T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞANLIURFA İLİ PEYZAJ MİMARİ ALANLARINDA BULUNAN AKASYA AĞAÇLARINDA FİTOPLAZMA HASTALIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Gülistan KORKMAZOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında, Gülistan KORKMAZOĞLU'nun hazırladığı **"Şanlıurfa İli Peyzaj Mimari Alanlarında Bulunan Akasya Ağaçlarında Fitoplazma Hastalığının 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 : 17103

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 4
3. MATERYAL ve YÖNTEM 9
3.1.Materyal 9
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller 9
3.1.2. PCR ve RFLP Çalışmaları için Materyalin Oluşturulması 9
3.2. Yöntem 10
3.2.1. Örnekleme Yapılan Ağaçlar ve Kullanılan Bitki Dokuları 10
3.2.3. PCR Çalışmalarında Kullanılan Kimyasalların Konsantrasyonlarının Ayarlanması . 11
3.2.4. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması 11
3.2.5. PCR Ürünlerinin *Eco*RI Restrüksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP) 13
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları 14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 15
4.1.Örnekleme Yapılan Ağaçlar 15
4.2. Moleküler Çalışmalar 18
4.2.1. Total Nükleik Asit İzolasyonu 18
4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 19
4.2.3. PCR Ürünlerinin *Eco*RI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP) 20
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 22
KAYNAKLAR 24
ÖZGEÇMİŞ 29
EKLER 30

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİ PEYZAJ MİMARİ ALANLARINDA BULUNAN AKASYA AĞAÇLARINDA FİTOPLAZMA HASTALIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Gülistan KORKMAZOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2018, Sayfa: 30

Top akasya (*Robinia pseudocacia* L.*)* ülkemizde peyzaj mimari alanlarında kullanılan bir ağaç çeşididir. Şanlıurfa ilinde bazı top akasya ağaçlarında yapraklarda sararma, küçük yaprak oluşumu, yaprak bükülmesi, geriye doğru ölüm ve büyüme anormallikleri biçiminde hastalık simptomları sergilemektedir. Bu simptomların fitoplazma enfeksiyonlarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışma, Şanlıurfa ilinde fitoplazma hastalıklarının belirtisine benzer simptomları gösteren top akasya ağaçlarının fitoplazma kaynaklı olup olmadığını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılmış, elde edilen total nükleik asitler PCR ve RFLP çalışmalarında kullanılmıştır. Etmenin tanılanması fitoplazmaların 16Sr DNA gen bölgesi üzerinden yürütülmüştür. R16F1/R0 üniversal primer çifti ile direkt, R16F2n/R2 primerleri ile nested PCR işlemine tabi tutulan örneklerin nested PCR sonuçlarında sadece simptom gösteren bitkilerde beklenen düzeyde bant (1250 bp) gözlenmiştir. PCR ürünleri üzerinden yapılan RFLP sonuçlarına göre etmenin fitoplazma olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma Şanlıurfa ilinde top akasya ağaçlarında fitoplazma etmeninin varlığını ortaya koyan ilk çalışmadır.

ANAHTAR KELİMELER: *Robinia pseudocacia* L., fitoplazma, PCR, RFLP

ABSTRACT

MSc Thesis

DETECTION OF PHYTOPLASMA DISEASE ON ACCACIA TREES IN ARCHITECTURAL LANDSCAPES OF SANLIURFA PROVINCE

Gülistan KORKMAZOĞLU

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Year: 2018, Page: 30

Top acacia (*Robinia pseudocacia* L.) is a tree species used in landscaping in Turkey. Some acacia trees exhibit disease symptoms in the form of leaf curling, small leaf formation, leaf twisting, backward death and growth abnormalities in Şanlıurfa province. These symptoms were thought to be due to phytoplasmic infections. The study was carried out to determine if top acacia trees showing symptoms similar to the characterisitcs symptoms of phytoplasmic diseases, are derived from phytoplasma. DNA was isolated according to CTAB method and used in our studies. Then the total nucleic acids were used for PCR and RFLP studies. The identification of disease was carried out in 16Sr DNA region of phytoplasmas. Results of nested PCR with R16F1/R0 universal primer pairs and R16F2n/R2 primer pairs showed molecular band at 1250 bp in infected plants. Based on the RFLP results, the agent was determined to be phytoplasma. This study is the first report to reveal the existence of phytoplasma in the acacia trees in Şanlıurfa province.

KEYWORDS: *Robinia pseudocacia*, phytoplasma, PCR, RFLP

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda düşünce, bilgi ve deneyimini paylaşan değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım esnasında yardımcı olan Arş. Görevlisi Eray ŞİMŞEK, Ziraat Yüksek Mühendisi Hümeyra AYVACI, doktora öğrencisi Havva GÜMÜŞ ve Emine KAPLAN'a, değerli aileme, özellikle babam Ali KORKMAZOĞLU'na teşekkür ederim.

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1. Yapraklarda şiddetli kuruma 15
Şekil 4.2. Çoklu sürgün oluşumu 16
Şekil 4.3. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar ve küçük yaprak oluşum 17
Şekil 4.4. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar 17
Şekil 4.5. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar ve küçük yaprak oluşumu 18
Şekil 4.6. Temmuz ayında simptom gösteren 5 farklı ağacın yaprak, yaprak orta damarı ve sap karışımı (1, 4, 7, 10, 13), yaprak orta damarı (2, 5, 8, 11, 14) ve simptom göstermeyen 5 farklı ağacın yaprak orta damarı ve sap karışımı (3, 6, 9, 12, 15) elde edilen R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünleri. %1 agaroz jel ortamı. M; 1 kb marker, N; negatif kontrol, P; pozitif kontrol 19
Şekil 4.7. Örnekleme yapılan beş farklı ağaçtan elde edilen ve R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen 750 bp ve 500 bp uzunluğundaki RFLP deseni agaroz jel (%2,5) görüntüsü. M: GeneRuler 100 bp 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. PCR çalışmalarında kullanılan primerler 12
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları 13

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

bp	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
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

Türkiye, floristik bakımdan zengin bir ülke olması nedeniyle çok sayıda yerli orman, ağaç ve ağaççıklarına sahiptir. Bununla beraber, bazı özellikleri nedeniyle bazı türler ülkemize ithal edilmeye başlanmış ve zamanla bunların sayıları da artmaya başlamıştır. Top akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) Türkiye'ye öncelikle ithal edilen yabancı türlerdendir (Atay, 1970).

Akasya, *Fabaceae* (Baklagiller) familyasına ait olup çoğunlukla yeşil yapraklı ve dikenli bir ağaçtır. Avustralya başta olmak üzere (yaklaşık 300 tür) sıcak ılıman ve yarı tropikal bölgelerde kendiliğinden yetişir. *Fabaceae* familyasına ait olan akasyalar doğada genellikle ağaç, nadir olarak da ağaççık ya da boylu veya bodur çalı olarak bulunurlar. Akasya; sert bir ağaçtır, dokusu sıkı ve sağlamdır, esnektir, vurulmaya ve sürtünmeye karşı direnci yüksek olup zor işlenir. Değişik hava koşullarında bile en dayanıklı ağaçlardan biridir. Dünyanın tropik ve subtropik bölgelerinde bulunurlar. Avustralya'da, Afrika'da Sudan'da ve güney bölgelerinde, Orta Amerika'da, Asya'nın tropik bölgelerinde yetişen türleri vardır. Akasya ağaçlarının kullanım alanları son yıllarda giderek artmaktadır. Hızlı büyüme özelliklerinden dolayı ağaçlandırmalarda kullanılmakta olup siyah ve kahverengi boyaların ve yapıştırıcı madde ve mürekkep yapımında, çiçeğinden kokulu şurup ve kolonya yapılmakta, eczacılıkta, şekercilikte ve başka sanayi dallarında kullanılan arap zamkı elde edilmektedir. Akasya yaprakları ve meyveleri hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır (Anonim, 2017).

