

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR İLİ MISIR ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN
FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
ARAŞTIRILMASI

MEHMET KAÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

OCAK 2018

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR İLİ MISIR ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN
FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
ARAŞTIRILMASI

MEHMET KAÇAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

OCAK 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tezin Başlığı: Diyarbakır ili Mısır üretim alanlarında görölen Fitoplazma hastalıklarının moleküler yöntemler ile araştırılması

Tezi Hazırlayan: MEHMET KAÇAR

Sınav Tarihi: 11.01.2018

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri:

Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU
İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. H. Diğdem OKSAL
İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. MUSTAFA USTA
Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum Diyarbakır İli Mısır Üretim Alanlarında Görülen Fitoplazma Hastalıklarının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

MEHMET KAÇAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİYARBAKIR İLİ MISIR ÜRETİM ALANLARINDA GÖRÜLEN FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Mehmet KAÇAR

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Murat Sipahioğlu

30+vii sayfa

2018

Diyarbakır ili Mısır üretim alanlarındaki muhtemel fitoplazma hastalıklarını araştırmak amacıyla 2016 yılında kapsamlı survey çalışmaları yürütülmüştür. Toplanan numunelerdeki ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, ‘*Candidatus phytoplasma solani*’ ve ‘*Spiroplasma kunkelii*’ fitoplazmalarının varlığı, universal primerlerin kullanıldığı Nested-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm PCR testlerinde pozitif ve negatif kontroller bulundurulmuştur. Yürütülen survey çalışmalarında genel olarak mısır bitkilerinde fitoplazma-benzeri belirti gösteren bitkilerin oranının %1’den çok daha az olduğu gözlenmiştir. Elde edilen gözlem sonuçlarını laboratuvar testlerini doğrulamıştır. Diyarbakır ili survey alanlarından toplanan toplam 225 mısır örneğinin hiçbirinde araştırma konusunu oluşturan fitoplazma hastalığına rastlanmamıştır. Elde edilen test sonuçlarına göre surveyler esnasında gözlemlenen kimi fitoplazma-benzeri belirtilerin biyotik ya da abiyotik hastalık etmenlerinden ileri geldiği anlaşılmıştır. Yörede yetiştiriciliği yapılan mısırlarda fitoplazma ve sipiroplazma hastalıklarının tespit edilmemiş olması Diyarbakır ili mısır yetiştiriciliği açısından önemli bir şans olarak değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diyarbakır, mısır, fitoplazma hastalıkları, survey, nested-PCR

ABSTRACT

Mehmet KAÇAR

M.Sc. Thesis, Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. H. Murat Sipahioğlu

30+vii Page

2018

INVESTIGATION OF PHYTOPLASMA DISEASES IN CORN PRODUCTION AREAS OF DIYARBAKIR PROVINCE BY MOLECULAR METHODS

Survey were conducted in 2016 in order to investigate possible phytoplasma diseases in the main corn production areas of Diyarbakır province. The presence of '*Candidatus* phytoplasma asteris', '*Candidatus* phytoplasma solani' and *Spiroplasma kunkelii* phytoplasmas in the collected samples were investigated by Nested-PCR method using universal primers. Positive and negative controls were included in each PCR assay. In the survey studies conducted, it was observed that the proportion of plants showing phytoplasma-like symptoms in maize plants was much less than 1%. The observations were confirmed the laboratory test results. None of the 225 corn samples collected from the Diyarbakır province and its districts were found infected by any phytoplasma diseases screened in this study. According to the test results obtained, it has been understood that phytoplasma-like symptoms observed in maize plants were derived from other biotic or abiotic disease factors. The fact that phytoplasma and spiroplasma diseases have not been detected in the corn cultivated in the region is considered as an important chance for Diyarbakır's maize cultivation.

Key Words: Diyarbakır, maize, phytoplasma diseases, survey, nested-PCR

TEŞEKKÜR

Mısır üretimi Diyarbakır ilinde son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Diyarbakır ilinde yaklaşık olarak 200.000 dekar alanda mısır üretimi yapılmaktadır. Dünyada mısır üretim alanlarında fungal, bakteriyel, viral, ve fitoplazma hastalıkları önemli oranlarda verim kayıplarına neden olmaktadır. Mısır üretim alanlarında görülen ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, ‘*Candidatus phytoplasma solani*’ ve *Spiroplasma kunkelii* önemli fitoplazma ve spiroplazma hastalıkları arasında yer almaktadır. Ülkemizde mısır üretim alanlarında görülen fitoplazma hastalıklarının tespitine yönelik günümüze kadar yürütülmüş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bugün itibarı ile fitoplazma ve spiroplazma hastalıklarını önlemeye yönelik kullanılabilecek herhangi bir kimyasalın olmaması bu hastalık etmenlerine karşı uygulanabilecek kültürel önlemleri ön plana çıkartmaktadır.

Yürütülen bu çalışma ülkemiz mısır üretim alanlarında verim kayıplarına neden olan fitoplazma ve sprioplazma etmenlerinin varlığının tespiti açısından oldukça öneme sahiptir. Bu çalışma sonucunda Diyarbakır ili mısır üretim alanlarında herhangi bir fitoplazma hastalığının varlığı tespit edilememiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren yol gösteren özellikle maddi ve manevi olarak yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım. Çalışma sırasında emeği geçen Yüksek lisans öğrencileri Ebru İLHAN ve Neslihan TURGUT’a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesinde İnönü üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Başkanlığı (BAP) 2016.12 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	ÖZET	i
	ABSTRACT	ii
	TEŞEKKÜR	iii
	İÇİNDEKİLER	iv
	ŞEKİLLER DİZİNİ	v
	ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
	SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1.	GİRİŞ	1
2.	LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	4
2.1.	Mısır çalimsı cücelik fitoplazması (Maize bushy stunt phytoplasma)	8
2.2.	Mısır kızarıklık hastalığı (Maize redness disease)	9
2.3.	Mısır cücelik spiroplazması (Maize stunt spiroplasma)	10
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1.	Materyal	11
3.2.	Yöntem	12
3.2.1.	Survey çalışmaları	12
3.2.2.	Moleküler test çalışmaları	12
3.2.2.1.	DNA ekstraksiyonu	12
3.2.2.2.	Universal primerler	13
3.2.2.3.	PCR reaksiyonu	14
3.2.2.4.	PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde koşulması	15
3.2.2.5.	DNA'yı görüntüleme ve analizi	16
4.	BULGULAR	17
4.1.	Survey Çalışması	17
4.1.2.	Moleküler çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılacak izolatın temini	18
4.1.3.	Moleküler çalışmalar	18
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	22
6.	KAYNAKLAR	24
7.	ÖZGEÇMİŞ	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1	Diyarbakır ilinde survey gerçekleştirilen alanlar	10
Şekil 3.2	Çoğaltılan fitoplazma PCR ürünlerinin floresan boya ile hazırlanan %1'lik jele yüklenmesi	14
Şekil 3.3	Fitoplazmaların rRNA geni üzerinde Nested-PCR ile çoğaltılan R16mF2-R16mR1 fragmenti ile etmenin grup ve alt gruplarının tespit edilmesinde yararlanılan 16S rRNA genini içeren R16F2n-R16R2 fragmentinin şematik gösterimi	15
Şekil 4.1	Mısırdaki kızarıklık ve koçanda deformasyonlar	16
Şekil 4.2	Bismil, Çınar, Silvan ve Yenişehir ilçerinden alınan örneklerde ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris', ' <i>Candidatus</i> phytoplasma solani' ve <i>Spiroplasma kunkelii</i> için uygulanan Nested-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker P1, P2: Pozitif kontroller, N: Negatif kontrol	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Nested-PCR 1.adım ve 2.adım testi ile kullanılacak primer dizilerine ait bilgiler	10
Çizelge 3.2	PCR’da kullanılan malzemeler. 1.Adım: Direkt-PCR 2.Adım: Nested-PCR	11
Çizelge 3.3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris’, <i>Candidatus</i> phytoplasma solani’ ve <i>Spiroplasma kunkelii</i> fitoplazmalarının PCR ile araştırılması için çoğaltılan bölgenin baz uzunluğu ve PCR sıcaklık döngüleri	12
Çizelge 4.1	2016 yılı Diyarbakır ilçlerinde alınan örnekler ve sayıları	14

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	Mikron
μl	Mikrolitre
G	Gram
Dk	Dakika
Mg	Miligram
V	Volt

Kısaltmalar

A	Adenin
C	Sitozin
EtOH	Ethanol
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
dNTP	Deoksinüklotidtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminotetraaceticacid
MgCl ₂	Magnezyum klorü
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNAse	Ribonükleaz enzim
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transkriptase
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
T	Timin
1XTAE	Tris Asetik asit EDTA
<i>Taq</i> DNA	Polimeraz Termo stabil DNA polimeraz enzimi
U	Urasil

1.GİRİŞ

Mısır, *Zea mays* L. bitkisinin anavatanı Amerika kıtası olup dünyaya yayılması bu kıtanın keşfinden sonra olmuştur. Mısırın Türkiye'ye 1600 yıllarında geldiği bilinmektedir (Kün, 1997). Dünya nüfusunun, enerji ve protein ihtiyacının büyük bir kısmını karşılayan tahıllar içerisinde mısırın ayrı bir önemi vardır. Bir sıcak iklim bitkisi olan mısır, sahip olduğu çeşit zenginliği ve yüksek adaptasyon kabiliyeti nedeni ile dünyanın hemen her yerinde tarımı yapılabilen bir kültür bitkisidir (Sezer ve Yanbeyi, 1997).

