çizelge 4.3.Testlenen sarımsak örneklerinde fitoplazma etmeninin bitki dokusunda bulunma oranı

Bitki dokusu/ilçeler	Birecik		Harran		
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Bulaşıklı Oranı
Yaprak	0	76	0	16	%0
Kök	56	20	11	5	%72,82

Bu araştırmada fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu şüphelenilen sarımsak bitkisinin yaprak ve kök kısımlarından alınan örneklerin PCR sonuçlarına göre; sarımsak bitkisinin yapraklarından alınan örneklerde beklenen büyüklükte bant gözlenmezken; kök dokularından alınan örneklerin %72.82'i fitoplazma açısından pozitif olarak saptanmıştır. Bu yönüyle çalışmamız Galdeano ve ark, (2009)'nın çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Galdeano ve ark, (2009), Asya ve Arjantin sarımsak çeşitlerinde fitoplazma hastalığının epidemiyolojisiyle ilgili yaptıkları çalışmada PCR yöntemi ile fitoplazmanın 16SrIII grubu fitoplazması olduğunu, patojenin bitkinin tüm kısımda saptanabildiğini ancak kök dokularında yoğunluğun daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Conci ve ark., (1998), sarımsak bitkisinde fitoplazma etmenini saptamak için yaptıkları çalışmada PCR ürünlerinin *Alu*I restrüksiyon enzimi ile kesilip Polyacrylamide jel analizleri sonucunda etmenin 16SrIII grubunda yer aldığını saptamışlardır.

Khadhair ve ark., (2002), sarımsak ve yeşil soğanda Aster sarılığı (AY) fitoplazmasını saptamak için yaptıkları çalışmada Nested-PCR ile fitoplazma hastalığı saptamış ve RFLP analizleri ile mevcut fitoplazmanın 16SrI-A alt grubuna ait olduğunu rapor etmişlerdir.

Galdeano ve ark., (2004), Tespih ağacında (*Melia azedaracha* L.) ve sarımsak bitkilerinde geriye doğru ölüme neden olan fitoplazma etmenlerinin belirlemek için yaptıkları 16S rDNA dizilerinin moleküler karakterizasyonuna dayalı filogenetik çalışmalarda; her iki etmenin birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu, 16S rDNA 'nın nükleotit dizileri ve RFLP analizlerinden elde edilen sonuçlara göre Tespih ağacının 16SrIII-B alt grubunda, sarımsağın ise 16SrIII-J alt grubunda olduğunu tespit etmişlerdir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma Şanlıurfa ili sarımsak üretim alanlarında fitoplazma hastalıklarının moleküler yöntemlerle saptanması amacıyla yapılmıştır. Fitoplazmaların tanılanmasında moleküler yöntemler bütün dünyada kullanılan en güvenilir yöntem olarak bildirilmektedir (Jarausch ve ark., 2000). Yapraklarda sararma, yaprak ve gövdede kırmızılaşma, yapraklarda incelme, çoklu yaprak oluşumu biçiminde simptom gösteren sarımsak bitkilerinden örnekler alınmıştır. Toplanan örneklerden DNA izolasyonu, PCR ve RFLP sonuçlarına göre etmenin fitoplazma olduğu saptanmıştır.

Yapılan araştırmada sarımsak örneklerinin fitoplazma ile bulaşık olup olmadığının belirlenmesi için mutlaka kök dokusundan örneklemenin yapılması gerektiği belirlenmiştir. Bu nedenle sarımsaklarda karantina işlemlerinde fitoplazma ile bulaşıklık olup olmadığını belirlernek için kök dokusundan örnekleme yapılmalıdır.

Bu çalışma ile sarımsak ekim alanlarındaki olası fitoplazmalar gerek bölgede gerekse Türkiye'de ilk defa saptanmıştır. Sarımsak üretimi için zarara neden olan fitoplazmalarla mücadele olanaklarının geliştirilmesi için ilk adım olan tanılama işlemi gerçekleştirilmiş olup; bundan sonraki yapılacak karakterizasyon ve konukçu patojen ilişkilerinin belirlenmesi çalışmaları için önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Sarımsak bitkisinde fitoplazma etmenini moleküler yöntemlerle tanılarken bitki dokusu olarak kök dokularından testlemenin daha güvenilir sonuçlar vereceği bu çalışma ile saptanmıştır.