Akasyanın Türkiye'de bugüne kadar Macaristan ve Bulgaristan'da olduğu gibi, ekonomik önemi içeren büyüklükte plantasyonları bulunmamaktadır. Türkiye'de orman idaresi dışında ağaçlandırma yapan müesseselerden biri olarak Devlet Demiryolları yarma ve dolma şevlerindeki toprakların tespiti, istasyon çevrelerinin ağaçlandırma yoluyla güzelleştirilmesinde bir yabancı tür olan yalancı akasyayı (*Robinia pseudoacacia* L.) kullanmıştır (Atay, 1970). Akasya (*Robinia pseudoacacia* L.), Kuzey Amerika'dan Avrupa'ya 1601 yılında ithal edilmiştir. Amerika'da Orta Pensilvanya'dan güney ve kuzey istikametinde Alabama Georgia, Batı Virjinya,

Marilend, Virjinya, Kentucky, Tennessee, Kuzey Karolayna ve Güney Karoleyna'da, ayrıca Güney Ohio ve Güneydoğu Hindistan'da esas yayılışını gösterir (Keresztesi, 1980). Akasya Amerika'dan Avrupa'ya ithal edilen ağaçların başında yer almaktadır. Eldeki mevcut kayıtlara göre halen suni olarak yetiştirilmiş 1 milyon hektar akasya ormanının bulunduğu bildirilmekte ve akasya kültür sahaları tesis etmekle ün yapmış ülkeler olarak; Kore Cumhuriyeti, Macaristan, Rusya, Romanya, Fransa, Bulgaristan, Yugoslavya, Çekoslovakya ve Çin konuşulmaktadır (Keresztesi, 1980). *Sophora japonica* cv. golden, Çinli bilgin tarafından 'altın ağaç' olarak nitelendirilmiş (*Sophora japonica* L.), Çin'de şehir peyzajı için önemli ve mükemmel bir gölge ağacı türüdür. *Robinia pseudoacacia* L. yaygın olarak 'yalancı akasya' diye bilinir. Doğu Amerika Birleşik Devletleri'nde doğal olarak yetişir ve diğer ülkelerde de canlılığını sürdürmüştür (Fernald, 1950). Yalancı akasya ağaçları ABD, Asya ve Avrupa'da yaygın olarak ormanlık arazilerde, ağaçlandırma çalışmalarında, endüstriyel ahşap üretiminde, arıcılıkta, toprak ve suyun korunmasına ek olarak nitrojenin fikse edilmesinde kullanılmıştır (Straker ve ark., 2015).

Ülkemizde peyzaj mimari alanlarında kullanılan en önemli tür; hızla büyüyen ve yaprak döken bir ağaç olan *Robinia pseudoacacia* 'Umbraculifera' (Top Akasya); uzun boylu geniş ve 6 metreye kadar büyür. Ağacın altında çok yoğun bir gölge oluşturur. Küresel yapılı, tacı yoğun ve sık, koyu yeşildir. Çok nadir çiçek açarlar, genellikle gölge ve yol ağacı olarak kullanılırlar. Koyu yeşil yaprakları birden çok yaprakçık oluşumu izlenimi verir, erken sonbaharda yaprak oranında azalma görülür. Sonbaharda kahverengiye dönen yalancı akasyanın meyve tohumlarının uygun çimlendirme ile ekilmesi ve yetişen fidelerin zamanında, toprağın ve bölgenin yapısına göre dikilmesi sonrası elde edilen yalancı akasya fidanları aşılı top akasya fidan üretiminin ana hammaddesini oluşturmaktadır (Gilman ve Watson, 2014).

Akasya türlerinin önemli ekolojik ve ekonomik değeri olmakla birlikte; Kırmızı örümcek (*Tetranychus* spp.), beyazsinek (*Bemisia tabaci*) ve kabuklu bit (*Aonidiella citrina*) en çok görülen zararlılardandır. Hastalık olarak da en çok külleme (*Erysiphe betae*), karaleke (*Venturia inaequalis*) ve kök boğazı çürüklüğü (*Fusarium* spp.)

görülmektedir. Son zamanlarda dünyada ve ülkemizde akasya ağaçlarını etkileyen ve bir bakteriyel etmen olan fitoplazma hastalıkları da rapor edilmiştir.

Fitoplazmalar, filogenetik olarak düşük G + C (Guanin+Sitozin) içeriğine sahip, Gram-pozitif bakterilerle ilişkili, hücre duvarı olmayan *Mollicute* sınıfının '*Candidatus* phytoplasma' cinsine ait bitki patojeni prokaryotlardır (Weisburg ve ark., 1989). Bu obligat parazitler, bitki ve eklem bacaklı konukçular arasında alternatif yaşam döngüsüne adapte olmuş ve konukçuya bağımlıdırlar (Zhao ve ark., 2015). Küçük genom boyutu (680-1.600kb) ile tanımlanırlar ve birçok bitki hastalıklarında etmen olarak bilinirler. Bitki patojeni Mollikütler; süs bitkileri, sebze, meyve ağaçları ve asma gibi ekonomik açıdan önemli bitkileri etkileyen yüzden fazla hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Lee ve ark., 2000). Konukçu bitkilerde etmenin taşınması, sokucu emici ağız yapısına sahip yaprak pirelerinin (*Empoasca* spp.) floem kalbur borularında bitki özsuyu ile beslenmesi veya psyllidlerin persistent şekilde taşınımı ile olur (Ploaie, 1981), ayrıca aşı ile ya da *Cuscuta* spp. gibi parazit bitkilerle olduğu saptanmıştır (Marwitz ve ark., 1974; Heintz 1986, Seemüller 1990). Bitkilerde, floemde çoğalırlar ve salgılanan efektör proteinlerini bitki hücrelerine salarlar. Hücresiz ortamda fitoplazmanın kültüre alınması yakın zamanda bildirilmiştir (Contaldo ve ark., 2012, 2013). Bu nedenle sınıflandırmaları ve taksonomileri öncelikle 16S rRNA gen dizi analizine dayanmaktadır.

Fitoplazmalar bodur büyüme, yapraklarda küçülme, boğum aralarının kısalması, tepe tomurcuğunun baskınlığını kaybetmesi gibi konukçu bitkide karakteristik simptomlar gösteren obligat parazitlerdir. Bu verimin azalmasına, sürgün veya köklerin çoğalmasına, cadı süpürgesi, geriye doğru ölüm veya bitkinin ölümüne yol açar. Bitkileri etkileyen birkaç simptomu; yeşillenme, çiçek yerine yaprak oluşumu ve kısırlıktır.

Bu çalışma Şanlıurfa ilinde peyzaj mimari alanlarında bulunan top akasya ağaçlarında; yapraklarda sararma, küçük yaprak oluşumu, yaprak bükülmesi, geriye doğru ölüm ve büyüme anormallikleri biçiminde gözlenen belirtilerin fitoplazmayla ilişkili olup olmadığının belirlenmesi için yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fitoplazmalar, *Mollicutes* sınıfına ait hücre duvarı olmayan bitki patojen bakterilerdir. Konukçu bitkilerde ve böcek vektörlerine bağımlı olarak yaşayıp, böceklerin ve bitkilerin sitoplazmalarında çoğalmaktadırlar. Bitkiden diğer bitkilere taşınımı bitki özsuyu ile beslenen vektör böcekler ile olmaktadır. Bitkilerde sadece besin açısından zengin floem dokusunda bulunmaktadırlar. Fitoplazma ile bulaşık birçok bitkide yeşillenme, anormal boğum arası uzaması, gövdede yassılaşma, cadı süpürgesi ve cüceleşme şeklinde simptomlar görülmektedir (Bertaccini ve ark., 1996; Lee ve ark., 1997).

Strauss (2009), fitoplazma ile ilgili bitki hastalıkları üzerine yapılan araştırmaların son yıllarda giderek artan bir ilgi gördüğünü belirtmiştir.