Mısırın sistematikteki yeri şöyledir.

Alem: Plantae (Bitkiler)

Şube: Angiospermae (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Monocots (Tek çenekliler)

Takım: Poales

Familya: Poaceae

Cins: *Zea*

Tür: *Zea mays* L.

Mısırın botanik özellikleri;

Mısır, *Poaceae* (bugdaygiller) familyasına ait monokotiledon bir bitkidir.

Poaceae familyası içerisinde çiçeklenme biçimi bakımından diğer türlerden farklıdır. Çiçekleri monoik yapıda olup, erkek (tepe püskülü) ve dişi çiçekler (koçan) aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. Mısır, $2n=20$ kromozomlu olup diploid bir bitkidir. Mısır, geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle Dünya'nın farklı bölgelerinde kültürü yapılabilmektedir. 50° kuzey enleminden 50° güney enlemlerine, deniz seviyesi ile 3000 m ye kadar olan yüksekliklerde ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilmektedir (Morris, 2002)

Mısır, geniş bir kullanım alanı olması nedeni ile diğer tahıllara göre oldukça farklı bir konuma sahiptir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılabilir. Hayvan beslenmesinde yem hammaddesi olarak kullanılan mısır, insan beslenmesinde ise doğrudan kullanımının yanı sıra birçok gıda maddesinin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Mısır danesinin yapısında ticari değere sahip bir çok kimyasal bileşik vardır. Olgun

bir danede %70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ içerir (Earle ve ark., 1946). Mısır, nişasta protein ve yağ kaynağı olarak kullanılmasının dışında diğer birçok kullanım alanları (glikoz; içeceklerde ve reçel yapımında, etanol; biodizel yakıt, plastik yapımında ve bunun gibi) ile de dikkat çekmektedir.

Dünya mısır ekim alanları, %11'den fazla artarak 177 milyon hektarı aşmıştır. Bu alan genişlemesinde ABD, Çin, Brezilya ve Ukrayna'nın payı önemlidir. Daha düşük miktarlı olmakla birlikte AB, Arjantin ve Meksika gibi diğer önemli üretici ülkelerdeki alan artışları da bu gelişimi desteklemiştir.

Türkiye'nin mısır üretimi 2000 yılında 2.3 milyon ton iken, 2011 yılına gelindiğinde 4.2 milyon tonluk bir üretim miktarına ulaşılmıştır. Bu artışın en önemli nedeni verimdeki artış olarak gösterilebilir. Ülkemizde 11,3 milyon ha'lık alanda tahıl üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu alanın % 6'sında mısır üretimi yapılmaktadır. Diyarbakır ili tahıl üretimi açısından önemli bir yere sahiptir. Diyarbakır ili mısır üretimi 192.000 da alanda yapılmaktadır. Mısırdaki verim kaybına neden olan önemli üç fitoplazma hastalığı bulunmaktadır. Bunlar mısır yaprak zararlısı *Dalbulus maidis* ile taşınan *Maize bushy stunt phytoplasma*, *Maize redness disease* (mısır kızarıklık hastalığı) ve *Maize Spiroplasma kunkelii*'dir.

Mısır yetiştirilen alanlarda önemli derecede ekonomik kayıplara yol açan bazı fitoplazma hastalıkları şunlardır:

- **Mısır çalimsı cücelik fitoplazması** (*Maize bushy stunt phytoplasma*) Bilimsel ismi: '*Candidatus Phytoplasma asteris*'
- **Mısır kızarıklık hastalığı** (*Maize redness disease*) Bilimsel ismi: '*Candidatus phytoplasma solani*'
- **Mısır cücelik spiroplazması** (*Maize stunt spiroplasma*) Bilimsel ismi: *Spiroplasma kunkelii*

Mısır çalimsı cücelik fitoplazması (*Maize bushy stunt phytoplasma*), Hastalığın ilk belirtileri yaprak kenarlarında kloroz oluşumu görülür. Aynı zamanda yaşlı yapraklar kırmızımsı bir renk alır. Bitki büyüdükçe hastalık ilerleyerek yeni çıkan yapraklar daha kloritik görünüme sahip olur ve kenarları yırtık görünüme sahip olur. Bitkinin nodları arasında kısılma ve sürgünlerde artış görülür. Püsküller kısır olarak oluşur. Sıcaklık hastalığın şiddetini arttırmaktadır.

Mısır kızarıklık hastalığı (*Maize redness disease*), Mısır kızarıklık hastalığı diagnostik belirtiler gösterir. Temmuz ayı ortalarında yapraklarda renk değişimi

gözlenir. Hastalık 1957 yılında Sırbistan'ın Banat bölgesinde rapor edilmiştir. Belirtiler genelde merkezindedir. Yaprak orta damarında kızarıklık oluşur. Koçanlarda deformasyonlar ve olgunlaşma bozuklukları gözlenir.

Mısır cücelik spiroplazması (Maize stunt spiroplasma), Enfekteli bitkilerde bodurluk ve kloritik çizgilenmeler görülür. Enfekteli bitkiler genellikle kırmızımsı mor yaprak rengi göstermektedir. Simptomlar iklim koşulları, mısır çeşidi ve diğer patojenlerin varlığına bağlı olarak değişebilir. *S. kunkelii* mısır üretimini sınırlayan ve Orta ve Güney Amerika'da ekonomik zarar olarak bildirilmiştir. *S. kunkelii* verimi% 50 ile (% 70 ortalama),% 90 arasında değişen azalma ve enfekteli bitkiler (ağırlık olarak) 3 kat daha az tahıl üretimi neden olduğu gösterilmiştir.

Yürütülen bu çalışmanın amacı Diyarbakır ili mısır üretim alanlarında hastalığa yol açan ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’, ‘*Candidatus* phytoplasma solani’ ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazma hastalıklarının varlığını araştırmaktır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Fitoplazmalar prokaryot canlıların *Mollicutes* sınıfında yer almakta olup, büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, tek hücreli, hücre duvarı olmayan, obligat parazitlerdir. Konukçu haricinde yaşamlarını sürdüremezler. Konukçu hücre sitoplazmasında büyür ve çoğalırlar ancak elektron mikroskobu ile izlenebilirler. Fitoplazmalar iki tip nükleik asit içermekte (DNA ve RNA) olup virüsler ile bakteriler arasında bir ara form oluşturmaktadır. Tomurcuklanma vasıtasıyla aseksüel olarak ürerler. Bitkilerin floem iletim demetinde bulunurlar ve kültüre alınamazlar (Seemüller ve ark., 2002).

Günümüzde fitoplazmalar 29 grup ve 89 alt gruptan oluşmaktadır. Hastalıklar daha önceden adlandırıldığından sonradan saptanan fitoplazma ajanlarının isimleri arasında halen bir düzenleme yoktur. Moleküler teşhis yöntemlerinin gelişmesi ile benzer hastalığa neden olan farklı fitoplazmalar saptanmıştır. Aynı zamanda farklı adlarla adlandırılan hastalıkların tek bir fitoplazma tarafından enfekte edildiği anlaşılmıştır. Fitoplazmalar her ne kadar ilk olarak elektron mikroskobu yöntemi ile teşhis edilmiş olsa bile boyama, serolojik ve DNA'ya dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Serolojik ve DNA teknikleri farklı fitoplazmaların ayırt edilmesini, spesifik olarak tespitini ve sınıflandırılmasını sağlamıştır (Welliver, 1999).

Fitoplazmalar vektör böceklerle taşınan, bitki floeminde sınırlı bakteriyel patojenlerdir ve dünya doğal ekosisteminde ve ürünlerde yıkıcı kayıplara neden olurlar (Lee ve ark., 2000; Bertaccini, 2007).

Önemli bitki patojenleri arasında yer alan fitoplazmalar önceleri virüs veya virüs benzeri hastalık etmeni olarak değerlendirilmiştir (Spaldon, 1958).

Daha sonra mikoplazmalara benzemesi nedeni ile mikoplazma benzeri organizma (MBO:MLO: Mycoplasma-like organism) olarak adlandırılmıştır (Doi ve ark., 1967).

Mollicute Taksonomisi Alt Komitesi (the Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes) tarafından 1992 yılında bitki patojeni mollicute'leri ifade etmek üzere bu patojenlerin "phytoplasma (fitoplazma)" olarak adlandırılması kabul edilmiştir (Anonymous, 1992).

Daha sonra güvenilir moleküler teknikler ile tanımlaması yapılan türlerin "*Candidatus* phytoplasma sp." olarak isimlendirilmesi uygun görülmüştür (Anonymous, 2004). Fitoplazmalar 500 nm çaplarında, tek bir hücre membranı ile

çevrili, belirgin bir şekli olmayan küçük bakterilerdir. Kültür ortamına alınamazlar, canlı dokuya muhtaçtır. Fitoplazmalar sürekli olarak bitki ve böcekler arasında geçişler sayesinde canlılığını ve yayılışını sürdürmektedir (Hogenhout ve ark., 2008).

Oldukça tipik belirtiler oluşturabilmesi nedeni ile patates stolbur hastalığının simptomlara dayalı olarak araştırılması ülkemizde fitoplazmalar ile ilgili yapılan ilk çalışmalar arasında yer almaktadır (Çıtır,1985).