KAYNAKLAR

AHRENS, U. and SEEMULLER, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology, 82: 828-832.

ANCO, P.A., BENEDETTI, R. and BERTACCINI A., 2002. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. Molecular and Cellular probes, 16(3): 197-208.

BERTACCINI, A., DAVIS, R.E., LEE, I. M., CONTI, M., DALLY, E.L., DOUGLAS, S.M. 1990. Detection of Chrysanthemum yellows mycoplasmalike organism (MLO) by dot-hybridization and Southern blot analysis. Plant Disease, 74: 40-43.

BERTACCINI, A., DAVIS R.E., HAMMOND, R.W., BELLARDI, M.G., VIBIO, M. and LEE, I.-M. 1992.Sensitive detection of mycoplasmalike organisms in field collected and in vitro propagated plants of Brassica, Hydrangea and Chrysanthemum by polimerase chain reaction. Annals of applied Biology, 121: 593-599.

BERTACCINI, A., BELLARDI, M.G. and VIBIO, M. 1996. Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. Infected by viruses and phytoplasmas. Phytopathologia mediterranea, 35: 129-132.

BONNET, F., SAILLARD, C., KOLLAR, A., SEEMULLER, E. and BOVÉ, J.M., 1990. Detection and differentiation of the mycoplasmalike organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. Molecular Plant Microbe Interactions, 3: 438-443.

BERTACCINI, A., FRANOVA, J., BOTTI, S., TABANELLI, D., 2005. Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciations in the Czech Republic. Fems Microbiology Letters, 249: 79-85.

BERTACCINI, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. Frontieres in Bioscience, 12: 673-689.

CONCI,V.C, GOMEZ, G.G., DOCAMPO, D. M and CONCI, L. R., 1998. Phytoplasma Associated with Symtoms of 'Tristeza del ajo ' (Garlic Decline) in Garlic (Allium sativum L.). J. Phytophology, 146: 473-377.

CICCOTTI, A. M. , BIANCHEDI, P. L. , BRAGAGNA, P., DEROMEDI, M., FLIPPI, M., FORNO, F. and MATTEDI, L., 2006. Natural and experimental transmission of Candidatus Phytoplasma mali by root bridges.XXth Int. Symp. on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops and XIth Int. Symp.on Small Fruit Virus Diseases.

DAVIS, R.E.and LEE, I.-M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology, 83: 1008-1011.

DENG, S. and HIRUKI, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiology Methods, 14: 53-61.

DUDUK, B., CALARI, A., PALTRINIERI, S., DUDUK, N.and BERTACCINI A. 2009a. Multi-gene analysis for differentiation of aster yellows phytoplasmas infecting carrots in Serbia. Annals of Applied Biology, 154(2): 219-229.

FIRRAO, G., GOBBI, E. and LOCCI, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produceoligonucleotide probes for mycoplasmalike organism. Phytopathology, 83: 602-607.

GUNDERSEN, D.E.and LEE, I.-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea, 35: 144-151.

GUNDERSE, D.E., LEE, I.-M., SCHAFF, D.A., HARRISON, N.A., CHANG, C.J., DAVIS, R.E.and KINSBURY, D.T. 1996. Genomic diversity among phytoplasma strains in 16S rRNA Group I (Aster Yellows and related phytoplasmas) and III (X-Disease and related phytoplasmas). International Journal of Systematic Bacteriology, 46: 64-75.

GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, Adana-Turkey, 89-99p.

GALDEANO, E., TORRES, L. E., MENEGUZZI, N., GUZMAN, F., GOMEZ, G. G., DOCAMPO, M. D. VE CONCI, L. R. 2004. Molecular Characterization of 16S Ribosomal DNA and Phylogenetic Analysisof Two X-disease Group Phytoplasmas Affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. J. Phytopathology 152: 174–181.

GALDEANO, E., CONCI, L. R., GONZÁLEZ, O., PARADELL, S., RIENZO, J. A. D., NOME, C. VE CONCI, V. C. 2009. Epidemiological aspects of garlic decline disease causedby a phytoplasma in Asiatic and Argentinean garlic cultivars. Australasian Plant Pathology, 38: 437–443.

HAGGIS, G.H.and SINHA, R.C. 1977. Scanning electron microscopy of mycoplasmalike organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. Phytopathology, 68: 677-680.