Fitoplazma hastalığının tanı, teşhis ve sınıflandırılması 16s rDNA gen bölgesine göre PCR-RFLP, Nested-PCR gibi moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Fitoplazmaların PCR ile çoğaltılmış 16s rDNA bölgesinin RFLP analizleri bilinen fitoplazmaları ayırt etmede geçerli bir yol olmuştur. Fitoplazmaların daha hassas ayrımı için ribozomal protein (rpgen), *Sec*Y, *tuf* ve 16s-ribozomal RNA bölge dizilerine ait genetik markırlar kullanılmaktadır (Smart ve ark., 1996; Lee ve ark., 1998a; Seemüller ve ark., 1998; Lee ve ark., 2004-2006; Martini ve ark., 2007).

Fitoplazmaların sınıflandırmaları ve taksonomileri öncelikle 16S rRNA gen dizi analizine dayanmaktadır. Kültüre alınamayan organizmaların taksonomisi için belirlenen kurallara göre (Murray ve Stacke-brandt, 1995), tüm fitoplazmalar şu anda geçici olarak *Candidatus* Phytoplasma'da barındırılmaktadır (IRPCM, 2004).

Bugüne kadar 35'ten fazla '*Candidatus* Phytoplasma' türü tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2015; Davis ve ark., 2016). 16S rRNA geninin RFLP analizleri fitoplazmaların gruplandırılması ve sınıflandırılması için yaygın olarak kullanılmış olup her biri alt grupları içeren 31 fitoplazma grubu, 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırmalı RFLP

modellerine dayanarak ayırt edilmiştir (Wei ve ark., 2007, 2008; Zhao ve ark., 2009). Buna ek olarak, *rp*lV-*rps*C (ribozomal protein) ve *Sec*Y genleri daha değişken genlerin sekans analizi, yakından ilişkili fitoplazmaların daha ince ayrımı için gerekli olmuştur (Martini ve ark., 2007; Lee ve ark., 2010).

Contaldo ve ark. (2016), fitoplazmaların en zayıf karakterize edilen bitki patojeni olmasının öncelikli nedenini yapay ortamda yetiştiriciliğinin yeni başlamış olmasına, gen aktarımı ve mutagenez denemelerinin bugüne kadar başarısız olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Fitoplazmalar geniş bir yelpazede konukçu bitkiye sahip, ekonomik açıdan önemli yüzlerce bitkiyi etkilemekte ve verimin yanı sıra ekonomik kayıplara da neden olmaktadırlar. Fitoplazmaların araştırılması ve erken teşhisinin zor olması, hastalık kontrolü için etkili stratejilerin geliştirilmesini geciktirmektedir (Bertaccini ve Düdük, 2009).

Constable ve Bertaccini (2017), asmada sarılık simptomu gösteren hastalıklara etmen fitoplazmaların, moleküler açıdan farklı birkaç taksonomik gruptan olduğunu belirtmişlerdir.

Avrupa'da, stolbur grubundan "*Candidatus* Phytoplasma solani" 16 SrXII-A Bois noir (BN) hastalığına neden olmuş ve üzüm salkımlarının % 50'sine kadar verim kaybına neden olmuştur. BN, çoğunlukla Avrupa-Akdeniz bölgesinde endemik olmakta; yayılımı, böcek vektörleri ve birçok otsu bitkiyi içeren karmaşık bir hastalık döngüsü ile gerçekleşmiştir. (Belli ve ark., 2010; Quaglino ve ark., 2013; Starý ve ark., 2013; Cvrković ve ark., 2014).

Spesifik olarak birincil ve ikincil derecedeki metabolizma ile ilgili genler fitoplazma enfeksiyonuna yanıt olarak değişmektedirler. Birçok fotosentez geni, enfekteli bitki dokularında büyük ölçüde azalma göstermektedir. Karbonhidrat metabolizmasına katılan genler, flavonoid sentezi ile ilişkili genler, patojenisite ile ilişkili proteinleri kodlayan bazı genler ve reaktif oksijen türü üretimi ile ilişkili genler

önemli ölçüde indüklenmiştir. Enzim ürünlerinin aktiviteleri ile ilişkili birçok metabolit, fitoplazma ile enfekteli bitkilerde genlerin arttığını göstermiştir (Hren ve ark., 2009a, b; Albertazzi ve ark., 2009; Landi ve Romanazzi, 2011; Santi ve ark., 2013; Covington Dunn ve ark., 2016; Prezelj ve ark., 2016b).

Fitoplazmalar olgunlaşmamış yaprakta ve köklerde iletim demetleri içinde bulunmakta olup genellikle köklerde düşük konsantrasyonda, gövdede orta derecede, olgun yapraklarda ise en yüksek konsantrasyonda bulunmaktadırlar. Fitoplazmalar için en iyi örnekleme zamanı bitkilerin gelişme dönemi olan Haziran ayından sonbahara kadarki dönemdir (Christensen ve ark., 2004).

Candidatus Phytoplasma aurantifolia limon ağacında çoklu sürgün hastalığına neden olmaktadır (Mardi ve ark., 2011).

Lethal yellowing (LY) hastalığı palmiyeleri ve hindistan cevizi ağaçlarını etkileyen önemli bir fitoplazma hastalığıdır (Harrison ve Jones, 2004; Brown ve ark., 2006).

Fitoplazmalar; mısır bitkisinde cüceleşmeye, patateslerde çoklu sürgün oluşumuna neden olmakta ve enfekteli bitkilerde ekonomik açıdan büyük kayıplara yol açmaktadırlar (Harrison ve ark., 1996; Mejia ve ark., 2013).

Ca. Phytoplasma pronorum, *Ca*. Phytoplasma pruni ve *Ca*. Phytoplasma pyri Türkiye'de farklı meyve ağaçlarında saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2014).

Susam bitkisinde *Ca*. Phytoplasma australasia Antalya ilinde saptanmıştır (Özdemir ve ark., 2014).

Ligustrum ovalifolium bitkisinde Turkish *ligustrum* witches' broom (TuLiWB) Adana'da rapor edilmiştir (Çağlar ve Elbeaino, 2013).

Adana, Aydın, Antalya ve Mersin illerinde yapılan bir çalışmada, *Cynodon dactylon* bitkisinde 16Sr-XIV grubuna giren Bermuda grass White leaf phytoplasma etmeni olduğu saptanmıştır (Çağlar ve ark., 2013).

Son zamanlarda akasya ağaçlarında dünyada ve ülkemizde fitoplazma etmeni üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Çağlar ve Elbeaino (2014), Ligustrum Witches' Broom Phytoplasma hastalığını Adana ilinde yeni bir konukçu olan top akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) ağaçlarında Türkiye'de ilk kez saptamış ve karakterize etmişlerdir. Simptom gösteren top akasya ağaçlarında görülen yaprak sararması, cadısüpürgesi oluşumu ve geriye doğru ölüm biçiminde belirti gösteren bitkilerden alınan örneklerden DNA izolasyonu ve PCR testlemeleri sonucunda fitoplazma etmeninin varlığını belirlemişlerdir. Bu bitkilere ait PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri fitoplazma orijinli bulunmuş ve Turkish Ligustrum witches' broom phytoplasma ile % 100 benzerlik göstermiştir.

Çin, Pekin ve Haidian bölgelerinden toplanan hastalıklı *Sophora japonica* cv. golden (akasya) ve *Robinia pseudoacacia* (akasya) ağaçlarında fitoplazma etmeni saptanmıştır. Fitoplazma hücreleri elektron mikroskobu tarafından enfekteli *S. japonica* ağacının kalbur borularında gözlenmiştir. Fitoplazmaların varlığı 16S rDNA, *rp* (ribozomal protein) ve *sec*Y kısmi gen sekanslarının dizi analizleriyle ile teyit edilmiştir. RFLP analiz sonuçlarında fitoplazmalara 16SrV (karaağaç sarılar) grubuna ait; *S. japonica* cv. *golden* witches'-broom (SJGWB) ve *R. pseudoacacia* witches'-broom (RPWB) neden olduğu ve onlara en yakın alt grup 16SrV-B, rpV-C ve *sec*YV-C jujube witches'-broom (JWB) fitoplazmalarıdır. JWB fitoplazmasının RPWB fitoplazmasına daha yakın olduğu ve alternatif konukçu bitki olarak akasyayı kullandığı karşılaştırmalı analizlerde görülmüştür (Ren ve ark., 2013).