Fitoplazmalar sert hücre duvarlarına sahip değildir, tek bir membranla çevrelenmiştir ve küresel veya pleimorfiktir ve mikoplazmalara benzer boyutlara sahiptir (80-800 nm); Bu nedenle fitoplazmalar 1967'de keşfedildikten sonra mikoplazma benzeri organizmalar olarak adlandırılmıştır (Doi ve ark., 1967).

Fitoplazmalar böcek vektörleri tarafından bulaştırılır ve meyve ağaçları ve süs bitkileri gibi ekonomik açıdan önemli bitkiler de dahil olmak üzere 700'den fazla bitki türü üzerinde enfekte olurlar (Bertaccini, 2007).

Enfekte olan bitkiler, bodurlaşma, sarılık, cadı süpürgesi (filizlerin çoğalması), phyllody (çiçek yerine yaprak benzeri dokuların oluşumu), virescence (çiçek organlarının yeşillendirilmesi), proliferasyon (Çiçek organlarından sürgünlerin büyümesi), mor üst (yaprakların ve damarların kızarıklığı) ve filomekroz (Hogenhout ve ark., 2008).

Fitoplazmalar, enfekte olmuş bitki konukçularının floem dokularına parazitleşir ve böcek vektörleri tarafından bulaşılır (Christensen ve ark., 2005; Hogenhout ve ark., 2008).

Fitoplazma genomik özelliklerini tanımlamak için 1990'lı yıllarda tüm dünyaya çeşitli genom projeleri başlatılmış ve bazı genomik fragmanlar klonlanmıştır (Miyata ve ark., 2002, 2003; Oshima ve ark., 2002).

Genel olarak, bir fitoplazma genomu, bir kromozom ve eşsiz bir replikasyon genine sahip çeşitli küçük plazmidlerden oluşur (Nishigawa ve ark., 2001; Oshima ve ark., 2001a; Firrao ve ark., 2007), Ca. P. mali 'nin hiçbir plazmiti yoktur (Kube ve ark., 2012).

Fitoplazma kromozomu büyüklüğü 600-880 kb'dir, diğer bitki patojenlerine kıyasla oldukça küçüktür, ancak mycoplasma'lara benzemektedir. Phytoplasma genomları, mycoplasmalara (Glass ve ark., 2000) ve endosimbiyotik bakterilere benzer düşük bir G + C içeriğine (% 21-28) sahiptir. (Tamas ve ark., 2002; Wernegreen, 2002)

Parazitik ve / veya simbiyotik bakterilerin küçük genomları çoğunlukla fonksiyonel genlerden oluştuğundan, bu organizmalardaki metabolik yolların karşılaştırmaları, çoğu zaman mikrobik yaşam biçiminde ve evrimsel köklerinde temel ayrımlar ortaya koymaktadır (Moran, 2002)

Fitoplazma genomu DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon ve protein translokasyonu gibi temel hücresel fonksiyonlar için genler içerse de birçok metabolik geni kaybetmiştir. (Kakizawa ve ark., 2001; Jung ve ark., 2003)

Genel olarak, mikoplazmalar, trikarboksilik asit döngüsü, sterol biyosentezi, yağlı asit biyosentezi, de novo nükleotid sentezi ve çoğu amino asidin biyosentezi için genlerden yoksundurlar; Dolayısıyla, bu yolların ürünlerini kendilerine tedarik etmek için konukçularına tamamen güvenmeleri gerekir (Razin ve ark., 1998).

1990'ların başında, MLO'ların 16S rRNA gen dizilimleri, *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri* ve birkaç mikoplazmasıyla olduğu gibi birbirleriyle karşılaştırıldı (Kuske ve Kirkpatrick 1992; Namba ve ark., 1993).

1990'lı yıllarda, moleküler biyolojideki ilerlemeler, DNA-DNA hibridizasyonu (Kirkpatrick ve ark., 1987) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) fitoplazmik DNA'nın doğrudan algılanmasını sağladı (Deng ve Hiruki 1991).

Fitoplazma kökenli hastalıkların araştırılması daha çok simptomatolojiye dayalı olarak başlamıştır. Fitoplazmaların birçoğu tipik belirtiler meydana getirmektedir. Bu nedenle simptomoloji fitoplazma hastalıklarının tanısında ilk teşhis adımı olarak önem taşımaktadır. Ancak fitoplazmaların tanılmasında yeterli ve güvenli bir yöntem değildir. Fitoplazma tanı çalışmalarında moleküler yöntemler en hızlı ve güvenilir tekniklerdir. Ülkemizde fitoplazmalar ile ilgili moleküler teknikler (PCR-RFLP), DAPI (4'-6 diamidino-2-phenylindole ile DNA boyama) ve elektron mikroskop (TEM) yöntemleri kullanılarak yapılan ilk tanı çalışmaları 2002 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde başlamıştır (Sertkaya ve ark., 2005). Daha sonra ülkemizin bir çok bölgesinde sert çekirdekli ve yumuşak çekirdekli meyvelerde olmak üzere birçok fitoplazma hastalıkları ve vektörlerine yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Sertkaya ve Çarpar 2015; Gazel ve ark., 2007; Canik ve Ertunç, 2007; Çağlayan ve ark., 1999, 2004; Sertkaya ve ark., 2005; Ulubaş Serçe ve ark., 2006).

Fitoplazma hastalıkları konusunda ülkemizde yürütülen çalışmaların çoğunluğu sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçları üzerinedir. Ülkemiz sert ve yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğini tehdit eden fitoplazma hastalıkları EPPO

(European Plant Protection Organisation)'nun karantinaya tabii organizmalar listesinde yer almaktadır (OEPP/EPPO, 1996). Bunlardan *Candidatus P. prunorum* hassas ve genç kayısı ve erik ağaçlarının 1-2 yıl içerisinde ölmesine (Nemeth, 1986), diğerlerinde ise verim kaybı ve meyve kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Armutta görülen *Ca. P. pyri* hassas anaçlar üzerine aşılı ağaçların hızla ölümüne neden olmaktadır. Bursa ilinde yürütülen bir çalışmada armutlarda %52 oranında Armut yıkım fitoplazması (Pear decline phytoplasma) tespit edilmiştir. Hastalığın Deveci çeşidinde önemli verim kayıplarına neden olduğu ve genç yaştaki armut ağaçlarının birkaç yıl içerisinde ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Gazel ve ark., 2007). Etmenin hem armut ağaçlarında hem de vektör böcekte saptanmış olması etmenin yayılımında vektörlerin önemini bir kez daha kanıtlamıştır. Bu hastalık aynı zamanda Ankara ve Yalova'da saptanmıştır (Canik ve Ertunç, 2007). Avrupa sarılık fitoplazma hastalığı (ESFY) hastalığı ise Avrupa da olduğu gibi ülkemizin de birçok bölgesinde yer alan gen kaynaklarında % 54, ticari bahçelerde ise %3 oranında saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 1999, 2004; Sertkaya ve ark., 2005; Ulubaş Serçe ve ark., 2006). AP ülkemizde bulunmasına rağmen elma yetiştirilen alanlarda yaygın değildir. Etmen Ankara ve Isparta illerinden toplanan 201 örneğin yaklaşık %4'ünde tespit edilmiştir (Canik ve Ertunç, 2007). Aynı etmen Adana ve Niğde illerinde de belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2008). Vektörleri konusunda bir kayıt bulunmamaktadır (Ulubaş Serçe ve ark., 2012).

Bugün itibarı ile 29 grup ve 89 alt gruptan oluşan fitoplazmaların ayırımında ve sınıflandırmasında bazı moleküler markörler kullanılmaktadır. 16S rRNA geni fitoplazma araştırmacıları arasında en çok kullanılanıdır. Bu markör fitoplazmaların teşhisinde iyi sonuçlar vermektedir. 16S rRNA geni üzerindeki bazı universal oligonükleotid primer çiftleri, 16S-23S içsel aralayıcı bölge (Intergenic spacer region) ve kısmi 23S rRNA geni dizisini kapsayan primerler düzenlenmiştir. Bunlar çeşitli türde birçok fitoplazmanın DNA çoğalmasını sağlamaktadır. 16S rRNA gen dizilişinin, seçilen enzimlerle RFLP analizi fitoplazmaların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Lee ve ark., 1993; Schneider ve ark., 2005). On yedi restriksiyon enzimi ile RFLP analizini esas alan sınıflandırma şeması oluşturulmuştur. Büyük grupların ayırımı, 1-2 kb PCR ampikonunun RFLP görüntülerinin benzerlik (similarity 10 coefficients) oranına göre hazırlanmıştır (Lee ve ark., 1998). İki farklı grup arasındaki RFLP görüntülerinin benzerlik oranı %90 veya daha azdır. Bir grup içerisinde alt grup oluşumları bu ampikon içerisindeki yan restriksiyon analizi ile

belirlenmiştir. Bir bilinmeyen fitoplazma ırkı o grubun mevcut üyelerininkinden bir veya daha fazla kesim bölgesine sahipse yeni bir alt grup olarak atanmıştır. Bu tablo periyodik olarak güncellenmektedir (Lee ve ark., 1998; Ulubaş Serçe ve ark., 2012). Fitoplazmaların ayırımı ve sınıflandırılmasında gen temelli başka sistemler de kullanılmaktadır. Örneğin *Tuf* geni, ribozomal protein geni, *SecY* geni, *SecA* geni ve diğer genler fitoplazma etmenlerinin ayırımında ve sınıflandırmasında kullanılabilirler (Martini ve ark., 2002; Martini ve ark., 2007; Lee ve ark., 2004a ve b; Ulubaş Serçe ve ark., 2012).