HARRISON, N.A., BOURNE, C.M., COX R.L., TSAI, J.H.and RICHARDSON, P.A. 1992. DNA probes for detection of mycoplasmalike organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. Phytopathology, 82: 216-224.

HEINTZ, W. 1986. *Cuscuta odorata* an effective vector for mycoplasma-like organisms (MLO). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 38: 138-141.

HOGENHOUT, S.A., OSHIMA, K., AMMAR E,.-D., KAKIZAWA, S., KINGDOM, H.N., NAMBA, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology, 9: 403–423.

JARAUSCH, W., SAILLARD, C., HELLIOT, B., GARNIER, M. and DOSBA, F., 2000. Genetic variability of Apple Proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a nonribosomal fragment. Molecular and Cellular Probes, 14: 17-24.

JUNG, Y.H., YAE, C.M., LEE, T.J., HIBI T.and NAMBA S. 2003. Aster yellows subgroup (Candidatus Phytoplasma sp. AY 16S-group, AY-sg) phytoplasma associated with porcelain vine showing witches' brom symptoms in South Kore. J Gen Plant Pathol, 69: 208-209.

KIRKPATRICK, B.C., STENGER, B.C., MORRIS, T.J.and PURCELL, A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. Science, 238: 197-200.

KHAN, A.J., BOTTI, S., AL-SUBHI, A.M., GUNDERSEN,-RINDAL, D.E.and BERTACCINI, A.F. 2002. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. Phytopathology, 92(10): 1038-1047.

KHADHAIR, A. H., EVANS, I. R. VE CHOBAN, B. 2002. Identification of aster yellows phytoplasma in garlic and green onion by PCR-based methods. Microbiol. Res. 157:161–167.

KHADHAİR, H.A., HİRUKİ, C. and DEYHOLOS, M. 2008. Molecular characterization of aster yellows phytoplasma associated with valerin and sowthistle plants by PCR-RFLP analyses. Journal Phytopathology 156: 326-331.

LEE I.-M., HAMMOND R.W., DAVIS R.E. and GUNDERSEN D.E. 1993a. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology, 83: 834-842.

LEE, I.-M., DAVIS, R.E.and HSU, H.-T. 1993b. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasmalike organisms strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. Plant Disease, 77: 815-817.

LEE, I.-M., KLOPMEYER, M., BARTOSZYK, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., CHOU, T., THOMSON, K.L. and EISENREICH R. 1997a. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. Nature Biotechnology, 15: 178-182.

LEE, I.-M., PASTORE, M., VIBIO, M., DANIELLI, A., ATTATHOM, S., DAVIS, R.E. and BERTACCINI A. 1997b.Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poaannua*) white leaf disease in southern Italy. European Journal of Plant Pathology, 103: 251-254.

LEE, I.-M., GUNDERSEN-RİNDAL, D., DAVIS, R.E. and BARTOSZYK, I.M. 1998a. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 1153-1169.

LEE, I.-M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E.and BERTACCINI A. 1998b. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. Phytopathology, 88: 1359-1366

LEE I.-M. and DAVIS R.E. 1986. Prospects for *in vitro* culture of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. Annual Review of Phytopathology, 24: 339-354.

LEE, I.-M. and DAVIS, R.E. 1998. Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasmalike organism by using cloned DNA and RNA probes. Plant-Microbe Interactions, 1: 303-310.

LEE, I.-M., DAVIS, R.E. and GUNDERSEN-RINDAL D.E. 2000. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology, 56: 1593-1597.

LEE, I.-M., MARTINI, M., BOTTNER, K.D., DANE, R.A., BLACK, M.C. and TROXCLAIR, N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. Phytopathology, 93: 1368-1377.

LEE, I.-M., GUNDERSEN-RINDAL, D., DAVIS, R.E., BOTTNER, K.D., MARCONE, C. and SEEMUELLER, E. 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. International Journal of Systematic Bacteriology, 54: 1037-1048.

LEE, I.-M., ZHAO ,Y.and BOTTNER, K.D. 2006b. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. Molecular and Cellular Probes, 20(2): 87-91.

LORENZ, K.H., SCHNEİDER, B., AHRENS, U. and SEEMULLER, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology, 85: 771-776.

MARWITZ, R., PETZOLD, H. and KUNZE, L. 1974. Investigation on the transfer of possible causal agent of Apple Proliferation to a herbaceaus host. Phytopathologische Zeitschrift, 81: 85-91.