Son yıllarda İran'da top akasya ağaçlarında sararma simptomları ve küçük yaprak oluşumu biçiminde simptom gösteren, yüksek oranda yıkıcı ve hızla ilerleyen hastalık black locust yellows (BLY) olarak adlandırılmıştır. Top akasya ağaçlarındaki sararma simptomları İran'da kalkerli topraklardan ötürü sorun olan bazı mikro besin

elementlerinin eksikliği olarak düşünülmüştür. İran'da popüler olan yalancı akasya ağaçları ülke genelinde kentsel ve kırsal yeşil alanlarda yaygın olarak dikilmiştir. Buna ek olarak İran'da hastalığın ortaya çıkması için mikro besin elementlerinin eksikliği yeterli bir tanımlama olmamıştır. Çin ve A.B.D'de benzer yalancı akasya ağaçlarında hastalığın fitoplazma ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Chapman ve ark., 2008; Moshki ve Lamersdorf 2011; Ren ve ark., 2014).

İran'ın farklı coğrafik bölgelerinde yalancı akasya (*Robinia pseudacacia*) ağaçlarında görülen sarılık simptomları fitoplazma hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Enfekteli ağaçlarda sararma, yaprak boyutunda küçülme, boğum aralarının kısalması ve bir noktada birden fazla sürgün oluşumu, çürüme ve geriye doğru ölüm şeklinde simptomlar görülmüştür. DNA ekstraksiyonu yaprak orta damar dokularından yapılmıştır. R16mF2 / R16mR1 üniversal fitoplazma primerleriyle Nested PCR'da 1.4 kb ve nested PCR'de Fu5 / Ru3 primerleri kullanılarak 850 bp ürün elde edilmiştir. Tüm simptomatik yalancı akasya ağaçlarının yanı sıra aşılanmış yalancı akasya ve cezayir menekşesi bitkilerinde de fitoplazma tespit edilmiştir. 16S rRNA gen dizilerinin analizi, yalancı akasya sarısı (BLYp) ile ilişkili fitoplazmaların, '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' (grup 16SrIX) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Filogenetik analiz BLYp izolatlarının 16SrIX-C fitoplazma ırklarıyla yakın bir ortak atayı paylaştıklarını göstermiştir (Karimzade ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel Materyaller

Bu araştırma Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuarında yürütülmüştür. Şanlıurfa ili peyzaj mimari alanlarında, kentsel ve kırsal bölgelerde simptom gösteren ve göstermeyen akasya ağaçlarından alınan yaprak ve sürgün örnekleri yapılan araştırmada bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2. PCR ve RFLP Çalışmaları için Materyalin Oluşturulması

Bu çalışmada fitoplazma ile benzer simptom gösteren akasya ağaçlarının yapraklarından elde edilen total nükleik asitler PCR ve RFLP'ye materyal olarak kullanılmıştır. PCR çalışmaları patojenin 16S rRNA geni üzerinden yapılmıştır.

İki aşamalı yapılan PCR testlerinde tüm örnekler için Direkt PCR'de 1400 bp ürün veren fitoplazma üniversal R16F1/R16R0 primer çifti (5'-AAGACGAGGATAACAGTGG-3'/ 5'-GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3') (Lee ve ark., 1994 / Davis ve ark., 1997) ile test edilmiştir. Nested PCR'de ise tüm örnekler 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 (5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3'/5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') (Gundersen and Lee, 1996) primer çifti ile test edilmiştir.

RFLP çalışmalarında *Eco*RI restriksiyon enzimi kullanılmış, enzimin alındığı firmanın önerdiği (Thermo Scientific, ABD) protokol dikkate alınarak yürütülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnekleme Yapılan Ağaçlar ve Kullanılan Bitki Dokuları

Şanlıurfa ili peyzaj mimari alanlarında, kentsel ve kırsal bölgelerde bodur büyüme, yapraklarda görülen sararma, damarlar arasında kuruma ve küçük yaprak oluşumu şeklinde belirtilerin görüldüğü ve simptom göstermeyen ağaçlarda dahil olmak üzere 2016 nisan ayından başlanılarak, yıl boyunca her ay örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin karışmasını önlemek ve bire bir enfektelenen ağacı bulmak için örnekler polietilen poşetlere ayrı ayrı konulmuş olup alındığı yer ve tarih not edilerek laboratuara getirilmiştir. Fitoplazma ile benzer simptom gösteren akasya ağaçlarının yaprak, yaprak orta damarı ve yaprak sapından DNA izolasyon çalışmasında kullanılmak üzere 1g alınmıştır.

Alınan örneklerden total DNA izolasyonu yapılmıştır ve daha sonra -80˚C derecede muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Total DNA Ekstraksiyonu Çalışmaları

Örnekleme yapılan her ağacın yaprak, yaprak orta damarı ve yaprak sapından 1 g alınarak DNA izolasyon çalışmasında kullanılmıştır. Ahrens ve Seemüller (1992)'nın kullandığı yöntemde total DNA ekstraksiyonu çalışmalarında bazı farklılıklar yapılarak uygulanmıştır;

a- Yaprak, yaprak orta damarı ve yaprak sapından alınan örnekler (1 g örnek için 4 ml) CTAB buffer (EK1) kullanılarak ekstraksiyonu yapılmıştır.

b- Ekstraksiyon dan 600 mikrolitre alınıp 1.5 ml lik Eppendorf tüplerine konulmuş ve 30 dakika 65°C de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.

c- İnkübasyon işleminden sonra tüpler içerisine 600µl chloroform/ isoamylalcohol (24:1) ilave edilerek 1 dakika süreyle vortex yapılmıştır.

d- Tüpler 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (c-d aşamaları 2 kez tekrarlanmıştır).

e- Tüpün üst kısımında kalan sıvıdan 400 mikrolitre alınarak yeni Eppendof tüplerine aktarılmış ve üzerine 2/3 oranında soğuk isopropanol ilave edilip -20°C de 1 saat bekletilmiştir.

f- Bekletme işleminden sonra tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

g- Pellet %70' lik etil alkol ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra pellet 50 µl TE içinde çözdürülmüş ve elde edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. PCR Çalışmalarında Kullanılan Kimyasalların Konsantrasyonlarının Ayarlanması

PCR çalışmaları 200 µl'lik PCR Eppendorf tüplerinde 50 µl hacimde yürütülmüştür. PCR çalışmalarında kullanılan DNA miktarları, nükleik asit izolasyonu sonucunda elde edilen yoğunluk dikkate alınarak 1/50 oranında sulandırılmıştır. Amplifikasyon sırasında her primer 10 pmol/µl konsantrasyonu ayarlanmıştır.

Bu çalışmanın amacına uygun olan hedef bölgelerin çoğaltılması için gerekli olan ve 100'er mM Deoksiribonükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lar dan 20' şer µl alınarak 25 mM olan 80µl lik dNTP karışımına 120µl ddH_2O eklemek suretiyle 200 µl ye tamamlanmıştır. Bu karışım sonucunda dNTP'ler 10 mM olarak elde edilmiştir. 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 50 µl olacak miktarda kullanılmıştır.

3.2.4. Hedef Bölgelerin Çoğaltılması

Total DNA 1/10 (V/V) oranında 1X TE ile ve elde edilen bu DNA'ler PCR çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmaları patojenin 16S rRNA geni üzerinden yapılmıştır. PCR çalışmaları direkt ve nested olmak üzere 2 aşamalı şekilde yürütülmüştür. Direkt-PCR'de 1400 bp ürün veren üniversal R16F1/R16R0

primerleri, Nested-PCR'de ise 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. PCR çalışmalarında kullanılan primerler

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)

*: Direkt PCR

**: Nested PCR

Nested-PCR çalışmalarında elde edilen 1250 bp molekül ağırlığına sahip DNA'lar RFLP çalışmalarında materyal olarak kullanılmış. PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. Örneklere uygulanan thermocycler programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı primerin tm (melting temperature) değeri dikkate alınarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. 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

Çoğaltılan Nested PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılıp buradan 1 µl PCR ürünü alınarak Nested-PCR çalışmasında hedef DNA olarak kullanılmıştır. Nested PCR çalışması Çizelge 3.2'de belirtilen Nested PCR koşullarında 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)

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.