2.1. Mısır çalimsı cücelik fitoplazması (Maize bushy stunt phytoplasma)

Yaprak piresi *Dalbulus maidis* tarafından taşınmaktadır. (Nault, 1980).

Duyarlı mısır fidelerinin bu mollicutler tarafından enfekte edildiği zaman bitki gelişiminde, beslenmede ve çekidek üretiminde ciddi hasarlar oluşur. (Oliveira ve ark., 2002b; Oliveira ve ark., 2005).

Beslenme ile ortaya çıkan yaralanmalar nadiren de olsa önemlidir; yaprak piresi tarafından taşınmasıyla mısır cücelik spiroplazması, Mısır çalimsı cücelik fitoplazması ve mısır rayado fino marafivirüs ciddi ekonomik kayıplara neden olur. (Nault 1980, Nault ve ark. 1981).

Mısır yaprak piresi Amerika'nın güneyinden Arjantin'e ve Karayip adalarına kadar olan neotropikler boyunca yayılır. (Nault 1983)

Yaprak piresinin dağılımı ile patojenlerin nakletiği dağılım çakışmaktadır. Özellikle başlangıçta uçuşan gür mısır fitoplazmalar bu çalışmamın odak noktası olarak düşünülmüş ve ilk olarak Meksika'nın yüksek rakımlarında bulunmuştur(Davis 1973, 1977) ama başka yerlerde de bu the Neotropics yükselmeler olduğu görülmüştür. (Nault ve ark. 1979,1981).

Bu Mollicutes birinde duyarlı mısır fidesi enfeksiyonunun görülmesi bitkilerin gelişimi, beslemesi ve çekirdek üretimi üzerinde ciddi hasarlara neden olur. (Oliveira ve ark., 2002b; Oliveira ve ark., 2005).

D. Maydis tarafından uçuşan gür mısır fitoplazmalarının iletimi çalışılmıştır (Nault, 1980; Legrand and Power, 1994), Ancak, fitoplazma ve Spiroplasma iletimi arasındaki etkileşimler tam olarak anlaşılamamıştır Bu çalışmada, D. Madison tarafından farklı çevresel koşullar altında fitoplazma iletimi üzerine Spiroplasma ve fitoplazma ediniminin etkileri değerlendirilmiştir.

2.2 Mısır kızarıklık hastalığı (Maize redness disease)

Mısır kızarıklık (MR) hastalığı fitoplazma ile ilişkili mısır ciddi bir hastalıktır (16SrXII-A) , bu hastalık cixiidae bitki pireleri *Reptalus panzeri*(düşük)tarafından mısıra iletilir(Jovie ve ark., 2007).

Hastalık, bitkinin kızarması, tamamen kuruması ve anormal bir şekilde kulak gelişiminin sonrasında yaprağın orta damarı, yaprak ve sap kızarması ile karakterize edilir. Mısır kızarıklığı Sırbistan, Romanya ve Bulgaristan'dan 50 yıldan fazla zamandan beri rapor edilmesine rağmen bir vektör ve hastalığın epidemiyolojik döngüsü yakın zamanda belirlenmiştir. (Jovie ve ark., 2009).

İtalya'da mısır kızarıklığının belirtileri ile ilgili yapılan son çalışmalarda (Calari ve ark., 2010), aynı zamanda tercih edilebilen ana bitki olarak mısır için olası *R. panzeri* .(Jovie ve ark., 2010) devam eden ve gelecekte de devam etmesi beklenen yayılan hastalığın vce bu hastalığın vectör böceklerin olacağını işaret etmiştir .

Önceki raporlarda macar üzüm-şarap bağlarında ve onların doğal enfeksiyonlarında stolbur phytoplasma ile *R. panzeri* varlığı görülmüştür (Palermo ve ark., 2004), mısır üretiminin ekonomik önemi yanında, Macaristan topraklarında MR varlığının incelenmesi ihtiyacını arttırmıştır. biz bu araştırmanın ilk sonuçlarını sunuyoruz.

Tüm fitoplazmalar hem kendi yerel bitkisi içerisinde hem de böcek vektörüne çarparak kendi içinde bir çift enfeksiyon döngüsü vardır. (Gasparich, 2010).

Fitoplazmalar yerel bitki aralıkları genellikle spesifik böcek vektörünün konukçu aralığı tarafından kontrol edildiği kabul edilmektedir. Stolbur phytoplasma (alt grup 16SrXII-A) önemli Solanaceae bitkileri, asma, kereviz, şeker pancarı, çilek, lavanta ve mısır içeren geniş bir bitki konukçu aralığına sahiptir. (Gamier ve ark., 2000; Jovie ve ark., 2007).

Mısır kızarıklığı(MR) Sırbistan'nın Banat bölgesinde *R. panzeri* tarafından iletilen stolbur phytoplasma ile ilişkilidir. (Duduk ve Bertaccini, 2006; Jovie ve arkadaşları, 2007;. 2009).

Hastalık mısırdaki yıkıcı kayıplara neden olabilir (Bekavac ve ark., 2008). İlk hastalık belirtisi, Temmuz sonlarında yaprak ve yaprağın orta damarında kızarma sonucu görülür. Yaprak ve sapların kızarması zamanla yoğunlaşır ve bitkiler eylül ayı başında kurumaya başlar. Burada kritik olana şey, kulak geliştirme ve tohum seti bu hastalıktan olumsuz olarak etkilenir.

Mısır kızarıklığı 1960 yılından beri aralıklı olarak Sırbistan, Romanya ve Bulgaristan'da ortaya çıkmıştır (Šutić ve ark., 2002).

2.3 Mısır cücelik spiroplazması (Maize stunt spiroplasma)

Mısır cücelik spiroplazma hastalığı doğrudan yaprak piresi beslenmesinden dolayı daha önemli verim kayıplarına neden olabilir (Nault 1985, Moya-Raygoza ve Nault 1998).

Spiroplasma kunkelii (Whitcomb) (Whitcomb ve arkadaşları 1986), Amerika'nın tropik ve subtropikal bölgelerinde mısır (*Zea mays* L.) bitkilerini etkileyen en ciddi hastalıklardan biri olan "maize stunt spiroplasma" üç patojenden biridir (Bradfute ve arkadaşları 1981, Hruska ve arkadaşları 1996, Oliveira ve ark., 1998).

Arjantin'de baskın "mısır cücelik spiroplazma" patolojisi, daha önce tarif edilenlerden daha az karmaşıktır. *Exitianus obscurinervis*'in (Hemiptera: Cicadellidae) son zamanlarda deneysel koşullarda bir vektör olduğu bulunmasına rağmen, *Dalbulus maidisi* (DeLong ve Wolcott) ülkede mevcut olan bilinen tek vektör türüdür (Paradell 1995, Paradell ve ark., 2001) (Carlioni ve ark. 2011).

Bazı bitkilerdeki tarla kenarları önemlidir, çünkü bu kenarlar, otçul böcekleri, parazitoidlerini ve predatörlerini koruyan habitatlar oluştururlar (Ramsden ve ark., 2015).

Mısır kurduktan sonra, mısır tarlalarının kenarlarında yetişen yeşil otlar, böcekler için gıda kaynakları olarak kullanılırlar. Bu tek çenekliler, mısır bitkilerinin viral ve bakteriyel patojenlerini barındırma yeteneğine sahip otçul yaprak tomurcukları (Hemiptera: Cicadellidae) tarafından kolonize edilir ve bu patojenler bir sonraki mısır yetiştirme mevsiminde ekinlere gönderilebileceği endişelerine neden olur (Moya-Raygoza ve ark., 2007).

Corn Stunt Spiroplasma, üç patojenin en önemlisi olduğundan, Latin Amerika boyunca mısırdaki yüksek hasar düzeylerine neden olmaktadır. En yüksek enfeksiyonlar Orta Amerika, Arjantin ve Peru'da bulunur; İncelenen mısırın% 100'ü CSS ile semptomlara sahiptir (Nault ve ark., 1981; Hruska ve Gomez, 1997; Gimenez Pecci ve ark., 2002). Ayrıca, Corn Stunt Spiroplasma ve onun ana vektörü *D. maidis*, Amerika kıtasında geniş dağılım göstermektedir. Her ikisi de güneydoğu ve güneybatı ABD'den Arjantin'e kadar bulunmuştur (Nault, 1990).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Diyarbakır ili Bismil, Çınar, Silvan ve Yenişehir ilçelerinde Mısır üretimi yapılan alanlardan Ağustos döneminde 225 Mısır bitkisinin yaprağı toplanarak *Candidatus Phytoplasma asteris*’, *Candidatus phytoplasma solani*’ ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmalarının teşhislerinde kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Diyarbakır ilinde survey gerçekleştirilen alanlar.

3.2 Yöntem

3.2.1 Survey çalışmaları

Diyarbakır ili mısır üretimi yapılan tarlalardan taze mısır yaprak örnekleri toplanmıştır. Örnekleme olabildiğince tarlayı temsil edecek şekilde tarlanın farklı yerlerinden yapılmıştır. Örneklemede simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden rastgele yaprak numuneleri alınmıştır. Toplanan mısır yaprak örnekleri polietilen poşetlerde soğuk bir şekilde muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler PCR testlerinde kullanılmak üzere +4 derecede muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Moleküler test çalışmaları

Toplanan örneklerde *Candidatus Phytoplasma asteris*’, *Candidatus phytoplasma solani*’ ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmaları için DNA ekstraksiyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) adımlarından oluşacak şekilde testler uygulanmıştır.