MARCONE C., LEE, I.-M., DAVIS, R.E., RAGOZZINO A.and SEEMULLER E. 2000. *C*lassification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(5): 1703-1713.

MARTINI, M., BOTTI, S., MARCONE, C., MARZACHI, C., CASATI, P., BI

MARTINI, M., LEE, I.-M., BOTTNER, K.D., ZHAO Y., BOTTI, S., BERTACCINI, A., HARRISON, N.A., CARRARO, L., MARCONE, C., KHAN, J.and OSLER R. 2007. Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2037-2051.

MOLLOV, D. and LOCKHART, B. 2014. First report of a 16SrI (Aster yellows) group phytoplasma on garlic (*Allium sativum*) in the United States. American Phytopathological,98:3-419.

NAMBA, S., KATO, S., IWANAMI, S., OYAIZU, H., SHIOZAWA, H.and TSUCHIZAKI, T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology, 83: 786-791.

NEJAT, N. K., SIJAM, S.N.A., ABDULLAH, G., VADAMALAI, and DICKINSON, M., 2009. First report of a 16SrXIV, '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' group phytoplasma associated with coconut yellow decline in Malaysia. Plant Pathol., 58: 389.

PLOAIE, P. G. 1981. Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. In Plant Diseases andVectors: Ecology and Epidemiology, 61-104.

SEEMULLER, E., KUNZE, L. and SCHAPER, U., 1984. Colonization behavior of MLO, andsymptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. Zeitschrift für Pfl anzenkrankheiten und Pfl anzenschutz, 91: 525–532.

SEEMULLER, E., 1990. Apple Proliferation. Compendium of Apple and Pear Diseases, . AmericanPhytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA ,67-68.

SCHNEIDER B., AHRENS U., KIRKPATRICK B.C.and SEEMULLER E. 1993. Classification of plantpathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. Journal of General Microbiology, 139: 519-527.

SMART, C. D., B. SCHNEIDER, C. L. BLOMQUIST, L. J. GUERRA, N. A. HARRISON, U. AHRENS, K. H. LORENZ, E. SEEMULLER, AND B. C. KIRKPATRICK, 1996. "Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region", Applied and Environmental Microbiology, 62(8):. 2988-2993

SCHNEIDER, B., GIBB, K.S.and SEEMULLER, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. Microbiology, 143: 3381-3389.

TAŞKAYA, B., 2003. Sarımsak. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayını, Sayı: 4, Ankara

WEI, W., KAKIZAWA, S., JUNG, H.Y., SUZUKI, S., TANAKA, M., NISHIGAWA, H., MIYATA, S., OSHIMA, K.,UGAKI, M., HIBI, T.and NAMBA S. 2004a. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. Phytopathology, 94(7): 683-686.

WEINTRAUB P.G. and BEANLAND L.A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Revue of Entomology, 51: 91-111.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	:Ferda DANIŞ
Uyruğu	:T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	:DİYARBAKIR-01.03.1992
Telefon	:05340194936
Faks	:
e-mail	: Danisferda.21@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe/ İl	Bitirme Yılı
Lise	Yeni Diyarbakır Lisesi	Yenişehir/DİYARBAKIR	2010
Üniversite	Harran Ünv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	Haliliye/ ŞANLIURFA	2015
Yüksek Lisans	Harran Ünv. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı	Haliliye / ŞANLIURFA	2018

UZMANLIK ALANI: Bitki Koruma

YABANCI DİLLER: İngilizce

EKLER

EK1. Ahrens ve Seemüller (1992) yöntemine göre DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltiler

CTAB Buffer pH 8.0 (200ml)

Kimyasal	**Miktar**
CTAB (%2)	4 g
NaCl (1,4M)	16,364 g
EDTA (20mM)	1,169 g
Tris-HCl (100mM)	2,422 g
PVP - 40	4 g
*ß-mercaptoethanol (% 2)	400µl

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

Chloroform/Isoamylalkol (24:1)

24 ml chloroform ve 1 ml isoamylalkol karıştırılmıştır.

EK2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

TAE buffer (50X stok)

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

Çözelti 100 ml d_2H_2O‟ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Ethidium Bromide

10 mg ethidium bromide 1 ml saf su içerisinde Eppendorf tüpünde eritilmiştir. Daha sonra bu ana stoktan 30 µl alınarak 100 ml saf su içerisine ilave edilmiştir.

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