RFLP çalışmalarında 10µl PCR ürünü 16µl ddH_2O ile sulandırılmış ve 3µl 10X buffer, 1µl restriksiyon enzimi ilave edilmiştir. Enzimin geni hedef bölgesinden (G↓A A T T C / C T T A A↑G) kesmesi için örnekler 37°C de 4 saat inkube edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra örnekler 1X lik TAE (pH 8,3) de hazırlanmış %2.5' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz Jel Elektroforez çalışmalarında PCR ve RFLP ürünleri kontrol edilmiştir. Nested-PCR ürünleri 1X lik TAE (pH 8.3) 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 800 mg olacak şekilde 80 ml 1x TAE buffer içerisinde Agaroz-karışımı eriyinceye kadar mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmıştır.

b- Karışım 40ºC ye kadar soğumaya bırakılarak elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp tarak yerleştirilmiştir.

c- Jel donduktan sonra tarak çıkartılarak jel'in üzeri 1-2mm kadar kaplayıncaya kadar tank içerisine 1X TAE buffer ilave edilmiştir.

d- Örnekler jel deki çukurlara 6 µl olacak şekilde yerleştirilmiştir. Marker olarak 6 µl DNA Ladder ilk çukura konulmuştur. Yükleme tamponundaki sarı renk jel'in sonuna gelene kadar jel tankına 5V/cm elektrik akımı verilmiştir.

e- Koşum işlemi tamamlandıktan sonra jel 5 dakika 1000 ml H_2O +50µl EtBr (10mg/ml) karışımı içerisinde boyanmıştır. Fazla EtBr uzaklaştırmak için 5 jel distile su içinde 5 dakika tutulmuştur.

Sonuçlar UV transilluminatör ile kontrol edilmiştir.

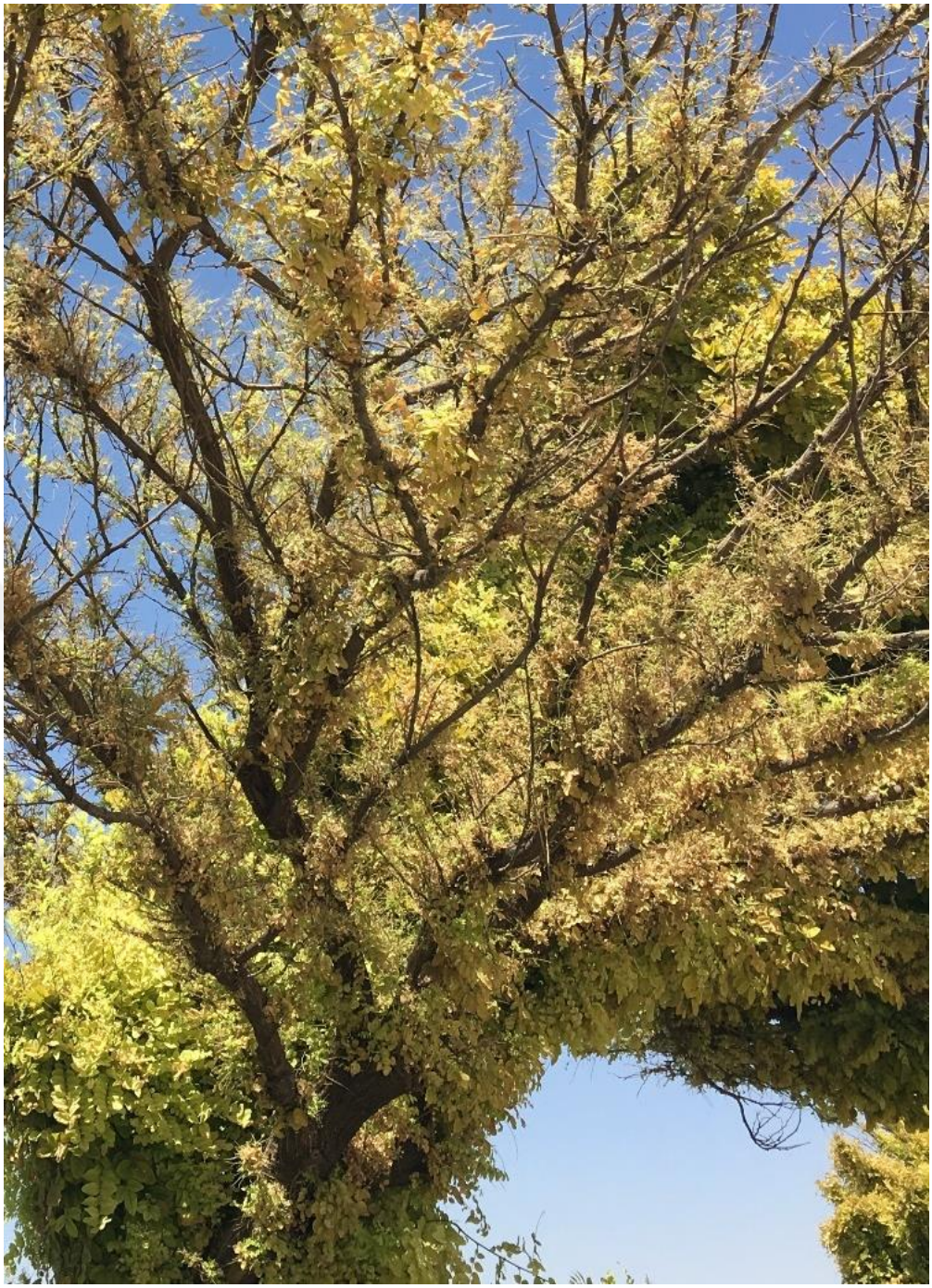
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1.Örnekleme Yapılan Ağaçlar

Bu çalışmanın temel amacı Şanlıurfa ili peyzaj mimari alanlarında bulunan akasya ağaçlarındaki sarılık simptomlarının fitoplazma hastalığının etiyolojisinde ve geniş dağılımındaki rolünün saptanmasıdır. Fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanan ağaçlarda; yapraklarda şiddetli kuruma (Şekil 4.1.), çoklu sürgün oluşumu (Şekil 4.2.), damarlar arasında kurumalar ve küçük yaprak oluşumu (Şekil 4.3.-Şekil 4.4.-Şekil 4.5.) şeklinde olmuştur.



Şekil 4.1. Yapraklarda şiddetli kuruma



Şekil 4.2. Çoklu sürgün oluşumu



Şekil 4.3. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar ve küçük yaprak oluşum



Şekil 4.4. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar



Şekil 4.5. Akasya ağacında damarlar arasında kurumalar ve küçük yaprak oluşumu

Gözlem yapılan bu bölgelerde görülen simptomlar İran'ın farkı coğrafik bölgelerinde yalancı akasya (*Robinia pseudacacia*) ağaçlarında görülen sarılık simptomlarıyla ilişkilendirilen fitoplazma hastalıklarıyla benzerlik göstermiştir (Chapman ve ark., 2008; Ren ve ark., 2014). Bu çalışmada ise enfekteli ağaçlarda yapraklarda sararma, küçük yaprak oluşumu, yaprak bükülmesi, geriye doğru ölüm ve büyüme anormallikleri biçiminde simptomlar gözlenmiştir.