3.2.2.1 DNA ekstraksiyonu



Diyarbakır ili mısır tarlalarından toplanan yaprak örnekleri *Candidatus Phytoplasma asteris*’, *Candidatus phytoplasma solani*’ ve *Spiroplasma kunkelii* infeksiyonlarını belirlemek için, DNA yapılı olduklarından, DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu Diyarbakır ili mısır yetistircilik alanlarındaki fitoplazma hastalıklarına ait DNA ticari kit yardımı ile izole edilmiştir. DNA ticari kite göre; Polietilen poşet içerisine 100 mg bitki dokusu ve üzerine 350µl Lysis Buffer A eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen sıvı alınıp 1.5 mL’lik ependorf tüplerine bırakılmıştır. 50 µl Lysis B ve 20 µl RNase A eklenmiştir. 1 Dk vortex edilmiştir. Tüpler ara sıra sallamak kaydıyla 65 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra tüplerin üzerine 130 µl Precipitation Solution ekledikten sonra 2-3 kez salladıktan sonra 5 Dakika soğukta inkübe edilmiştir. Buzda inkübe edilen tüpler alınarak 14.000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

Santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvıdan 450-500 µl alınıp yeni ependorf tüplerine eklendikten sonra 400 bitki gDNA binding solüsyonu ve 400 µl 96% ethanol eklenip homojen karışması için sallanmıştır. Karışım önce yarısı hazırlanan kolon tüplere aktarılıp 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıp altta kalan sıvı atıldıktan sonra sıvının geri kalan kısmı kolon tüplere eklenip tekrar 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon tüplere 500 µl Wash buffer1 eklenerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek altta kalan sıvı atılarak ilk yıkama işlemi tamamlanmıştır. 2.Yıkama işlemi 500 µl Wash Buffer2 eklenerek 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip altta kalan sıvılar atıldıktan sonra tüplere herhangi bir çözelti eklenmeden 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Son aşamada ise kolon tüpler alınıp filtreli kısımları ependorf tüplere yerleştirilerek üzerlerine 100 µl Elution Buffer eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'ların filtrelerden geçerek ependorf tüplerine akması sağlanmıştır. Elde edilen DNA'lar PCR'da kullanılmak üzere -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Universal primerler

Mısır çalimsı cücelik fitoplazması, Mısır kızarıklık hastalığı ve Mısır cücelik spiroplazması fitoplazmalarının Nested-PCR ile tespit edilmeleri için 1. adımda R16mF2/R16mR1 primerleri, 2. adımda ise R16F2n/R16R2 primerleri kullanılmıştır (Lee ve ark. 1993; Gundersen and Lee, 1996).

Çizelge3.1 Nested-PCR 1.adım ve 2.adım testi ile kullanılacak primer dizilerine ait bilgiler

Primer	Çoğaltılan DNA Uzunluğu
R16mF2	5'-CAT GCA AGT CGA ACG GA -3'
R16mR1	5'-CTT AAC CCC AAT CAT CGA C -3'  1800 bp
R16F2n	5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'
R16R2	5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'  1250 bp

3.2.2.3. PCR reaksiyonu

Candidatus Phytoplasma asteris, '*Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmaları için DNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen hedef genlerin çoğaltılması için gerekli PCR malzemeleri ticari firmadan temin edilmiştir. Fitoplazma hastalıklarının tespitinde Nested-PCR yöntemi kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemi iki aşamada yapılmıştır. Bunlar direkt-PCR ve Nested-PCR'dir (Lee ve ark., 1992). İki aşamalı olarak yürütülen PCR işleminin birinci aşamasında elde edilen PCR ürünlerin 1/50 oranda sulandırılarak Nested-PCR protokolüne uyularak yapılmıştır. *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazma hastalıklarının tespiti için PCR işleminde steril tüpü içerisine;

Çizelge 3.2 PCR'da kullanılan malzemeler. 1.Adım: Direkt-PCR 2.Adım: Nested-PCR

	1.ADİM (25µl)	2.ADİM (50µl)
Steril saf su	11.875 µl	28.75 µl
MgCl ₂	1.5 µl	3µl
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1.5 µl	1 µl
5X buffer	5 µl	10 µl
Primer1 (20mM)	0.5 µl	1 µl
Primer2 (20mM)	0.5 µl	1 µl
Kalıp DNA	5 µl	5 µl
Tag Polimeraz enzimi	0.125	0.25 µl

Çizelge 3.3. *Candidatus Phytoplasma asteris*, '*Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmalarının PCR ile araştırılması için çoğaltılan bölgenin baz uzunluğu ve PCR sıcaklık döngüleri:

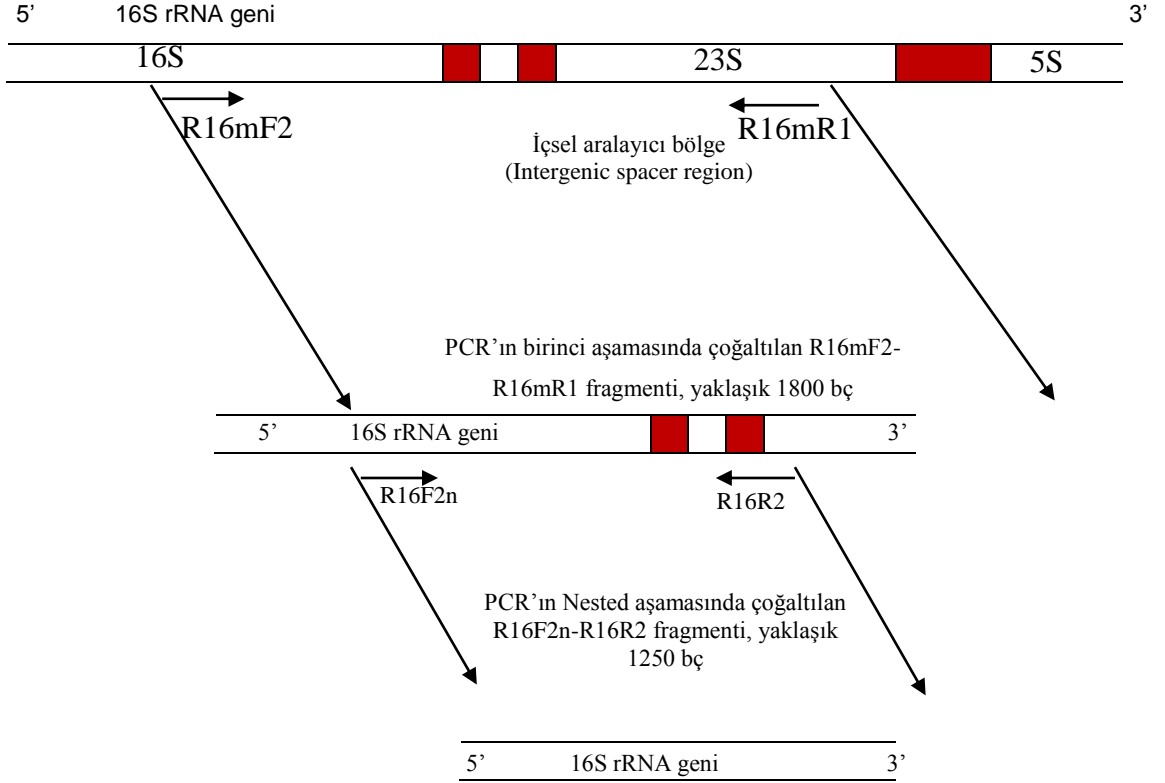
Fitoplazmalar	Sıcaklık Döngüleri	Çoğaltılan Uzunluk
<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> '	94°C.....2 dk	} 35 döngü
<i>Candidatus phytoplasma solani</i> '	94°C.....1 dk	
<i>Spiroplasma kunkelii</i>	55°C.....2 dk	
	72°C.....3 dk	
	72°C.....10 Dk	

3.2.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde koşulması

Nested-PCR sonucu elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez yapılmıştır. 1 gr agaroz (Pronasafe), 100 ml 1XTAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde mirodalga fırında homojen olarak çözüldükten sonra jel tepsinine tarak takılarak tepsiye dökülmüştür. Jelin katılaşması için ortalama 20-25 dakika beklenmiştir. Jel katılaşmasından sonra tarak jele zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzerini kapatacak şekilde 1XTAE tamponu dökülmüştür. Jel çukurlarına DNA marker ve PCR ürünleri Floresan boya ile jele yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez aparatına 100 V'luk elektrik akımı 30 dakika süreyle uygulanmıştır.



Şekil 3.2 PCR ürünlerinin floresan boya ile hazırlanan %1'lik jele yüklenmesi



Şekil 3.3 Fitoplazmaların rRNA geni üzerinde Nested-PCR ile çoğaltılan R16mF2-R16mR1 fragmenti ile etmenin grup ve alt gruplarının tespit edilmesinde yararlanılan 16S rRNA genini içeren R16F2n-R16R2 fragmentinin şematik gösterimi.