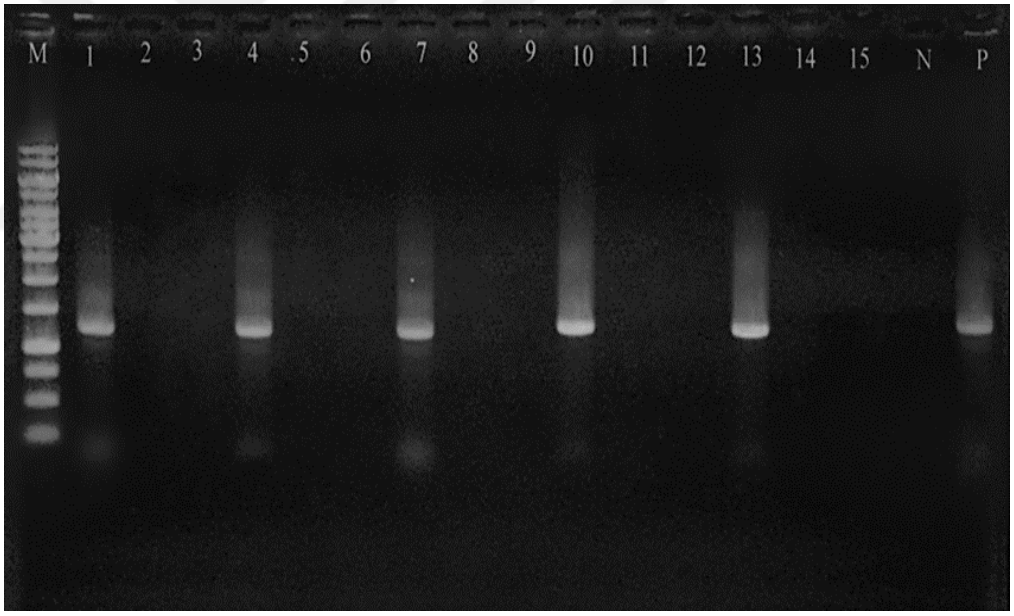
4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Total Nükleik Asit İzolasyonu

Akasya ağaçlarından elde edilen total nükleik asit izolasyonu Ahrens ve Seemüller (1992), yönteminde kısmi değişiklikler uygulanarak yapılmıştır. Fitoplazma etmenini saptamada nisan ayından itibaren akasya ağacından alınan örneklerin yaprak, yaprak orta damarı ve yaprak saplarından total DNA izolasyonu yapılmıştır.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) işlemi, Direkt-PCR ve Nested-PCR olmak üzereiki aşamada yapılmıştır. Direkt-PCR'de 1400 bp ürün veren üniversal R16F1/R16RO primerleri, Nested-PCR'de ise 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak nükleazsız su kullanılmış olup pozitif kontrol olarak da Harran Üniversitesi sera koşullarında fitoplazmayla enfekteli Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) kullanılmıştır. Direkt PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak R16F2n/R16R2 primer çiftleriyle Nested-PCR yapıldığında; akasya ağaçlarında Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında alınan örneklerin tümünde beklenen düzeyde bant gözlenmemiştir. Temmuz ayında alınan örnekler fitoplazma açısından pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Temmuz ayında simptom gösteren 5 farklı ağacın yaprak, yaprak orta damarı ve sap karışımı (1, 4, 7, 10, 13), yaprak orta damarı (2, 5, 8, 11, 14) ve simptom göstermeyen 5 farklı ağacın yaprak orta damarı ve sap karışımı (3, 6, 9, 12, 15) elde edilen R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünleri. %1 agaroz jel ortamı. M; 1 kb marker, N; negatif kontrol, P; pozitif kontrol

Odunsu bitkilerde floem dokusunda fitoplazma varlığı mevsimsel değişimlere bağlı olmak üzere değişiklik göstermektedir (Braun ve Sinclair, 1976).

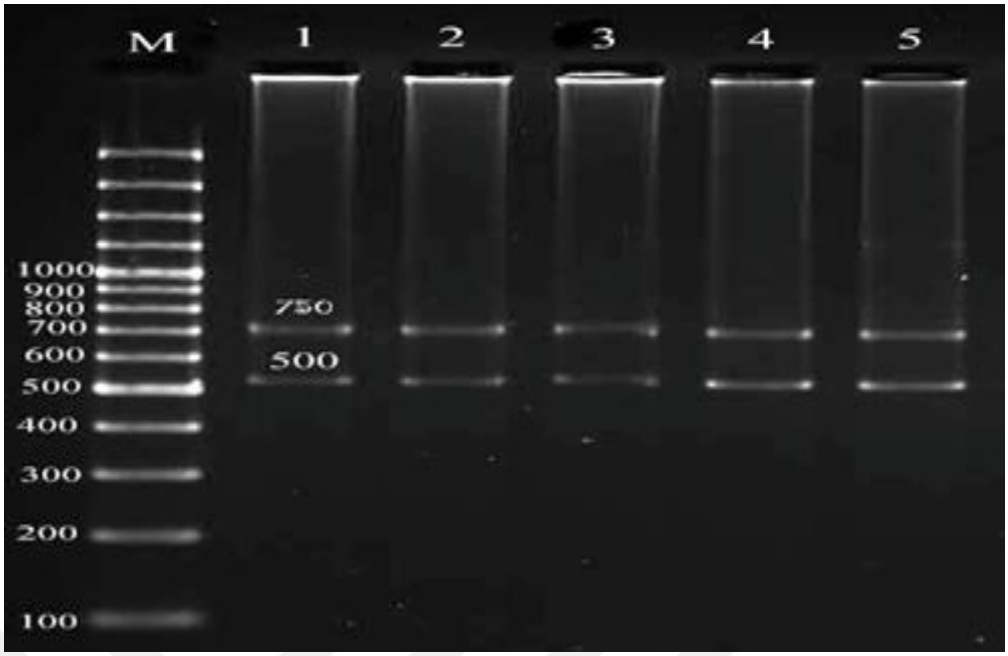
Jaraush ve ark. (1999), fitoplazma hastalığının Nisan ve Mayısta saptanamamasının en büyük nedenini hastalığın eski floemlerden yeni floemlere taşınmasının oldukça güç olduğunu ve bu aylarda floemin bozulduğunu rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada akasya ağaçlarından alınan 113 örneğin 56 tanesi PCR ve Nested PCR testlemeleri sonucunda fitoplazmayla pozitif sonuç vermiştir ayrıca simptom göstermeyen ağaçlarda herhangi bir hastalık tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada fitoplazma simptomu gösteren ve moleküler olarak hastalığın belirlenemediği akasya ağaçlarında fitoplazma varlığının, yıllara ve aylara göre dağılımının değiştiğini göstermek ve akasya ağaçlarında konsantrasyon farklılıklarından, düzensiz kalloz birikiminden veya çevresel etmenlerden dolayı hastalığın saptanmasının güç olduğu düşünülmektedir.

4.2.3. PCR Ürünlerinin *Eco*RI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)

Bu çalışma sonucunda PCR çalışması ile elde edilen ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilerek görüntülenen pozitif DNA örnekleri kullanılarak öncelikle etmenin fitoplazma olup olmadığı *Eco*RI enzimi ile kontrol edilmiştir (Nejat ve ark, 2009; Marzachi 2004; Seemüller 1998; Christensen ve ark, 2004). RFLP çalışmaları enzimin alındığı firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yürütülmüştür. Araştırmada her zaman için örnek alınacak ağaçlardan elde edilen 1250 bp'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde fitoplazma hastalığının varlığını ortaya koyan 750 bp ve 500 bp'lik bantlara ayrılmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Örnekleme yapılan beş farklı ağaçtan elde edilen ve R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen 750 bp ve 500 bp uzunluğundaki RFLP deseni agaroz jel (%2,5) görüntüsü. M: GeneRuler 100 bp

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Fitoplazmalar önemli sebze, meyve, süs bitkilerini içeren birçok bitki türünü hastalandırmaktadırlar (Ahrens ve Seemüller., 1992; Andersen ve ark., 1998; Davis ve ark., 1997). Fitoplazma kaynaklı hastalıkların listesi gün geçtikçe büyümeye devam etmektedir. Fitoplazma infeksiyonları dünya çapında çoğu önemli bitki türü için birincil kısıtlayıcı faktördür.

Akasya dünya genelinde yaygın olarak kullanılan çok yıllık bir bitkidir (Moshki ve Lamersdorf, 2011). Akasya, azotu bağlayıcılığı ile ekosistem açısından önemli bir ağaç türüdür. Akasya ağaçlarında fitoplazma hastalığının belirlenmesi ile ilgili yapılan araştırma ile şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Erken evrelerde görülen fitoplazma simptomları yapraklarda sistemik sararma oluşturmuştur.
2. Fitoplazma tarafından enfektelenen akasya ağaçlarında bodur büyüme, yaprak boyutunda küçülme, boğum aralarının kısalması ve tepe tacının büyüyen bölgelerinde bir noktada birden fazla sürgün oluşumu ve geriye doğru ölüm simptomları gözlenmiştir.
3. Simptomlar yaz aylarının sonlarına doğru daha fazla belirginleşmiştir. Hastalığın ileri evrelerinde akasya ağaçlarında uçtan itibaren kurumalar başlamış ve ağaçların yaprakları dökülmüştür.
4. Nested-PCR ve RFLP sonuçlarına göre bu şekilde simptom gösteren top akasya ağaçlarında fitoplazmanın varlığı moleküler yöntemlerle saptanmıştır.

Fitoplazma hastalıkları dünyada ve ülkemizde birçok kültür bitkisinde ekonomik boyutlarda kayıplara neden olmaktadır. Kültür bitkilerinin yanı sıra peyzaj alanlarında bulunan çeşitli ağaçlarda da fitoplazma etmenlerinin varlığı gün geçtikçe artmaktadır. Bölgemizde peyzaj mimari alanlarında bulunan akasya ağaçlarında fitoplazma etmenlerinin neden olduğu simptomlu (Sararma, bodurlaşma, küçük yaprak oluşumu vb.) ağaçlara rastlanılmıştır. Fitoplazmalar hastalıklı bitkiden sağlıklı bitkiye vektör

böceklerle kolaylıkla taşınmaktadır. Akasyalarda fitoplazma hastalıklarının varlığı kültür bitkilerini de tehdit etmektedir. Peyzaj alanlarında bulunan bu ağaçların fitoplazmalara konukçuluk ettiği düşünülmektedir. Bu gibi kültüre alınamayan etmenlerin neden olduğu hastalıklarla mücadelede en önemli adımlardan birtanesi de etmenin alternatif konukçularının belirlenmesidir. Bu çalışma ile hastalık simptomu gösteren akasyalarda fitoplazma etmenlerinin varlığı saptanmıştır.

Bölgede akasya ağaçlarında görülen şiddetli sararmaların doğrudan fitoplazma hastalığı ile ilişkili olduğu yapılan testlemeler (PCR, RFLP) ve dizi analizi sonucunda kanıtlanmış olup bu konu Şanlıurfa peyzaj mimari alanlarında bulunan akasya ağaçlarında fitoplazma teşhisi açısından yapılan ilk araştırma niteliğini taşımaktadır. Akasya ağaçlarında saptanan fitoplazmanın hangi fitoplazma etmeninden kaynaklandığını belirlenmesinin, ayrıca bu hastalık etmeninin akasya ağaçlarından başka kültür bitkilerine taşınıp taşınmadığının, vektörü olup olmadığının ve ara konukçularının belirlenmesi için çalışmaların bölgede yürütülmesi gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

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

ANDERSEN, M.T., LONGMORE J., LIEFTING L.W., WOOD G.A., SUTHERLANDP. W., BECK D.L. and FORSTER R.L.S., 1998. Phormium Yellow Leaf Phytoplasma Is Associated With Strawberry Lethal Yellows Disease In New Zealand. Plant Disease, 82: 606-609.

ANONİM, 2017. https://www.beyazegitim.com/akasya-agaci-hakkinda-genel-bilgi (son erişim tarihi:30.09.2017).

ALBERTAZZI, G., MILC, J., CAFFAGNI, A., FRANCIA, E., RONCAGLIA, E., FERRARI, F., 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. Plant Science, 176: 792-804.

ATAY, İ., 1970. Genel ve Teknik Yönleri ile Türkiye'de Ağaçlandırma. İ. Ü. Orman Fakültesi Yayınları, No:158.

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.

BERTACCINI, A., ve DUDUK, B., 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. Phytopathologia Mediterranea, 48: 355-378.

BRAUN, E.J. and SINCLAIR, W.A., 1976. Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. Phytopathology, 66: 598–607.

BROWN, S.E., BEEN, B.O. and MCLAUGHLIN, W.A., 2006. Detection and Variability of the Lethal Yellowing Group (16SrIV) Phytoplasma in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. Annals of Applied Biology, 149: 53-62.

CHAPMAN, G.B., BUERKLE, E.J., BARROWS, E.M., DAVİS, R.E. and DALLY, E.L., 2008. A light and transmission electron microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches'-broom, and classification of the associated phytoplasma. J. Phytopathol., 149: 589-597.

CHRISTENSEN, N.M., NICOLAISEN, M., HANSEN, M. and SCHULTZ, A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. Molecular Plant–Microbe Interactions, 17: 1175-1184.

CONSTABLE, F.E., GIBB, K.S. and SYMONS, R.H., 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. Plant Pathology, 52: 267-276.

CONTALDO, N., BERTACCINI, A., PALTRINIERI, S., WINDSOR, H. M. and WINDSOR, G.D., 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. Phytopathologia Mediterranea, 51(3): 607-617.

CONTALDO, N., BERTACCINI, A., PALTRINIERI, S., Windsor, D., Windsor, H., 2013. Cultivation of several phytoplasmas from a micropropagated plant collection. Petria, 23: 13-18.

COVINGTON DUNN, E., ROITSCH, T., ve DERMASTIA, M., 2016. Determination of the activity signature of key carbohydrate metabolism enzymes in phenolic-rich grapevine tissues. Acta Chimica Slovenica, 63: 757-762.

CVRKOVIĆ, T., JOVIĆ, J., MITROVIĆ, M., KRSTIĆ, O., ve TO ŠEVSKI, I., 2014. Experimental and molecularevidence of Reptalus panzeri as a natural vector of bois noir. Plant Pathology, 63(1): 42-53.

ÇAĞLAR, B.K. and ELBEAINO, T., 2013. A novel phytoplasma associated with witches' broom disease of *Ligustrum ovalifolium* in Turkey. Europan journal of Plant Pathology, 113: 113-117.

ÇAĞLAR, B.K. and ELBEAINO, T., 2014. Ligustrum Witches'Broom Phytoplasma hastalığının Adana ilinde yeni bir konukçu olan top akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) ağaçlarında saptanması ve Karakterizasyonu. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, s. 289.

ÇAĞLAYAN, K., GAZEL M., SERÇE, Ç.U. ve KAYA, K., 2014. Türkiye'de Bazı Meyve Ağaçlarında Saptanan Fitoplazmalar ve Olası Vektörleri. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, s: 190.

DAVIS, R.E., E.L. DALLY, D.E. GUNDERSEN, I.M. LEE and N. HABILI, 1997. "*Candidatus* Phytoplasma australiense", a new phytoplasma taxon associated with Australian Grapevine yellows. Int. J. Syst. Bacteriol, 47: 262-269.

DAVIS, R.E., HARRISON, N.A., ZHAO, Y., WEI, W., DALLY, E.L., 2016. 'Candidatus Phytoplasma hispanicum', a novel taxon associated with Mexican periwinkle vires-cence disease of Catharanthus roseus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66(9): 3463-3467.

GILMAN, E. F., WATSON, D. G., 2014. *Robinia pseudoacacia* 'Umbraculifera' Black Locust. Environmental Horticulture Department, UF/IFAS Extension, S. 1-3.

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

HARRISON, N.A., RICHARDSON, P.A., TSAI, J.H., EBBERT, M.A. and KRAMER, J.B., 1996. PCR Assay for Detection of the Phytoplasma Associated with Maize Bushy br Stunt Disease. Plant Disease, 80: 263-269.

HARRISON, N.A., and JONES, P., 2004. Lethal yellowing. In: Elliott, M.L.,Broshcat, T.K., Uchida, J.Y. and Simone, G.W (eds.). Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders. APS Press, St. Paul., MN., 39-41.