3.2.2.5. DNA'yı görüntüleme ve analizi

PCR ile çoğaltılan DNA ürünleri elektroforez edildikten sonra jel görüntüleme analiz sistemi ile görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus phytoplasma solani* ve *Spiroplasma kunkelii* 1250 bp uzunluğunda fragmentler pozitif olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Survey Çalışması

Diyarbakır ili; Bismil, Çınar, Silvan ve Yenişehir ilçelerinden mısır üretimi yapılan bölgelerden *Candidatus Phytoplasma asteris*’, *Candidatus phytoplasma solani*’ ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmalarının varlığını tespit etmek için tarlayı mümkün olduğunca temsil edecek şekilde rastgele 225 yaprak örneği toplanmıştır (Çizelge 4.1).

Toplanan örneklerde kızarıklık ve koçanlarda deformasyonlar göze çarpmıştır (Şekil4.1).



Şekil 4.1. Mısırdaki kızarıklık ve koçanda deformasyonlar.

Çizelge 4.1 2016 yılı Diyarbakır ilçelerinde alınan örnekler ve sayıları

Örnek Alınan İl	Örnek Alınan İlçeler	Örnek Sayısı
DİYARBAKIR	Bismil	120
	Çınar	20
	Silvan	65
	Yenişehir	20
	Toplam	225

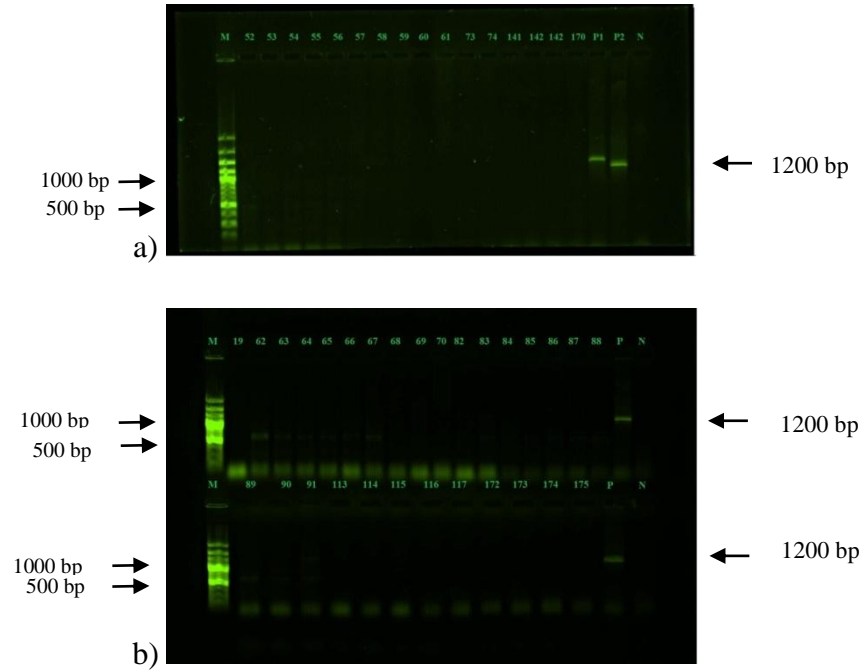
4.1.2 Moleküler çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılacak izolat temini

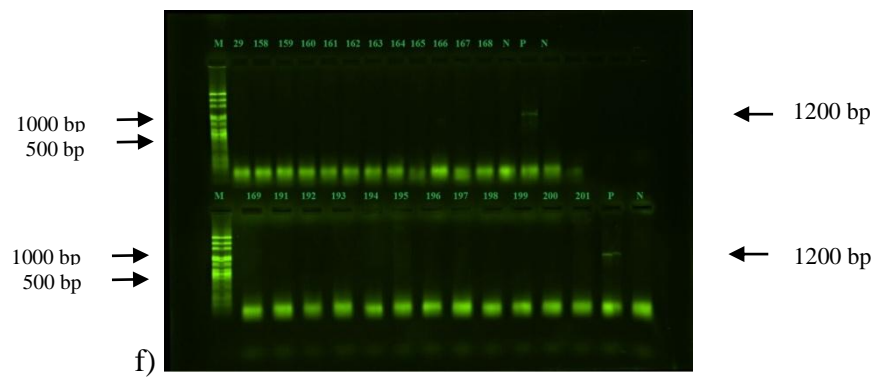
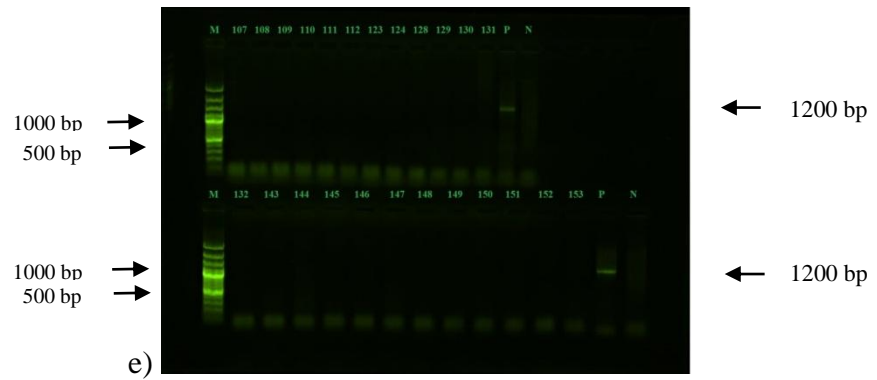
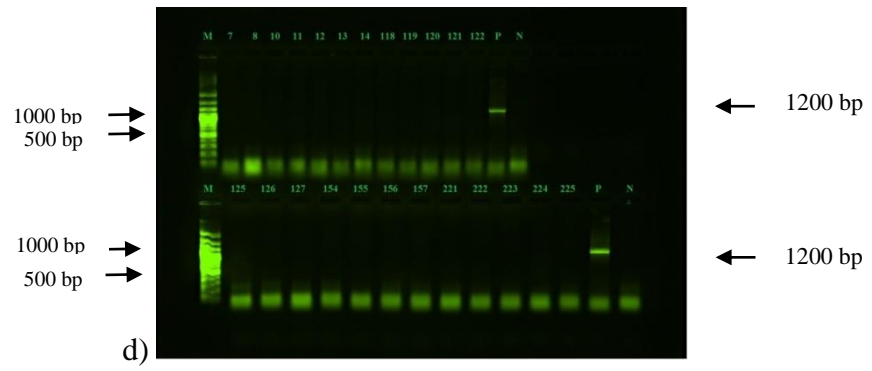
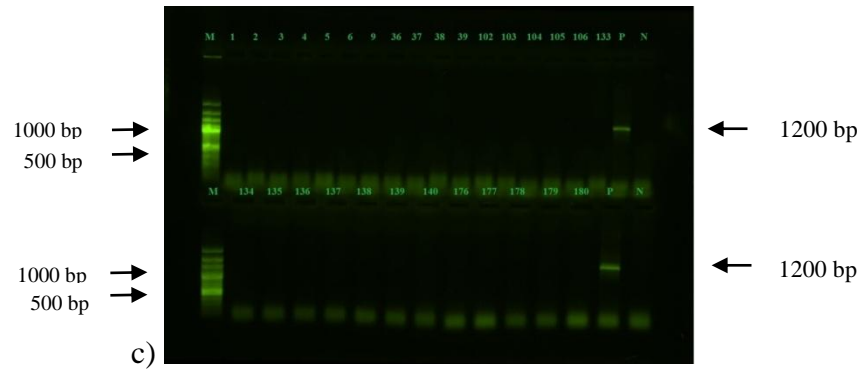
Çalışmada kullanılacak pozitif kontrol;