HREN, M., NİKOLIĆ, P., ROTTER, A., BLEJEC, A., TERRIER, N., RAVNIKAR, M., DERMASTIA, M., ve GRUDEN, K., 2009a. Bois noir phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. BMC Genomics, 26: 290-300.

HREN, M., RAVNIKAR, M., BRZIN, J., ERMACORA, P., CARRARO, L., BIANCO, P. A., CASATI, P., BORGO, M., ANGELINI, E., ROTTER, A., and GRUDEN, K., 2009b. Induced expression of sucrose synthaseand alcoholde hydrogenase Igenesin phytoplas mainfected grapevine plants grown in the field. Plant Pathology, 58(1): 170-180.

IRPCM, 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1243-1255.

JARAUSCH, W., LANSAC, M. and DOSBA, F., 1999. Seasonal colonization pattern of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma in different *Prunus* species detected by specific PCR. J. Phytopathology, 147: 47-54.

KARIMZADE, M., SIAMPOUR, M.,ZAKIAGHL, M. and MEHVAR, M., 2017. Identification and characterization of a phytoplasma associated with black locust yellow disease in two provinces of Iran. Crop Protection, 1-8.

KERESZTESI, B.,1980. The Black locust. Unasylva Yol. 32. No. 127.

LANDI, L., and ROMANAZZI,G. 2011. Seasonal variation of defense related gene expressionin leaves from Bois noir affected and recovered grapevines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 6628-6637.

LEE, I.M., GUNDERSEN, D. E., HAMMOND, R. W. and DAVIS, R. E., 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology, 84: 559-566.

LEE, I.M., KLOPMEYER, M., BARTOSZYK, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., CHOU, T., THOMSON, K.L. and EISENREICH, R., 1997. Phytoplasma Induced Free-Branching in Commercial Poinsettia Cultivars. Nature Biotechnology, 15: 178-182.

LEE, I.M., GUNDERSEN-RİNDAL, D.E. and BERTACCİNİ, A., 1998. Phytoplasma: Ecology and GenomicDiversity. Phytopathology, 88: 1359-1366.

LEE, I.M., DAVIS, R.E. and GUNDERSEN-RINDAL, D.E., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. Annu. Rev. Microbiol., 54: 221-255.

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 SystematicBacteriology, 54: 1037-1048.

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

MARDI, M., KHAYAM NEKOUEI, S.M., KARIMI FARSAD, L., EHYA, F., SHABANI, M., SHAFIEE, M., TABATABAEI, M., SAFARNEJAD, M.R., JOUZANI, G.S. and SALEKDEH, G.H., 2011. Witches' Broom Disease of Mexican Lime Trees: Disaster to Be Addressed beforeIt Will Be TooLate. Bulletin of Insectology, 64: 205-206.

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.

MARWITZ R., PETZOLD H. and ÖZEL, M., 1974. Untersuchungen zur Übertragbarkeit des möglichen Erregers der Triebsucht des Apfels auf einen krautigen Wirt. - Phytopath. Z., 81: 85-91.

MOSHKI, A. and LAMERSDORF, N.P., 2011. Growth and nutrient status of introduced black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) afforestation in arid and semi-arid areas of Iran. Res. J. Environ, 5: 259-268.

MURRAY, R. G. E., STACKE-BRANDT, E., 1995. Taxonomicnote: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. J. Syst. Evol. Microbiol, 45: 186-187.

MEJIA, J.F., ZAMORA, L., DUDUK, B., QUIÑONES, M.L., BERTACCINI, A. and CONTALDO, N., 2013. Caratterizzazione Molecolare di Ceppidi '*Candidatus* Phytoplasma asteris' da Mais. Petria, 23: 135-138.

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.

ÖZDEMİR, Z., TOPUZ, H., ERLER, F. and ÇAĞIRGAN, M.İ., 2014. Antalya İli Susam Alanlarından Toplanan *Orosiusorientalis* (Matsumura) (Homoptera:Cicadellidae)'lerde '*Candidatus* Phytoplasma australasia'nın Tespiti. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya. s.191.

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

QUAGLINO, F., ZHAO, Y., CASATI, P., BULGARI, D., BIANCO, P. A., WEI, W., ve DAVIS, R. E., 2013. *Candidatus* Phytoplasma solani, a novel taxon associated with stolbur and bois noir-related diseases of plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 2879-2894

REN, Z.G., LIN, C.L., SONG, C.S., PIAO, C.G. and TIAN, G.Z., 2013. Comparative molecular analyses of phytoplasmas infecting *Sophora japonica* cv. golden and *Robinia pseudoacacia*. Journal of Phytopathology, 162: 98-106.

REN, Z.G., LIN, G.L., LI, Y., SONG, C.S., WANG, X.Z., PIAO, C.G. and TIAN, G.Z., 2014. Comparative molecular analyses of phytoplasmas infecting *Sophora japonica* cv. golden and *Robinia pseudoacacia*. J. Phytopathol., 162: 98-106.

SANTI, S., DE MARCO, F., POLIZZOTTO, R., GRISAN, S., ve MUSETTI, R 2013. Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. Frontiers in Plant Science, 4:171-182.

SEEMULLER, E., MARCONE, C., LAUER, U., RAGOZZINO, A. and GOSCHL, M., 1998. Current Status of Molecular Classification of the Phytoplasmas. Journal of Plant Pathology, 80: 3-26.

STRAUSS, E., 2009., Phytoplasma Research Begins to Bloom. Science, 325: 388-390.

STRAKER, K.C.,QUINN, L.D., VOIGT, T.B., LEE, D.K. and KLING, G.J., 2015. Black Locust as a bioenergy feed stock: a review. Bio Energy Res., 8: 1117-1135.

SMART, C.D., B. SCHNEIDER, C.L. BLOMQUIST, GUERRA, L.J. and HARRISON, N.A., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Phytopathology, 62: 2988-2993.

STARÝ,M.,VÁLOVÁ,P.,ŠAFÁŘOVÁ,D.,LAUTERER,P.,ACKERMANN,P.,ve NAVRÁTIL, M., 2013. Survey and molecular detection of Bois noir in vineyards of the Czech Republic–Short communication. Horticultural Science (Prague), 40: 83-87.

WEI, W., DAVIS, R.E., LEE, I.M., ZHAO, Y., 2007. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 1855-1867.

WEI, W., LEE, I.M., DAVIS, R.E., SUO, X., ZHAO, Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58: 2368-2377.

WEISBURG, W. G.,TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H.,YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J. and LAWRENCE, T. G., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. J Bacteriol., 171: 6455-6467.

ZHAO, Y., WEI, W., LEE, M., SHAO, J., SUO, X. and DAVIS, R. E., 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhy Classifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). Int J Syst Evol Microbiol, 59: 2582-2593

ZHAO, Y., DAVIS, R.E., WEI, W., LEE, I.M., 2015. Should ‘Candidatus Phytoplasma’ be retained within the order ZAcholeplasmatales. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65: 1075-1082.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Gülistan KORKMAZOĞLU
Uyruğu :T.C
Doğum Yeri ve Tarihi :ŞANLIURFA/SİVEREK-24.03.1992
Telefon :0531 978 43 98
e-mail : glstnkorkmazoglu@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe/ İl	Bitirme Yılı
Lise	Siverek Karacadağ Anadolu Lisesi	Siverek/ŞANLIURFA	2009
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

YAYINLAR:

KORKMAZOĞLU, G., ŞİMŞEK, E., AYVACI, H., GÜMÜŞ, H., ve GÜLDÜR, M. E., 2016. Fitoplazmaların Böcek Vektörlerini Yakalama Teknikleri. Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Konya s. 313.

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 mlisoamylalkol karıştırılmıştır.

EK2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

TAE buffer (10mM Tris, 5mM Sodium acetate, 0,5 mM EDTA (pH: 8.3)

1X TAE buffer hazırlamak için 1.211 gr Tris-Base, 0.680 gr sodiumacetate ve 0.186 gr EDTA 900 ml saf su içerisinde eritilmiştir. Çözeltinin pH sı 8.3 olarakayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml ye tamamlanmıştır.

Ethidium Bromide

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