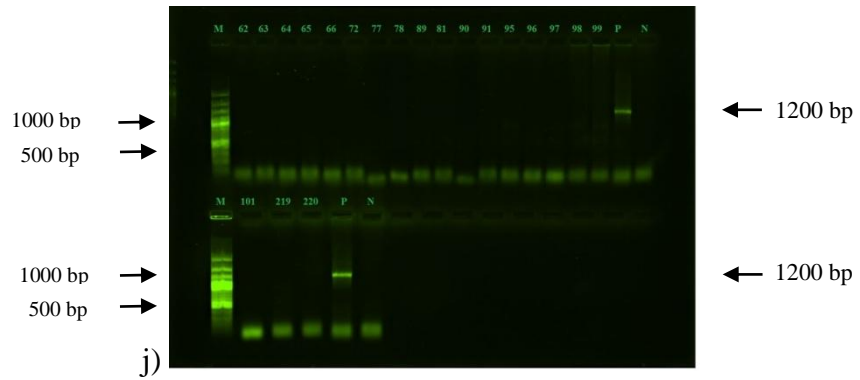
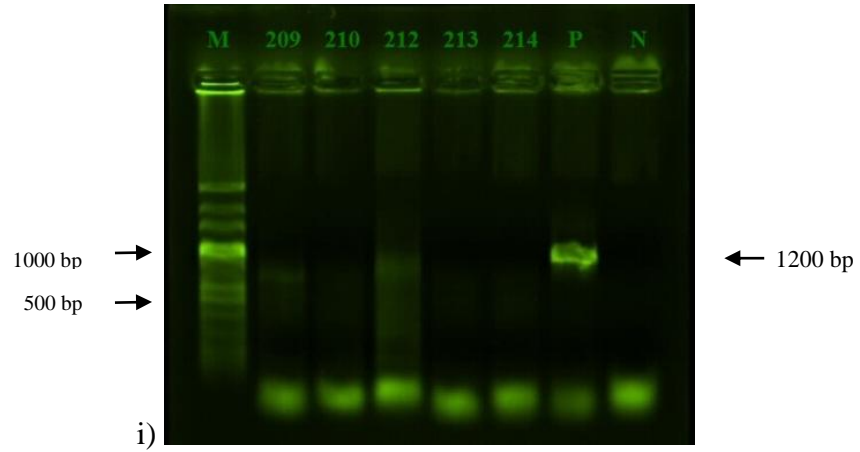
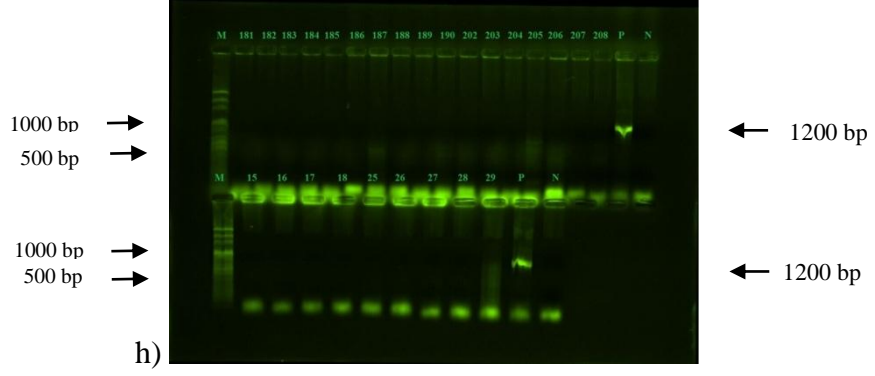
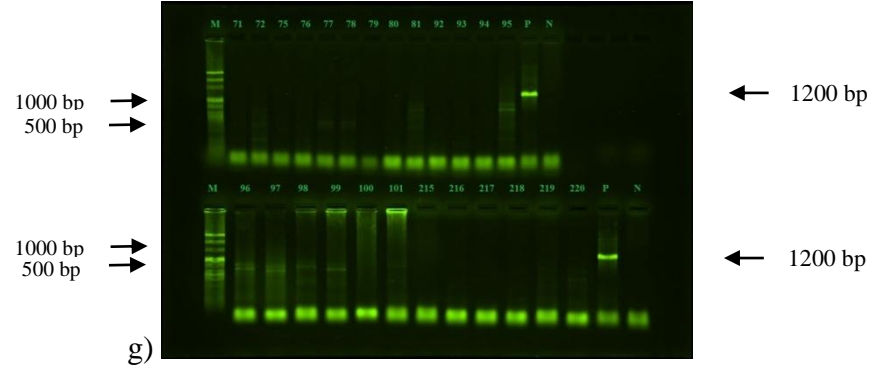
Candidatus Phytoplasma trifolii' İnönü Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Ana Bilim Dalı Viroloji laboratuvarından temin edilmiştir.

4.1.3. Moleküler çalışmalar

Diyarbakır ili ilçelerinde Çizelge 4.1. de belirtilen bölgelerden toplanan örneklerin tamamı pozitif örneklerle *Candidatus Phytoplasma asteris*' , *Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmaları için DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Fitoplazmaların teşhisi için de Nested-PCR yöntemiyle universal primerlar kullanılarak *Candidatus Phytoplasma asteris*' , *Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* fitoplazmaları için analizler yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda herhangi bir fitoplazma varlığına rastlanılmamıştır.







Şekil 4.2. Bismil, Çınar, Silvan ve Yenişehir ilçerinden alınan örneklere *Candidatus phytoplasma asteris*, '*Candidatus phytoplasma solani*' ve *Spiroplasma kunkelii* için

uygulanan Nested-PCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker P1, P2: Pozitif kontroller, N: Negatif kontrol

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diyarbakır ili mısır ekimi yapılan ilçelerde yürütülen survey çalışmalarında mısır bitkilerinde gözlemlenen fitoplazma benzeri belirtilerin genel olarak çok nadir olduğu gözlemlenmiştir. Survey alanlarında fitoplazma benzeri belirti gösteren bitkilerin oranının %1'den çok daha az olduğu söylenebilir. Elde edilen gözlem sonuçlarını laboratuvar testleri destekler niteliktedir.

Nitekim, survey alanlarından toplanan 225 mısır yaprak örneğinin tamamı universal primerlerin kullanıldığı Nested-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Testlenen örneklerin hiç birinde *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus phytoplasma solani* ve *Spiroplasma kunkelii*'ye rastlanmamıştır. PCR testlerinin tamamında testin güvenilirliğini sağlamak amacı ile kullanılan pozitif ve negatif kontroller çalışmıştır. Survey çalışmalarında mısırlarda tespit edilen kimi fitoplazma benzeri simptomların fitoplazma infeksiyonuna ait olmadığı anlaşılmıştır. Mısır bitkilerinde görülen bu belirtilerin viral infeksiyonlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığının anlaşılması ek testlemeler gerekmektedir. Yörede yetiştiriciliği yapılan mısırlarda fitoplazma ve spiroplazma hastalıklarının tespit edilmemiş olması Diyarbakır ili mısır yetiştiriciliği açısından önemli bir şans olarak değerlendirilmektedir. Adı geçen hastalıkların mısırdaki bulunmamasının en nemli nedenlerinden biri olarak yörede yaygın biçimde sertifikalı mısır tohumluğunun kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yöredeki mısır yetiştiriciliğininde fitoplazma hastalıkları yönünden bitkilerin sağlıklı durumlarının devam ettirilmesi, büyük ölçüde sertifikalı tohumluk kullanımının devam etmesine bağlıdır.

Ember ve ark., (2011) 2008 yılında Kuzey Romanya'dan topladıkları 32 patates, 151 yabancı ot ve 4 mısırdan oluşan toplam 187 numunenin hiç birinde fitoplazma infeksiyonu tespit etmemişlerdir. Benzer biçimde Borth ve ark., (2006) tere bitkisinde yoğunlukla görülen watercress yellows phytoplasma hastalığının Havai'deki bir çok adada bulunmadığını bildirmiştir. Sertifikalı tohumluk kullanımı sadece fitoplazma hastalıkları değil aynı zamanda diğer hastalık etmenleri bakımından da önem arz etmektedir. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerinde 1990-2000 yılları arasında ülke çapında patatesteki Patates iğ yumru viroidi (Potato spindle tuber viroid, PSTV ve ark)'e karşı yürütülen survey çalışmalarında hiçbir patates bitkisinde bu patojene rastlanmamıştır. Yürütülen survey çalışmaları patatesteki ülke

apında yürütülen sertifikasyon çalışmalarının sonuç verdiğini göstermektedir. K. R. Blanche ve ark., (2003) Kuzey Avusturalya'dan topladıkları 20 şeker kamışı bitkisinde şeker kamışı beyaz yaprak fitoplazma (SCWL) hastalığının olup olmadığını araştırmışlardır. Yapılan araştırma sonucunda 4 şeker kamışı bitkisinde şeker kamışı beyaz yaprak fitoplazma (SCWL) tespit edilmiştir.

Diyarbakır ili mısır ekimi yapılan ilçelerde mısırdaki sorun olan önemli fitoplazma ve spiroplazma hastalıklarının olmaması mısır üretimi ve verimi açısından oldukça önemlidir. Hastalıkların bölgeye ulaşmasını engellemenin en önemli yolu sertifikalı temiz tohum kullanmaya devam etmenin yanı sıra fitoplazma hastalıklarının ara konukçuları arasında yer alan ve tarla içinde ve kenarında yetişen yabancı otların mücadelesi ile devam ettirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Anonymous, <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=390>
(on-line access on 12.02.2016)
- [2] Anonymous, <http://www.eppo.int/Quarantine/AlertList/bacteria/Maizeredness.htm>
(on-line access on 12.02.2016)
- [3] Anonymous, <http://www.cabi.org/isc/datasheet/50978> (Online Erişim 12.02.2016)
- [4] Anonymous, <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11427> (on-line access on 12.02.2016)
- [5] Anonymous, <http://www.cabi.org/isc/datasheet/50978> (on-line Access on 12.012016)
- [6] Anonymous, <http://www.uniprot.org/taxonomy/69896> (on-line access on 12.012016)
- [7] Anonymous, <http://www.uniprot.org/taxonomy/202462> (on-line access on 12.012016)
- [8] Anonymous, 1992. Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. *Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa Int. J. of Syst. Bact.* April 1993, p. 394- 397; Vol. 43, No. 2. (on-line access on: 02.12.2015)
- [9] Anonymous, 2004. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group: *Candidatus Phytoplasma*, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, 54, 1243-1255. (Erişim tarihi: 02.12.2015)
- [10] Alp ř, Usta M, Sipahioğlu HM, Güller A (2016). First report of “*Candidatus Phytoplasma solani*” on a new host marigold (*Tagetes erecta* L.). *Turk. J. Agric. For.* **40**: 311-318.

- [11] Başpınar H, Korkmaz S, Önelge N, Çınar A, Uygun N, Kersting U (1993). Studies on Citrus Stubborn Disease pathogen and Sesame Phyllody MLO and their associated leafhopper vectors in sesame. *J. Turk. Phytopathol.* **1**: 1-8.
- [12] Bertaccini A, 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci.* **12**: 673-689.
- [13] Canik, D., Ertunç, F. 2007. "Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey", *Bulletin of Insectology* **60** (2), 335-336.
- [14] Çitir, A. 1985. "Preliminary investigation of potato diseases caused by MLOs in Erzurum region", *Journal of Turkish Phytopathology*, **14**, 53-63.
- [15] Christensen ve ark., 2005 Phytoplasmas and their interactions with hosts.
- [16] Çağlar BK, Elbeaino T (2013). A novel phytoplasma associated with witches' broom disease of *Ligustrum ovalifolium* in Turkey. *J. Plant Pathol.* **137**: 113-117.
- [17] Çağlar BK, Elbeaino T, Küsek M, Pehlivan D, Fidan H, Portakaldalı M (2010). Stolbur Phytoplasma Infections in Potato and Tomato Plants from Different Locations in Turkey. *J. Turk. Phytopath.* **39**: 1-3.
- [18] Çitir, A., 1985 Preliminary investigation of potato diseases caused by mycoplasma like organisms (MLO) in Erzurum region. *J. Turk. Phytopath.*, **14**(2): 53-63.
- [19] Doi Y, Teranaka M, Yora K and Asuyama H, 1967. "Mycoplasma or PLT-group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom". *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33** (4): 259-266. doi:10.3186/jjphytopath.33.259.
- [20] Elizabeth De Oliveira, Jaciara Cristina Santos, Paulo César Magalhães, Ivan Cruz Embrapa Milho E Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brazil Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by Spiroplasma acquisition and environmental conditions

- [21] Gazel M, Çağlayan K, Başpınar H, Mejia JF, Paltrinieri S., Bertaccini A, Contaldo N (2016). Detection and Identification of Phytoplasmas in Pomegranate Trees with Yellow Symptoms. *J. Phytopathol.* **164**: 136-140.
- [22] Gazel, M., Ulubaş Serçe, Ç., Çağlayan, K., Öztürk, H., 2007. “Detection of ‘*Candidatus* Phytoplasma pyri’ in Turkey”, *Bulletin of Insectology* **60** (2), 125-126.
- [23] Güldür ME, Şimşek E, Gümüş H, Ayvacı H, ve BK Çağlar, 2016. Şanlıurfa İli Antepfıstığı Ağaçlarında 16SrXII-A Grubu Fitoplazmaların Yaygınlığının Belirlenmesi, *Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı*, s.544, 5-8 Eylül 2016 Konya, Türkiye.
- [24] *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gap Uluslararası Tarımsal Araştırma Ve Eğitim Merkezi Tahıl Raporu / Nüsha 1 Aralık 2013 - Yıl:1 Sayı:1 / Issn :2148-1962.*
- [25] Glass J. I., Lefkowitz E. J., Glass J. S., Heiner C. R., Chen E. Y., Cassell G. H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407 757–762.10.1038/35037619
- [26] Gundersen DE, Lee IM 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assay using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* **35**: 144-151.
- [27] Hogenhout ve ark., 2008 Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects.
- [28] Kakizawa S., Oshima K., Kuboyama T., Nishigawa H., Jung H. Y., Sawayanagi T., et al. (2001). Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 1043–1050.10.1094/MPMI.2001.14.9.1043
- [29] Lee IM, Davis R E and Gundersen-Rindal DE, 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 221–255.
- [30] Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology* **83**: 834-842.

- [31] Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1153-1169.
- [32] Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology* **83**: 834-842.
- [33] Miyata S., Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H. Y., Kuboyama T., et al. (2003). Two different thymidylate kinase gene homologues, including one that has catalytic activity, are encoded in the onion yellows phytoplasma genome. *Microbiology* **149** 2243–2250.10.1099/mic.0.25834-0
- [34] Moran N. A. (2002). Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* **108** 583–586.10.1016/S0092-8674(02)00665-7
- [35] Nemeth, M., 1986. “Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. *Martinus Nijhoff Publishers*”, Dordrecht, The Netherlands, 47 p.
- [36] Özdemir N, Saygılı H (2012). Batı Anadolu Bölgesi Domates Üretim Alanlarında Görülen Stolbur Hastalığının Tohumla Taşınım Taşınmadığı İle İlgili Bir Araştırma. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi.* **26** (1): 63-72.
- [37] Özdemir N, Saygılı H, Sahin F, Karsavuran Y, Bayrak OF, Oral B (2009). Host range and genetic characterization of a phytoplasma causing tomato stolbur disease in Turkey. *Proc. IInd Intl. Symposium on tomato diseases. Acta Hort.* **808**: 255-261.
- [38] Paradell, S. 1995a. Especies argentinas de Homópteros Cicadélidos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Rev. Fac. Agronomía (La Plata)* **71**: 213-234.
- [39] Razin S., Yogev D., Naot Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** 1094–1156
- [40] Robert F. Whitcomb, T. A. Chen, D. L. Williamson, C. Lia0, J. G. Tul Spiroplasma kunkelii sp. nov. : *Characterization of the Etiological Agent of Corn Stunt Disease*
- [41] Seemuller, E., Garnier, M. & Schneider, B. (2002). Mycoplasmas of plants and insects. *In Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*, pp. **91**–116. Edited by S. Razin & R. Herrmann. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- [42] Sertkaya G, 2005. Preliminary studies on the detection of phytoplasmas in cherry by microscopy techniques. *5th International Cherry Symposium (5ICS) Bursa-Turkey. Acta Horticulture* **795**: 933-937.
- [43] Sertkaya G, 2008. Preliminary studies on the detection of phytoplasmas in cherry by microscopy techniques. *ISHS Acta Horticulturae, V International Cherry Symposium* **795**.151.
- [44] Sertkaya G, Martini M and Osler R, 2008. First report of Candidatus phytoplasma mali in Turkey. *J. Plant Pathology* **90**, 143.
- [45] Sertkaya G, Martini M, Ermacora P, Musetti R and Osler R, 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. *Phytoparasitica* **33**: 380-390.
- [46] Sertkaya G, 2004. Detection and transmission of tomato disease associated with phytoplasmas. *1st Int. Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop (20-24 June 2004)*, Orlando, Florida USA.
- [47] Spaldon E, 1958. Stolbur and similar virus diseases causing seedlessness of plants. Proc. Conf. On Stolbur, Smolenice. (E. Spaldon, C. Blattny, and V. Bojnansky, eds.) Slovak Acad. Publishing House. Bratislava: 25-33.
- [48] Tamas I., Klasson L., Canback B., Naslund A. K., Eriksson A. S., Wernegreen J. J., et al. (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296 2376–2379. [10.1126/science.1071278](https://doi.org/10.1126/science.1071278)
- [49] Tarım Gıda Hayvancılık Bakanlığı Mısır Hastalık ve Zararlılarıyla Mücadele Teknik Talimatları
- [50] *Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü TEPGE Mısır Durum ve Tahmin 2013-2014*
- [51] Schneider B, Torres E, Martin MP, Schroder M, Behnke HD, Seemuller E (2005). ‘Candidatus Phytoplasma pini’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 303-307.
- [52] Sertkaya E. 2005. *Doğu akdeniz Bölgesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarında sorun olan fitoplazma kökenli hastalıkların yaygınlığının, böcek vektörlerinin belirlenmesi ile bunların populasyon gelişmesi ve vector etkinliğinin araştırılması*. TUBİTAK- TOGTAG-3205 (2003-2005) proje raporu.

- [53] Sertkaya G, Martini M, Ermacora P, Musetti R, Osler R (2005). Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. *Phytoparasitica*. **33**: 380-390.
- [54] Sertkaya G, Martini M, Musetti R, Osler R (2007). Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bull. Insectology*. **60** (2): 141-142.
- [55] Sertkaya G, Martini M, Osler R (2008). First report of *Candidatus* phytoplasma mali in Turkey. *J. Plant Pathol.* **90** (1): 143-149.
- [56] Sertkaya G, Osler R, Musetti R, Ermacora P, Martini M (2004). Detection of phytoplasmas in *Rubus* spp. by microscopy and molecular techniques in Turkey. *Acta Hort.* **656**: 181-186.
- [57] Ulubaş Serçe Ç, Çağlayan K, Gazel M ve K Kaya, 2012. *Meyve Ağaçlarında Fitoplazmaların Neden Olduğu Hastalıkların Yayılmasında Psillidlerin Rolü*, 109O448 nolu TÜBİTAK Projesi Kesin Raporu.
- [58] Ulubaş Serçe Ç, Gazel M, Çağlayan K, Baş M, Son L (2006). Phytoplasma diseases of fruit trees in germplasm and commercial orchards in Turkey. *J. Plant Pathol.* **88** (2): 179-185.
- [59] Zoltan Acs, Jelena Jović, Ibolya Ember , Tatjana Cvrković , Zita Nagy , Cecilia Talaber, Laszlo Gergely, Ivo Toševski, Maria Kölber First report of maize redness disease in Hungary.
- [60] Welliver, R. 1999. Diseases Caused by Phytoplasmas. *Regulatory Horticulture* vol.25, No.1, Plant Pathology Circular No. 82, Pennsylvania Dept. of Agriculture, Bureau of Plant Industry, p.17–22

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: MEHMET KAÇAR

Doğum Yeri ve Tarihi: Diyarbakır/Dicle 06.01.1988

Adres: Fırat Mahallaesi Nazım Hikmet cad. Çarakanat-Mer sitesi I/Blok kat:9 No:30

E-Posta: mmtkacar@hotmail.com

Lisans: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma