

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUSAM GENETİK STOKUNUN PHYLLODY HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIK BAKIMINDAN TARANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUSAM GENETİK STOKUNUN PHYLLODY HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIK BAKIMINDAN TARANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2013.02.0121.022 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUSAM GENETİK STOKUNUN PHYLLODY HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIK BAKIMINDAN TARANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Rüstem ÜSTÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez/...../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent UZUN

Doç. Dr. Taner AKAR

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ÖZET

SUSAM GENETİK STOKUNUN PHYLLODY HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK BAKIMINDAN TARANMASI VE MOLEKÜLER ANALİZİ

Rüstem ÜSTÜN

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent UZUN

Haziran 2014, 53 sayfa

Bu çalışma, 542 susam genotipinin phyllody hastalığına karşı dayanıklılık bakımından taranması ve moleküler tekniklerle incelenmesi amacıyla 2012, 2013 ve 2014 yıllarında Antalya'da yürütülmüştür. Genotipler araziye augmented deneme deseninde iki yıl süresince ekilmiş ve phyllody hastalığının tarlada gözlemleri alınarak 1-5 sklasına göre değerlendirilmiştir. Tarlada potansiyel dayanıklı olarak belirlenen genotipler serada bir kez daha testlenerek, dayanıklılık doğrulanmıştır. Tarla ve sera koşullarındaki denemelerden hastalıklı ve sağlıklı bitkilerden yaprak ve doku örnekleri alınarak DNA izole edilmiştir. DNA örnekleri doğrudan, nested ve real-time PCR yöntemleriyle analiz edilmiştir. Doğrudan PCR yönteminde P1-P7 primerleri kullanılmış ve yaklaşık 1800 bp uzunluğunda ürün elde edilmiştir. Nested PCR yönteminde ise R16F2n- R16R2 ve Fu5-Ru3 primer çiftleri kullanılmış ve sırasıyla yaklaşık 1240 bp ve 880 bp ürünleri elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin sekans ve RFLP analizi yapılmış ve bu moleküler analizler sonucu phyllody hastalık etmeni olan fitoplazmalar sınıflandırılmıştır. Bu veriler ışığında pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) ve peanut witches'-broom (16SrII-D) gruplarına ait fitoplazmaların bölgemizde phyllody hastalığına sebep olduğu belirlenmiştir. Daha sonra sekanslardan elde edilen DNA dizilimine göre primer ve probelar dizayn edilerek real-time PCR yöntemi ile hastalık etmeni ırkının hangi grubuna ait olduğu hızlı ve pratik yolla belirlenmiştir. Antalya koşullarında phyllody hastalığını yayan böceğin *Orosius orientalis* olduğu tespit edilmiş ve bu hastalık vektör böcek yardımıyla ve aşılama yöntemiyle sağlıklı bitkilere başarılı şekilde aktarılmıştır. Sonuç olarak, incelenen 542 susam genotipinden ACS38 ve ACS102 genotiplerinin hastalık etmenine karşı dayanıklı oldukları saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Susam, *Sesamum indicum* L., phyllody, sekans, vektör böcek, taşınma, dayanıklılık

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent UZUN (Danışman)

Doç. Dr. Taner AKAR

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

SCREENING AND MOLECULAR ANALYSIS FOR PHYLLODY DISEASE RESISTANCE IN SESAME GENETIC STOCK

Rüstem ÜSTÜN

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Bülent UZUN

June 2014, 53 pages

The study was conducted to screen 542 sesame genotypes for phyllody disease resistance in the growing years of 2012, 2013 and 2014 in Antalya. The augmented experimental design was used for the field trials. Sesame plants in the field were scored for the disease according to 1-5 scale. The genotypes identified resistance the disease under field conditions were further confirmed under greenhouse condition. Phytoplasma infected and healthy sesame plant leaf samples were collected in the field and the greenhouse. DNAs were isolated from selected samples which were analysed by direct, nested and real-time PCR methods. P1-P7 primers used in direct PCR produced 1800 bp amplicons. Primers of R16F2n- R16R2 and Fu5-Ru3 were also used in nested PCR and they produced 1240 bp and 880 bp products, respectively. Sequencing of PCR amplicons and RFLP analyses of those products were realized, too. The phytoplasmas were classified into pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) and peanut witches'-broom (16SrII-D) groups based on the data. New primers and probes were designed for real-time PCR from sequencing of the PCR amplicons so that the detection of the disease and the relative quantification of resistance level in sesame genotypes were determined, simultaneously. *Orosius orientalis* was identified as the vector insect of phyllody in sesame. Using with grafting and the insect vector were successfully transferred to healthy plants. As a result, genotypes ACS38 and ACS102 were found resistant to phyllody disease.

KEYWORDS: Sesame, *Sesamum indicum* L., phyllody, sequence, vector, transmission, resistance

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent UZUN (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Taner AKAR
Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Susam hem tohumu hem de yağı doğrudan tüketilebilen önemli bir yağlı tohum bitkisidir. Özellikle sahip olduğu antioksidanlar sayesinde tüketimi ve bilinirliği gittikçe artmaktadır. Ancak ülkemizde tüm yağlı tohumlu bitkilerde olduğu gibi susamda da yeterli üretimin sağlanamaması susam ithalatını zorunlu kılmaktadır. Hastalık ve zararlılara dayanıklı, yüksek verim ve yağ içeriğine sahip farklı çeşitlerin çok sayıda olmaması yetersiz üretimin başlıca nedenleridir. Yetiştirme koşullarına uygun, canlı ve cansız stres faktörlerine dayanıklı ve yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi ülkemiz susam ıslahının ana hedeflerinde yer almaktadır. Günümüzde biyotik stres faktörlerinden en önemlisi susam phyllody hastalığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Phyllody hastalığının susam tarlalarındaki varlığı önemli olumsuz etkiye sahiptir. Son 10 yıllık sürece baktığımızda susam tarlalarında büyük verim kayıpları meydana gelmektedir. Bu çalışmada susam üreticilerinin büyük bir sorunu olan phyllody hastalığına karşı, susam genetik stokundaki dayanıklı genotiplerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamın her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, bana bu araştırma konusunda Yüksek Lisans yapma imkânı veren, çalışmalarım sırasında her türlü olanağı sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Bülent UZUN'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürisinde yer alarak yaptıkları düzeltmeler ve katkılardan dolayı Sayın Doç. Dr. Taner AKAR'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca birim imkânlarından yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ile Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK-COST 1110027, SAN-TEZ 01527-STZ-2012-2 ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Her ihtiyaç duyduğumda desteklerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Engin YOL, Yüksek Lisans öğrencisi Sayın Mehmet SÖNMEZ ve Zir. Yük. Müh. Sayın Şeymus FURAT ile çalışma arkadaşlarım ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Deneme yeri	13
3.1.2. Deneme yerinin toprak analiz sonuçları.....	13
3.1.3. Deneme yerinin iklim özellikleri.....	13
3.1.4. Genetik materyal	14
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Materyalin yetiştirilmesi ve tarla şartlarında yapılan dayanıklılık gözlemleri.....	22
3.2.2. Vektör böcek türünün belirlenmesi ve yetiştirilmesi	23
3.2.3. Hastalık transfer çalışmaları.....	25
3.2.3.1. Enjeksiyon yöntemi ile hastalık aktarma çalışması	25
3.2.3.2. Aşılama yöntemiyle hastalık aktarma çalışması	25
3.2.3.3. Vektör böcek yardımıyla hastalık aktarma çalışması	26
3.2.4. Sera koşullarında dayanıklılığın doğrulanması	27
3.2.5. Moleküler analizler	27
3.2.5.1. DNA izolasyonu	27
3.2.5.2. Doğrudan ve Nested PCR analizleri	28
3.2.5.3. Real-Time PCR (qPCR) analizleri.....	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. Tarla şartlarında dayanıklılık testlemeleri.....	32
4.2. Sera Koşullarında dayanıklılığının doğrulanması	36
4.3. Böcek türünün belirlenmesi ve yetiştirilmesi.....	36
4.4. Hastalık transfer çalışmaları.....	37
4.5. Doğrudan ve Nested PCR analizleri.....	38
4.6. Sekans analizleri.....	38
4.7. Real-Time PCR analizleri	39
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	44
7. KAYNAKLAR	46
8. EKLER.....	52
EK-1. 16SrIX-C phytoplasmasına ait örnek sekans.....	52
EK-2. 16SrII-D phytoplasmasına ait örnek sekans	53
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bp	Baz çifti
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
Ct	Cycle Threshold
ddH ₂ O	Çift destile su
dk	Dakika
H ₂ O	Hidrojen di oksit
HCl	Hidroklorik Asit
ha	Hektar
K	Potasyum
K ₂ O	Potasyum Oksit
kb	Kilobayt
kg	Kilogram
M	Molar
m	Metre
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N	Azot
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
P	Fosfor
P ₂ O ₅	Fosforpentaoksit
pH	Asitlik ve bazlık derecesi
pmol	Piko mol
ppm	Milyonda bir birim
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
µl	Mikrolitre
%	Yüzde
°K	Kuzey Enlem
°G	Güney Enlem
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

BAP	Benzylaminopurine
BATEM	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
cDNA	Komplementer DNA (Tamamlayıcı DNA)
CEQ	Genetic Analysis System
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DAPI	4-6 diamidino-phenylindole

DNA	Deoxyribonucleic acide
dNTP	Deoxyribonucleotide 5' triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetra asetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtBr	Ethidium Bromide
GA3	Gibberellik Asit
IAA	İndol Asetik Asit
IRPCM	Karşılaştırılmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi
MBO	Mikoplazma benzeri organizma
NAA	Naphthalene Asetik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Real-Time PCR
rDNA	Ribosomal Deoksiribonükleik Asit
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TMV	Tütün Mozaik Virüsü
tRNA	Translater Ribonükleik Asit
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Genetik materyalin ekimi ve çıkış sonrasına ait genel bir görüntüsü	22
Şekil 3.2. Epidemiyi artırmak için parsellere Cezayir menekşesi fidelerinin şaşırtılması	23
Şekil 3.3. Diğer tarlalardan toplanan hastalıklı bitkilerin deneme alanına şaşırtılması	23
Şekil 3.4. Susam tarlalarında görülen böceklerin modifiye vakum cihazı ile toplanması	24
Şekil 3.5. Sera içerisine yerleştirilen büyük tül kafesler	24
Şekil 3.6. Enjeksiyon yöntemiyle hastalık aktarma çalışması	25
Şekil 3.7. Aşılama yöntemiyle hastalık aktarma çalışması	26
Şekil 3.8. Vektör böcek yardımıyla hastalık transferi.....	26
Şekil 3.9. Genotiplerin sera şartlarında dayanıklılık testlemeleri	27
Şekil 3.10. Doğrudan ve nested PCR analizlerinde kullanılan cihazlar.....	29
Şekil 3.11. Dizileme ve qPCR analizlerinde kullanılan cihazlar	31
Şekil 4.1. Phyllody hastalığı sorguç oluşturmaları	32
Şekil 4.2. a) Çiçeklerin dölllenmemesi sonucu boş ve deforme susam kapsülleri.....	33
Şekil 4.2. b) Sağlıklı ve phyllody bulaşık susam kapsül ve çiçekleri	33
Şekil 4.3. P1-P7 primerleri ile kurulan böcek PCR ürünleri.....	37
Şekil 4.4. Fu5-Ru3 primerleri ile yapılan nested PCR jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.5. Real time PCR görüntüsü	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneme yeri toprağının fiziksel ve kimyasal özellikleri	13
Çizelge 3.2. Araştırma yerinin bitki yetiştirme dönemine ait iklim verileri	14
Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan genetik materyalin kodu ve orijini	15
Çizelge 3.4. Doğrudan ve nested PCR'in ana karışım bileşenleri ve oranları	28
Çizelge 3.5. Kullanılan primerler, dizinleri ve boy uzunlukları	30
Çizelge 3.6. qPCR karışım bileşenleri ve oranı	31
Çizelge 4.1. Ülkesel orijinlere göre uluslararası susam koleksiyonunun her iki deneme yılında hastalık gözlem skorları	34
Çizelge 4.2. 2013 yılı gözlemleri sonucu dayanıklı olarak gözlemlenen genotipler	35
Çizelge 4.3. Susam tarlalarında toplanan böcek türleri ve PCR analiz sonuçları	36
Çizelge 4.4. Farklı bölgelerden toplanan <i>Orosius orientalis</i> türüne ait hastalık epidemisi taşıma oranı	37

1. GİRİŞ

Fitoplazmalar, büyüklükleri 200-800 nm arasında değişen, hücre duvarsız prokaryotlar olup, sadece canlı konukçu dokularında yaşayabilen obligat parazit canlılardır. Fitoplazmalar, prokaryot canlıların Molikütler sınıfında yer alırlar ve dünyada yaklaşık 1000 kadar bitki türünde hastalığa neden olduğu belirtilmiştir (Seemüller vd 2002). Hasta bitkilerin floem borusunun kalburlu kısmındaki elementleri (karbonhidrat, sükröz gibi) emerek yaşarlar. Bu canlılar sert hücre duvarına sahip değildir ve etrafları tek bir zarla çevrili olduğu için antibiyotiklere karşı hassastırlar. Fitoplazmaların; tahıllarda, sebzelerde, meyve ağaçlarında, süs bitkilerinde ve ağaçlarda oluşan hastalıklarla ilişkisinin olduğu öne sürülmüştür (Vidhyasekaran 2004).

Fitoplazmalar, böcek vektörler ve bitkilerdeki konukçu hücrenin sitoplazmasında gelişir ve çoğalırlar. Tomurcuklanma vasıtasıyla aseksüel olarak üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Fitoplazmalar enfekte ettikleri bitkilerin öncelikle floem iletim demetlerine saldırırlar ve floem dokusunda kalırlar. Bu patojenler bitkilerin floeminde beslenen yaprak pireleri, Cixidiidae ve Psillidae familyasına bağlı vektör böceklerle taşınırlar. Böcek bitkide beslenirken yaptığı emgi ile patojeni bünyesine almakta ve daha sonra beslenme kanalı ve tükürük bezleri ile patojeni sağlıklı bitkilere taşımaktadır. Genellikle böceğin enfekteli olduğu bir latent dönemi vardır. Bu dönem böceğin türüne ve yapısına göre birkaç saatle bir kaç hafta arasında değişebilmektedir. Vektör böcekler bünyelerinde bulunan fitoplazmadan etkilenmezler ve bir zarar görmezler. Fitoplazmalar ayrıca küsküt ile de taşınmaktadır. Bu yolla taşınmada en çok kullanılan bitki, deneysel çalışmalarda bitkilere fitoplazma ırkı aktarılmasında da önemli bir bitki olan Cezayir menekşesidir (*Catharanthus roseus* L.). Bu şekilde pek çok fitoplazma ırkı Cezayir menekşesinde muhafaza edilmektedir. Diğer taraftan aşılama, çelikle üretim, mikro çoğaltım gibi seksüel çoğaltmadan farklı yöntemlerle yapılan çoğaltma işlemlerinin fitoplazma taşınmasında önemli rol oynadığı uzun yıllardır bilinmektedir. Tohumla taşınma ise hala araştırılan bir konu olmakla birlikte, yonca bitkilerinde ve hindistan cevizinde gizli sarılık fitoplazmasının çok az sayıda bitkide tohumla taşındığı belirlenmiştir. Fitoplazmalar kışı hastalık bulaşmış vektör böceklerde veya çok yıllık konukçu bitkilerde geçirebilmektedirler (Bertaccini 2007).

İlk fitoplazma hastalığı olan aster sarılığı 1902 yılında rapor edilmiş ve aster sarılığının, 1967 yılına kadar bir virüs hastalığı olduğu varsayılmıştır. Virüsler tarafından neden olduğu sanılan bazı bitki hastalıklarının morfolojik olarak insan patojeni olan mikoplazmalara benzeyen ve floemde kolonize olan prokaryotlarla ilişkili olduğu ilk kez 1967 yılında yapılan elektron mikroskop çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Doi vd 1967). Bu tarihten sonra yüzlerce bitki hastalığına mikoplazma benzeri organizmaların etmen olduğu bildirilmiştir. *In vitro* koşullarında gelişmeleri mümkün olmadığından son 15 yıla kadar çok azı karakterize edilmiş, ribozomal DNA (rDNA) baz dizisi tayininin mümkün olmasından sonra bitki floeminde ve böceklerde kolonize olan, hücre duvarından yoksun bu prokaryotların Mollicutes sınıfının içinde büyük bir mono-filogenetik grup oluşturduğu görülmüştür. Bu patojenlerin tanısı 20 yıldan fazla bir süre mikroskopik gözlemler (DAPI boyama) ya da elektron mikroskop yöntemleri ile yapılmıştır. Ancak, son çeyrek asırda DNA-temelli modern biyoteknolojik yöntemlerin uygulanmasıyla prokaryotlar içerisinde farklı moleküler kümelerin ayırt edilmesine olanak tanınmıştır. Mikoplazma benzeri organizmalar terimi 1967-1994 yılları arasında sararma hastalığına sebep olan organizmaların adı olarak

kullanılmıştır. Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi'nin (IRPCM) Bitki Mikoplazmaları Birimi bu gruba ait prokaryotları tanımlamak için 'fitoplazma' adını vermiş; 'Candidatus Phytoplasma' cinsi önerilerek bu prokaryotların resmi sınıflandırılması yapılmaya başlanmıştır (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team 2004).

Fitoplazmaların ayrımı ve saptanması, hastalığın teşhisi için gereklidir. Fitoplazmalar, insan ve hayvanları enfekte eden mikoplazmalardan 16S ve 23S ribozomal bölgelerin arasında kalan boşluk bölgesi ile genetik olarak ayrılabilirler. Önerilen ilk fitoplazma tanılama ve sınıflandırma sistemleri vektörle taşınmadaki özelleşme, konukçu dizisi ve Cezayir menekşesi gibi genel bir konukçudaki semptom oluşumları esasına dayanmaktadır. Önceleri poliklonal antiserum daha sonra da monoklonal antiserumların geliştirilmesi ile fitoplazma grupları arasında ilk farklılıkların ortaya konulması sağlanmıştır. Geçen 30 yılda yapılan birçok çabaya rağmen fitoplazmalar kültüre alınamamıştır. Bundan dolayı, kültüre alınan prokaryotlara uygulanan geleneksel sınıflandırma yöntemiyle de sınıflandırılmamıştır. Son dönemde ticari patentli saf bir kültür ortamının geliştirildiği ve bu ortamda belirli şartlar altında fitoplazmaların çoğaltıldığı rapor edilmiştir. İlk kez konukçusu olmadan bir fitoplazma ırkının saf kültür ortamında geliştirildiği rapor edilmiştir (Contaldo vd 2012).

Bu prokaryotlar geçmişte *in vitro* olarak kültüre alınamadığından alternatif metotlar kullanılmıştır. Geçmişte bu amaç için hem DNA hibridizasyonu hem de serolojik yöntemler kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); bitki, böcek ve konukçu bitkilerdeki fitoplazmaları belirlemek için elverişli bir yöntem olduğundan günümüzde en çok kullanılan ve uygulanan yöntemdir. Fitoplazma genomunun, fitoplazmaya özgü 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen DNA parçalarından PCR primerleri geliştirilmiştir. Ancak 16S rRNA genomuyla ilişkili olan fitoplazmaların birbirine benzer olması fitoplazmaların ayırt edilmesini zorlaştırmıştır. Günümüzde, fitoplazmaların ayrımını sağlayan bölgenin 16S ve 23S rRNA genom bölgesi olduğu saptanmış ve ana fitoplazma gruplarını ayırt etmeyi sağlayacak spesifik genom bölgelerine özgü PCR primerleri geliştirilmiştir. Bu teknik; epidemiyolojik çalışmalar, vektör ilişkilerinin analizi ve hastalığın kontrolüne yönelik strateji geliştirilmesi açısından önemlidir (Smart vd 1996). Günümüzde halen fitoplazmaların tespitinde evrensel ve spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Susam Pedaliaceae familyasına ait olup, *Sesamum* cinsi içerisinde 37 türü barındırmaktadır. Dünyada *Sesamum* cinsi içerisinde sadece *Sesamum indicum* L. (2n = 26) türünün kültürü yapılmaktadır (Kobayashi 1981). Susam; Hindistan, Myanmar, Sudan ve Çin başta olmak suretiyle dünyanın tropik ve subtropik iklim kuşaklarına sahip birçok yerde kültürü yapılan tek yıllık bir yağ bitkisidir. Dünya susam ekim alanı 7.897.048 hektar olup en fazla ekiliş alanına sahip ülkeler 1.820.000 ha ile Hindistan ve 1.570.000 ha ile Myanmar'dır. Sudan 820.260 ha ile bu iki ülkeyi takip etmektedir. Dünya toplam susam üretimi 4.036.289 ton olup, 620.000 ton ile Myanmar ve 610.000 ton ile Hindistan yine en fazla susam üretimini gerçekleştiren ülkelerdir. Bu ülkeleri 600.620 ton üretimiyle Çin izlemektedir. Dünyada ortalama hektara düşen susam verimi 0.51 ton/ha'dır (FAO 2012). Ülkemizde ise susam ekilişi 24.807 ha iken üretim 15.457 ton ve ortalama verim 0.62 ton/ha'dır (TUIK 2013).

Susamın gelişme süresinin kısa olması, toprak seçiciliğinin fazla olmayışı, besin maddelerine duyduğu ihtiyacın az olması, kuraklığa toleranslı oluşu ve pazarlama konusunda sorun olmaması sebebiyle ülkemizde ana ve ikinci ürün olarak önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada ve Türkiye’de çeşitli ekolojik koşullara adapte olmuş, çok sayıda susam varyete ve ekotipi bulunmaktadır. Bu varyete ve ekotipler, pek çok genotipin bir araya geldiği popülasyonlar halindedir. Bugüne kadar dünyanın birçok ülkesinde bu tür popülasyonlardan teksel ve toplu seleksiyonuna dayalı olarak pek çok üstün özellikli susam çeşidi geliştirilmektedir (Baydar vd 2000). Yerel genetik materyalden çiftçiler tarafından bilinçli veya bilinçsiz olarak yapılan seleksiyonlar, bugün hâlen ticari olarak üretilen pek çok susam çeşidinin ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır (Ashri 1989). Bilinen en eski yağ bitkisi olmasına karşın susam, diğer kültür bitkilerine göre çok daha az araştırılan bir ürün olmuştur. Susamda ıslah çalışmaları ise sınırlı sayıda olup özellikle ülkemizde ise son derece kısıtlıdır. Türkiye dâhil olmak üzere birçok ülkede ıslah edilmiş çeşitler henüz tam anlamıyla kabul görmemiştir. Islahı yapılmış bitkiler elde edilmesine karşın genelde adaptasyon gücü yüksek yerel çeşitler tercih edilmektedir (Baydar vd 1999). Bu da susamda genetik çeşitliliğin korunmasına olanak sağlamıştır.

Susam, tohumları % 50-60 yağ içeren bir bitkidir. Hatta bazı tiplerde yağ oranı % 62.7’ye kadar çıkabilmektedir (Uzun vd 2007, 2008). İçerdiği bu yüksek yağ oranıyla da tam bir besin ve enerji kaynağıdır. Susam; ülkemizde en çok tahin yapımında, simit üretiminde, şekerleme ve pastacılık alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik sanayinde ve sabun yapımında da susamdan yararlanılmaktadır. Küspesi kaliteli bir hayvan yemi olup, mısır unundan yapılan ekmeğe katkı maddesi şeklinde ilave edilerek insan gıdası olarak da kullanılmaktadır.

Susam; sesamin, sesamol, sesamolin ve sesaminol antioksidanlarını içermektedir (Yoshida ve Takagi 1997). Yüksek değerde proteini ve ürüne özgü bir bileşik olan phenylpropanoidi de susamın yapısında bulunmaktadır. Susam tohumlarının veya ununun tüketimi ile insan ve farelerde kolesterol seviyesinin azaldığı saptanmıştır (Chen vd 2005). Bunlara ek olarak, susam ve içeriklerinin tüketimi ile kan plazmasında E vitamini konsantrasyonunun arttığı da belirlenmiş (Frank 2005) ayrıca antikanserijen (Kapadia vd 2002) ve antimutajenik (Kaur ve Saini 2000) etkilerinin olduğu da bildirilmiştir.

Ülkemizdeki susam ekiminin yıldan yıla düştüğü gözlenmektedir. 1990’lı yılların başında 85.000 ha olan susam ekim alanları günümüzde 24.000 ha’ya kadar gerileme göstermiştir. Bu gerilemenin başlıca nedenleri; ülkemizdeki susam ekimlerinde kullanılan tohumların kapsüllerini çatlatması sebebiyle hasat sırasında oluşan verim kayıpları ve dolayısıyla makinalı hasada elverişsizlik ve kullanılan tohumluğun yerel popülasyonlardan seçilmesi nedeniyle verimlerin düşük olmasıdır. Susam ekim alanlarındaki azalmada yukarıdaki faktörlerin etkisi olmakla beraber, phyllody hastalığının susam tarlalarındaki varlığı da önemli bir etkiye sahiptir. Son 10 yıllık sürece baktığımızda, phyllody hastalığının en etkin olduğu yer Hatay ili ve çevresi olduğu görülmektedir. Bu süre içerisinde Hatay’daki ekim alanlarının tamamına yakını sadece phyllody hastalığının yaygın epidemisi sonucu yok olmuştur. Bu süreçte Ege ve Batı Akdeniz Bölgeleri açısından phyllody hastalığı çok sorun olmamış ama potansiyel tehlikesini hissettirmiştir. Uzun (2007)’a göre phyllody zararının Ege ve Akdeniz’de tahmin edilenden çok daha fazla olduğu ve hızla yaygınlaştığı ifade edilmiştir. Son üç

dört yıllık dönemde de phyllody fitoplazması yaygınlaşarak ülkemizin susam tarımı yapılan bütün bölgelerini az veya çok etkisi altına almıştır. Hatta 2009 yılında BATEM'de Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Müdürlüğü adına yürütülen çeşit tescil denemesi, phyllody hastalığı yoğunluğundan iptal edilmiştir. Bu hastalıkla mücadelede en ekonomik, çevreci ve sürdürülebilir yol ise dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Ne var ki, ülkemizde phyllody hastalığına dayanıklı bir çeşit henüz geliştirilmemiştir. Dünyada ise *Sesamum alatum* türünde dominant ve kültürü yapılan *S. indicum* türünde ise resesif bir dayanıklılığın olduğu bildirilmiştir (Singh vd 2007). Dayanıklılık konusunda yapılan çalışmalar çoğunlukla *S. alatum* türüne yoğunlaşmış olmakla birlikte oldukça yenidir. Singh vd (2007), 150 genotip, 32 çeşit ve 4 yabancı türü içeren bir dayanıklılık çalışmasında 7 hat ile *S. alatum* ve *S. mulayanum*'un dayanıklı olduğunu rapor etmişlerdir. Kalıtım çalışması neticesinde kültür susamlarının resesif bir gen, yabancıların ise dominant bir gen sayesinde dayanıklı olduğu ifade edilmiştir. Fakat sonuçların güvenilirliği tartışmaya açıktır. Parani vd (1996), *Sesamum alatum*'un dayanıklılık mekanizması üzerinde yürüttüğü çalışmada, vektör böcek yerine aşılama ile yapılan bulaştırmalarda *S. alatum* bitkilerinde dayanıklılığın % 40 seviyelerinde olduğunu ifade etmiştir. Araştırmacılar dayanıklılığın tek bir resesif gen tarafından kontrol edildiğini ve bitkinin hastalığa dayanıklı değil, vektör böceklere dayanıklı olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu tezde, dünyada susam tarımı yapılan birçok ülkeden orijin alan 542 farklı susam genotipi içinden phyllody hastalığına dayanıklılık kaynağının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm genotipler tarlada phyllody epidemisi altında fenotiplendirilmiş, potansiyel dayanıklı olan genotipler sera şartlarında bire bir testlenerek dayanıklılık kaynakları doğrulanmıştır. Dayanıklılık kaynağının doğru olarak tespit edilmesi amacıyla klasik ve nested PCR analizleri ile real-time PCR teknikleri etkin bir şekilde kullanılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Doi vd (1967), mikoplasma benzeri organizmaları (MBO) ilk kez elektron mikroskopuyla saptamışlar ve adlandırmışlardır.

Woese vd (1980), prokaryotlardaki rRNA geni sekanslarının analizleriyle fitoplazmaları (mikoplazmaları) ayırt etmişlerdir. Fitopatogenik mikoplazma benzeri organizmaların molikütler sınıfına ait olduğu öne sürülmektedir. Molikütler sınıfında 4 ana filogenetik grup bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, *Spiroplasma*, and *Anaeroplasma* 'dır.

Molikütlerin moleküler teşhisi, 16S ribozomal RNA (rRNA) genlerine özgü hazırlanan primerlerin geliştirilmesiyle mümkün olmuştur. Ökaryotların 16S benzeri rRNA dizileri ile bakterilerin, molikütlerin ve hücre içi organellerin 16S rRNA dizileri temel alınarak beş çift PCR primeri sentez edilmiştir. Bu PCR primerleri, kültüre alınabilen ile kültüre alınamayan değişik molikütlerin 16S rRNA gen dizileri ile yüksek homoloji, ökaryotik nükleer 16S-benzeri rRNA ya da hücre içi organellerinin 16S rRNA genleri ile de düşük dizilim homolojisi göstermektedir. Molikütlere özgü DNA preparatları ile PCR uygulaması yapıldığında, uzun zincirli 16S rRNA genleri ve kısa zincirli 16S rRNA genlerinin değişken bölgeleri başarılı olarak çoğaltılmıştır. Aynı primerler *Escherichia coli* ve sağlıklı bitki DNA preparatları kullanıldığında ise çoğaltım yapılmamıştır (Deng ve Hiruki 1991).

Ahrens ve Seemüller (1992), 16S rRNA gen dizisinin çoğaltıldığı PCR metoduyla mikoplazma benzeri bitki patojenlerinin DNA'larını saptamışlardır. Bu çalışmalarında *Catharanthus roseus*'dan izole edilmiş MBO izolatları ile sistemin uygunluğunu test etmişlerdir. Tüm izolatlardan 24 döngü sonrasında çoğalma ürünü olan MBO DNA'sını elde etmişlerdir. Bu yöntemle bulaşık bitkiden alınan örneklerde ise 40 döngü sonrasında MBO'nun DNA parçacığı saptanmıştır. Belirti göstermeyen bitkilerdeki MBO varlığının, DNA çoğaltım işleminin yapıldığı RFLP analizi ile tespit edilebileceği gösterilmiştir.

Salehi vd (1992), susam bitkilerinde phyllody hastalığının etiyolojisi ve taşınması üzerine yaptıkları çalışmalarında phyllody hastalığının İran'da yıkıcı bir etkiye sahip olduğunu ve temel belirtilerin; çiçeklerde sararma, uzama ve phyllody oluşumu olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, ışık mikroskobu altında susam ve kolza bitkilerini incelemiş ve floem bölgesinde mavi renkte lekeler tespit etmişlerdir. Elektron mikroskopunda yapılan çok daha ayrıntılı inceleme neticesinde enfekteli susam bitkilerinde mikoplazma benzeri organizmalar bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, susam phyllody hastalığının bir susam bitkisinden diğerine aşılama yaparak bulaştırma yapılabileceği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Susam tarlalarından çeşitli leafhopper grubundan böcekler toplanmış ve bunlar içinden sadece *Neolaliturus haematoceps* hastalığı aktarmıştır. Bu çalışma İran'da susam phyllody hastalığının sebebi mikoplazma benzeri organizma (MBO) olduğunun tespiti ve *N. haematoceps*'in (MBO'nun) vektörü olduğunun ilk raporudur. Vektör böcek kullanılarak 22 konukçu bitkide çalışma yapılmış ve sadece kolza (*B. napus*), tere (*Lepidium sativum*), Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*), marul (*Lactuca sp.*) ve semizotunda (*Portulaca oleracea*) hastalık gelişmiş ve çalışılan diğer türlerde gelişmemiştir.

Schneider vd (1993), PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA'nın kesim yeri analizi ile bitki patojeni MBO'ların sınıflandırılması çalışmalarında yabancı ot, tek yıllık ve çok yıllık bitkilerden oluşan 52 izolatta çalışmışlar ve bu izolatları, *AluI* ve *RsaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre; aynı grupta yer alan izolatların arasındaki benzerliğin % 97.8 ile % 99.5 arasında olduğu; farklı gruplardakilerin ise % 89.6 ile % 92 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Lee vd (1993), MBO'ların teşhisi ve sınıflandırılması için 16S rRNA'nın çoğaltılması ve analizi çalışmalarında, 16S rRNA'nın PCR ile çoğaltılarak RFLP uygulanması sonucu 16SrII ve 16SrIX fitoplazmalarında aralarında bulunduğu 40 fitoplazma izolatını sınıflandırmışlardır.

Başpınar vd (1993), 1991'de Mayıs ayından Eylül'e kadar Adana'da ana ve ikinci ürün olarak yetiştirilen susamlarda *Circulifer haematoceps* ve *Orosius orientalis* (Matsumura) dinamik popülasyonları (Homoptera: Cicadellidae) üzerinde çalışmışlardır. Ayrıca, enfekte olmuş susam bitkilerinde hem *Spiroplasma citri* oluşumu hem de phyllody hastalığı gözlenmiştir. Her iki hastalık için sırasıyla *C. haematoceps* ve *O. orientalis*in vektör böcekler olduğu rapor edilmiştir. Mayıs'da toplanan *C. haematoceps* (*S. citri* barındıran ve kış uykusundaki bütün dişiler) örnekleri laboratuvarında ELISA ile hastalığı taşıdığı saptanmıştır. *C. haematoceps* popülasyonunun artışı ile *S. citri* ile enfekte olan ikinci ürün susam bitkisi sayısı yaz ortasına kadar 125 bitki artmıştır. Birçok susam bitkisi aynı zamanda *S. citri* ve phyllody ile enfekte olmuştur. Bu çalışma *S. citri* epidemiyolojisi ile *C. haematoceps* popülasyonu arasında yakından ilişki olduğunu göstermiştir.

Kersting (1993), susam phyllodysinin oluşumu, dağılımı, davranışı ve vektör böcekleri konusunda Türkiye'de yürüttükleri çalışmalarında, hastalığın Güney Akdeniz Bölgesi'nde ve Türkiye'nin güneydoğusu boyunca bulunan bütün susam alanlarında yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Phyllody, cadı süpürgesi ve yeşil pigmentin anormal gelişimi (virescence) ana semptomlar olarak alanlarda gözlemlenmiştir. Bazı susam bitkilerinde kapsül iriliği meydana gelmiştir. Mikoplazma benzeri yapılar, enfekteli susam bitkilerinde gözlemlenirken sağlıklı bitkilerde gözlemlenmemiştir. Susamda bulunan çeşitli yaprak zararlıları arasında sadece *Circulifer haematoceps* (M&R), hastalığı susamdan Cezayir menekşesine taşımıştır. Cezayir menekşesine taşınma oranı yaklaşık % 22 civarındadır. Vektör spesifikliğine göre, Türkiye'deki susam MBO phyllodysinin görülmesi Hindistan ve Burkina Faso'dan farklı fakat İran'da bulunan ile benzer olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Smart vd (1996), fitoplazmaların belirleyici özelliğini geliştirerek, filogenetik gruplarına göre sınıflandırmak için, fitoplazmaların 16S-23S (SR bölgeleri) gen bölgelerindeki sekans farklılığından faydalanmışlardır. Bu özel bölgenin sekanslarından 10 farklı PCR primer çifti geliştirilmiş ve bir grup içindeki özel bölgeyi çoğalttığı görülmüştür. Karaağaç sarılığı, dişbudak ağacı sarılığı ve armut çökerten gibi bazı fitoplazma grupları için SR primeri 16S rRNA gen bölgesindeki spesifik primerle eşleşmiştir. Bu primer çiftlerinin her biri bir fitoplazma grubuna özgüdür. Ayrıca bu primerler, diğer fitoplazma grubuna ait uzunlukta PCR ürünü çoğaltmamıştır. Korunmuş tRNA bölgesine göre yaygın bir primer tasarlanmış ve tüm fitoplazmalar çoğaltılarak test edilmiştir. Hiç bir primer sağlıklı bitkiden alınan DNA'yı beklenen

büyükte üretmemiştir. Bu primerlerin belirli fitoplazmaları ayırt etmede etkili şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Fitoplazmaların ayırımında ve sınıflandırılmasında bazı moleküler markerler kullanılmıştır. 16S rRNA geni fitoplazma sınıflandırılmasında en çok kullanılan bölgedir ve fitoplazmaların sınıflandırılmasında çok yararlı olmuştur. 16S rRNA geni üzerindeki bazı evrensel veya generik oligonükleotid birimleri kullanılarak 16S-23S içsel ara bölge ve kısmi 23S rRNA gen dizisini kapsayan primerler düzenlenmiştir ve bunlar bitki ve böcek vektörlerle ilişkili çeşitli türlerde fitoplazma DNA'larının çoğaltmasını sağlamıştır. 16S rRNA gen dizisi RFLP analizlerinde kullanılmış ve Schneider vd (1993) ve Lee vd'nin (1993) yaptığı çalışmalarla fitoplazmaların sınıflandırılmasında uygulanmıştır. 17 restriksiyon enzimi ile RFLP analizi esas alınarak fitoplazmaların kapsamlı sınıflandırılma şeması inşa edilmiştir. Büyük grupların ayırımı, 1-2 kb PCR ürünlerinin RFLP analizleri neticesinde verdikleri benzerlik oranına göre hazırlanmıştır (Lee vd 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 vd 1998).

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. Bu teknoloji "kinetik PCR" ve "homogenous PCR" isimleriyle de tarif edilmektedir. "Real-time PCR"da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit metoddur. "SYBR-Green I" boya ile belirleme çok iyi işleyen bir metoddur fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda floresan ışımaya yapabilir. Bu primer-dimer oluşumu da olabilir. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar "TaqMan® probe" veya hidroliz prob, moleküler bead yöntemi ve hibridizasyon problemlerini içeren problemlerdir. "Real-time PCR"ın kullanımında birçok avantajlar vardır. "Real-time PCR"ın tipik kullanım alanları; patojen saptanması, gen anlatımının analizi, kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizi ve son zamanlarda "realtime" immüno PCR ile protein belirlemesidir. Ticari olarak satılan birçok "real-time" cihazı vardır. Birbirleri arasındaki temel farklılıklar "eksitasyon" ve "emisyon" dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. "Real-time PCR" teknolojisinin, kullanıcılar tarafında tercih edilen çeşitli alanlardaki önemi gittikçe artmaktadır (Günel 2007).

RFLP ile oluşturulan sınıflandırma sistemi 16S rRNA dizilerinin analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç ile benzerdir. Her bir grubun en az bir fitoplazma türü ile temsil edilmesi önerilmiştir (Gundersen vd 1994). Son yıllarda tablo daha görsel RFLP görüntüleri kullanılarak daha ileriye güncellenmiştir (Wei vd 2007, 2008; Zhao vd 2009, Martini ve Lee 2013). Günümüzde 31'den fazla grup ve 100'den fazla alt grup içermektedir. Her bir alt grup tek bir RFLP görüntüsünden oluşmaktadır. 16S rRNA geninin dizilemesi görsel RFLP analizinin oluşturulması için gereklidir. Pratikte gerçek RFLP analizi, bilinmeyen bir fitoplazma hastalığının ön karakterizasyonunda ya çok

sayıda örnek analiz edilecekse veya dizileme imkânı yoksa tercih edilebilir. Bu güncellenmiş tablo fitoplazmaların en kapsamlı sınıflandırılmasını temsil eder ve fitoplazma ırklarının hızlı tanısı amacıyla kullanışlı moleküler markerler sağlamaktadır.

Selvanarayanan vd (2000), Hindistan'da *Orosius albicinctus* tarafından taşınan phyllody hastalığına karşı susam bitkilerinin dayanıklılığı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Dayanıklı olabileceği düşünülen dört tane susam çeşidinde testler yapmışlardır. Araştırma bir çiftçi tarlasında tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Ekimden 30 gün sonra her hafta yapışkan tuzakla vektör popülasyonunu izlemiştir. Her denemeden rastgele hasta olan bitkiler seçilmiş ve her hafta gözlemler alınmıştır. Hastalığın şiddetini belirlemek için hastalıktan zarar görmüş kapsüllerin ve dalların yüzdesi kayıt altına alınmıştır. TMV 4 diğerlerine göre hastalığa daha az hassas görülmüştür. En hassas çeşit % 21.8 hastalık zararıyla TMV 3 çeşidi olmuştur. Bitkilerin erken döneminde böcek popülasyonu az seviyedeysen 51 günde böcek popülasyonu en üst seviyeye ulaşmış ve daha sonrada azalarak devam etmiştir. Susam çeşitlerindeki böcek popülasyonu istatistiksel olarak önemsiz ve aralarında ilişki olmadığını belirtmişlerdir.

Al-Sakeiti vd (2005), 2004 yılında Umman'da susam phyllody hastalığı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Hastalıklı ve sağlıklı susam bitkilerinin toplam DNA'sı çıkarılmış ve DNA örnekleri P1-P7 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Daha sonra PCR ürününü doğrudan kalıp DNA olarak kullanılarak R16F2n-R16R2 primerleri ile nested PCR yapılmıştır. Bu PCR ürünleri *Tru9I*, *HaeIII*, *HhaI* ve *RsaI* isimli dört tane kesim enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle kesilmiş ve analiz edilmiştir. Witches'-broom hastalığı taşıyan yonca ve lime limon ağacı DNA'ları pozitif kontrol, sağlıklı bitkiler ve suyu negatif kontrol olarak kullanmışlardır. Hastalıklı bitkiler ve pozitif kontroller P1-P7 primer çifti ile kurulan PCR 1.8 kb büyüklüğünde bir ürün, nested PCR ise 1.2 kb büyüklüğünde bir ürün üretmiştir. Negatif kontrollerde ise ürün gözlenmemiştir. RFLP sonuçlarına göre susam fitoplazması, 16SrII grubuna ait olan yonca fitoplazması ile çok benzer çıkmıştır. Bu çalışma ile Umman'daki susam phyllody hastalığının 16SrII grubuna ait witches'-broom hastalığı olduğunu ilk kez rapor etmişlerdir.

Esmailzadeh-Hosseini vd (2007), 2003-2005 yılları arasında İran'ın Yazd bölgesinde susam tarlalarında bir çalışma yürütmüşlerdir. Fitoplazma içeren (taşıyan) yaprak zararlısı olan *Orosius albicinctus* bulmuşlar ve toplamışlardır. Taşıma testleri sera koşullarında yürütülmüştür. Yonca, kanola, turp, susam, kırmızı turp, Cezayir menekşesi ve tere bitkilerini kullanmışlardır. Bitkilerdeki ve böceklerdeki hastalığı belirlemek için yaygın primelerle nested PCR yapmışlardır. Phyllody tarafından enfekte olmuş susam, tere ve pancar bitkilerinin hastalığını fitoplazmaya özgü 1200 bp 16S rDNA bölgesini PCR ile çoğaltarak doğrulamışlardır. Çoğaltılan DNA fragmentini beş endonükleaz kullanarak RFLP tekniğiyle 16SrII (peanut witches' broom phytoplasma) grubuna ait olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma İran'da susam phyllody hastalığının *Orosius albicinctus* tarafından taşındığının ilk raporu olarak ifade edilmiştir.

Hindistan'ın Uttar Pradesh şehrinin çeşitli bölgelerinde yer alan susam tarlalarında % 12-20 oranında phyllody oluşumu gözlenmiştir (Khan vd 2007). Hastalığı belirlemek için Bahraic bölgesinden toplanan sağlıklı ve hastalıklı yaprak örneklerinin DNA'sı çıkarılmış, hastalık belirtisi gösteren bütün bitkiler, phyllody hastalığı

fitoplazması ile ilişkilendirilmiş ve sağlıklı gözükten bitkilerde hastalık etmenine rastlanılmamıştır. Moleküler sınıflandırmada özel yaygın primerler olan P1-P6 (Deng ve Hiruki 1991) primeri ile PCR yapılmış ve yaklaşık 1,5 kb PCR ürünü alınmıştır. Çıkan PCR ürününün kalıp DNA olarak kullanılması ile R16F2n-R16R2 primerleri (Gundersen ve Lee 1996) ile nested PCR yapılmış ve yaklaşık 1.3 kb ürün elde etmişlerdir. Daha sonra bunun 1.3 kb büyüklüğünde olan PCR ürünü klonlanmış ve sekansı çıkarılmıştır. Sekans, blast yapılmış (Genbank Acc.No.: DQ431843) ve barley deformation (AY734453), aster yellows (AY665676), onion yellows (AP006628), silene virescence (AY744070), ash witches'-broom (AY566302) ve maize bushy stunt (AY265208), fitoplazmaları ile % 99 benzer çıkmıştır. Böylece fitoplazmanın '*Candidatus phytoplasma asteris*' (16SrI) grubuna ait olduğunu belirlenmiştir. Khan vd (2007), Hindistan'da 16SrI grubu susam phyllody hastalığının ilk kez bildirildiğini ifade etmişlerdir.

Singh vd (2007), fitoplazma hastalığına karşı dayanıklı susam çeşitlerinin geliştirilmesi ve taranması üzerine bir çalışma yapmışlardır. İlk başta 150 germplazm, 32 çeşit ve 4 yabancı tür 2005 yılında tarla koşullarında değerlendirilmiştir. Susamda phyllody hastalığına dayanımın kalıtımını belirlemek için 3 tür içi ve 2 türler arası olmak üzere melezlemeler yapılmıştır. Daha sonra her melezden ikişer tane melez dayanıklı genler arasındaki allelik ilişkiyi test etmek için isimlendirilmiştir. F2 ve geri melezleme analizlerine dayanarak susamda phyllody hastalığına dayanıklılığın tür içi melezlerde resesif bir tek gen tarafından kontrol edilirken, türler arası melezlerde de dominant tek bir gen tarafından kontrol edildiği öne sürülmüştür. Tür içi melezlerde ortaya konulan resesif dayanıklılık allelik olmayan bağımsız iki genin sonucu ortaya çıkarken, türler arası melezlerde görülen dayanıklılık bir dominant ve bir resesif gen tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir.

Sertakaya vd (2007), fitoplazma enfekteli susam ve Solanaceous bitkilerinde moleküler tanımlama ve belirleme çalışmaları yapmışlardır. Çalışma 2002-2004 yıllarında Türkiye'de yürütülmüştür. Phyllody belirtisi gösteren susam ve Cezayir menekşesi, stolbur belirtisi gösteren biber, ince ve sarı yapraklı patlıcan ve büyük tomurcuk semptomları gösteren domates bitkileri taranmıştır. *Empoasca* sp. ve *Orosius orientalis* (Matsumura) [= *albicinctus* (Distant)] türü böcekler 2003 yılında phyllody hastalıklı susam tarlalarından toplanmıştır. Susamda, Cezayir menekşesinde, biberde patlıcanda ve *O. orientalis* vektör böceğinde fitoplazma tespit edilmiş ve RFLP analizi ile 16SrVI grubu ile çok yakından ilişkili olduğunu söylemişlerdir. Domateste tespit edilen fitoplazmanın da 16SrXII grubuna ait olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışma Türkiye'de Solanaceous bitkilerinde ve susam bitkisinde fitoplazma varlığının moleküler tekniklerle belirleme ve karakterizasyonu için yapılan ilk çalışma ve rapordur.

Akhtar vd (2009), Pakistan'da susam bitkisinde phyllodynin önemli bir hastalık olduğunu belirtmişler ve hastalığın belirtileri, etiyolojisi ve taşınması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Floral virescence, phyllody ve proliferasyon en yaygın belirtileri olup; sararma, kapsüllerin çatlaması, kapsüldeki tohumların çimlenmesi kapsüllerde kararma ve bitkinin uç kısımlarının sorguç şeklini alması da görülen semptomlar arasındadır. Akhtar vd (2009) hastalıklı susam bitkilerinin 16S rDNA bölgesinden fitoplazmaya özgü 1250 bp bölgeyi PCR ile çoğaltmışlar ve çıkan PCR ürününü RFLP analizi ve sekans sonuçlarına dayanarak hastalığa sebep olan fitoplazma irkinin 16SrII-

D grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca phyllody hastalığını küsküt otu (*Cuscuta compestris*) aşılayarak ve vektör böcek (*Orosius albicinctus*) kullanarak hastalığı başarılı bir şekilde susama aktarmışlardır. Benzer bir çalışma Win vd (2010) tarafından Burma'da yapılmıştır. Araştırmacılar 2010 yılının Ocak ayında Yezin ve Naypyitaw bölgelerinde phyllody semptomlu susam bitkilerini toplamış ve etiyolojisi araştırmışlardır. PCR kullanılarak susamda phyllody hastalığı belirlenmiştir. 16S rDNA bölgesinin RFLP analizleri sonucu fitoplazmanın '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (16SrI-B) ırkı olduğunu belirlemişlerdir.

Rajeswari vd (2010), susam tohum taslağı kültürü vasıtasıyla *S.indicum* ve *S.alatum* arasında türler arası hibrit üreterek phyllody hastalığı dayanımını taramak için basit ve etkili bir protokol optimize etmiştir. *S.indicum* ve *S.alatum* melez ırkı üretiminde, embriyo alınmadan kapsül tutturulması 289 µM gibberellik asit (GA3), 80.6 µM α-naphthalene asetik asit (NAA) ve 23.3 µM kinetin içeren büyüme düzenleyicinin sprey yoluyla kullanılması ile tozlaşmadan en fazla 7 gün sonraya kadar uzatılmıştır. 8.8 µM benzylaminopurine (BAP), 2.8 µM indole asetik asit (IAA) ve 1712.3 µM glutamine içeren MS ortamında üretilmiş (kültür edilmiş) ovüller 7 günlük kapsülden temizlendiğinde organojenez direk başarıya ulaşmıştır. 0.27 µM NAA eklenmiş yarı dayanımlı MS ortamında regenerantlar kök üretmiştir. *S.alatum* x *S.indicum* hibrit bitkisi fenotipik olarak anaçlarının özellikleri bakımından orta derecededir. Elde edilen hibritlerin sera koşullarında phyllody hastalığına karşı dayanıklılığı kısmen dirençli olarak ifade edilmiştir.

İkten vd (2011), Antalya çevresindeki susam tarlalarında görülen phyllody hastalığının frekans dağılımı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Phyllody hastalığının bitkileri bodurlaştırdığını, yaprak yapısını bozduğunu ve yaprakların kıvrıklaştırdığını, meyve oluşumunu azalttığını ve bunun sonucunda önemli verim kayıplarına yol açtığını belirtmişlerdir. Bitki belirtilerinin, bitkinin değişik büyüme evrelerinde çeşitli semptomlar oluşturduğunu belirtmişlerdir. Yapılan survey sonucunda Aksu bölgesinde % 62, Boğazkent % 59, Denizyaka % 42, Beşkonak % 37, Döşemealtı % 56 oranında hastalık oluşumu gözlenmiştir. Antalya bölgesinin genelinde hastalık oluşumunun % 50'ye kadar çıkabildiği belirtilmiştir.

Manjunatha vd (2012), Hindistan'ın Karnataka bölgesinin güneyinde susamda phyllody hastalığı oluşumu üzerine 2009-2010 yıllarında çalışma yapmışlardır. Hastalık görülme oranı % 17-75 arasındadır. Semptomlara göre hastalık isimlendirilmiş ve nested PCR ile 16S rDNA çoğaltılmıştır. Bunun ardından çoğaltılan PCR ürününün RFLP analizi ve sekansı yapılmıştır. Filogenetik ağaç ve RFLP analizleri sonucunda bu bölgedeki susam phyllody hastalığı ırkı 16SrI gruba ait olduğunu belirtilmiştir.

Win vd (2012), Burma'da (Myanmar) fitoplazma hastalıkları ile ilgili moleküler analizler yapmışlardır. 2010-2011 yıllarında Burma'nın farklı bölgelerinde siyah ve yeşil mercimekte, sırık fasulye ve susamda tipik fitoplazma hastalıkları gözlemlenmiştir. Hastalık belirtisi gösteren bitkiler yaygın primerler kullanılarak PCR yapılmış ve 16S rRNA geni, ribozomal protein geni translokase protein genleri sekansları çıkarılarak analizi yapılmıştır. Yapılan bu 3 genin analizlerine dayanarak susam dâhil tüm bitkilerin '*Candidatus phytoplasma aurantifolia*' (16SII-B) grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir.

Akhtar vd (2013), susam germplazmasının phyllody hastalığına karşı tarla değerlendirmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Phyllody hastalığı Pakistan dâhil dünya genelinde susam üretimini tehdit eden başlıca bir hastalıktır. Hastalığın kontrolünde dayanıklı çeşitlerin kullanımı daha ekonomik ve kalıcı bir çözümdür. Farklı bölgelere ait dayanıklı 133 susam genotipi tarla koşullarında yoğun hastalık baskısı altında iki yıl üst üste değerlendirilmiştir. İlk yıl 3 farklı genotip yüksek derecede dayanıklı ve hasat yapana kadar hastalık belirtisi görülmemiş, 11 farklı genotip % 3.12-10 arasında dayanıklı çıkmış ve diğer genotipler % 10.71-65.12 arasında çıkmıştır. Ertesi yıl tüm genotipler ekilmiş ve hepsinde phyllody hastalık belirtisi gözlenmiş, fakat ilk yıl yüksek derecede dayanıklı çıkan 3 genotip ve dayanıklı olan bir genotip ikinci yıl % 3.25-10 oranında dayanıklı çıkmıştır.

İkten vd (2013), Antalya bölgesinde susam tarlalarında yoğun tepe kıvrıkcılaşması ve yaprak kıvrılması gibi phyllody hastalığı belirtileri gözlemlenmiştir. Hastalıklı ve sağlıklı bitkilerden alınan yaprak dokularının toplam DNA'sı çıkarılmış ve 16S rRNA bölgesinin evrensel primeri olan P1-P7 primerleri ile PCR yapılmıştır. Çıkan PCR ürünü R16F2n-R16R2 primerleri ile nested PCR yapılmıştır. Sırasıyla hastalıklı bitkilerden 1.8 kb ve 1.2 kb ürün oluşmuş, sağlıklı bitkilerde bir çoğalma oluşmamış ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Nested PCR ürünleri NCBI BLAST kullanılarak sekans ve analiz edilmiş. 1118 bp olan ürünün sekansı, peanut witches'-broom phytoplasma ırkı ile % 99 benzer çıkmıştır (Genbank erişim numarası: L33765.1). *AluI*, *BaeI*, *BfaI*, *HhaI*, *HindIII* ve *MboI* kesim enzimleri kullanılarak RFLP analizi yapılmış ve hastalığın 16SrII grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir. Bu susam ırkının Türkiye'de ilk kez bulunduğunu ve isimlendirildiğini rapor etmişlerdir.

Çatal vd (2013), Antalya bölgesinde susamda kıvrıkcılaşma, tepe uçlarının çalı süpürgesi halini alması, yaprakların küçük ve zayıf olması ve zayıf kapsül gelişimi gibi semptomlar belirlemişlerdir. Sağlıklı ve hastalıklı 10'ar bitki DNA'sı ile çıkarılmıştır. Çıkarılan DNA P1-P7 primerleri ile PCR yapılmış ve PCR ürünü doğrudan R16F2n-R16R primerleri ile nested PCR yapılmıştır. Sırasıyla hastalıklı bitkilerden 1.8 kb ve 1.2 kb ürün oluşmuş, aynı tarladan, aynı dönemde toplanan semptomsuz bitkilerde bir PCR ürünü oluşmamıştır. PCR ürünü temizlenmiş pTZ57R/T vektörüne aktarılmış ve Beckman Coulter 8000 CEQ Genetic Analysis System kullanılarak sekans edilmiştir. Sekanslar 16SrIX grubu olan '*Brassica rapa*' phyllody phytoplasma (HM559246.1) ve Iranian Almond witches'-broom phytoplasma (DQ195209.1) ırklarıyla % 99 benzerdir. Daha sonra bu örnek RFLP analizi ve sekans yapılarak kontrol edilmiş ve sonuç aynı çıkmıştır. Nihayetinde fitoplazma ırkının 16SrIX grubu olduğunu belirlemişler bu grup fitoplazmanın dünyada ve Türkiye'de ilk kez rapor edildiğini bildirmişlerdir.

İkten vd (2013), real-time PCR'ın fitoplazmaları belirlemede iyi bir alternatif olduğunu, daha hassas, daha az zaman ve yüksek otomatik kapasiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Susam bitkilerinde ve vektör böceklerde kullanılmak üzere 16SrII ve 16SrIX grubu fitoplazmaları hızlı ve hassas şekilde teşhisini ve hastalık miktarlarını belirlemede Taqman problemlerle birlikte bir Real-time PCR geliştirmişlerdir. Fitoplazma gruplarının sekansı kullanılarak 16SrII ve 16SrIX gruplarına uygun primer ve prob tasarlamışlardır. Tasarlanan primer ve problemler 16S rDNA bölgesinde 16SrII grubunda 107 bp ve 16SrIX grubunda 127 bp bölgeyi çoğaltmışlardır. Sağlıklı bitkiler ve kontrol olarak kullanılan şablonlar düşük veya hiç yükselti göstermemiştir. Real-time PCR

yöntemi hızlı, hassas, özel ve güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı, real-time PCR hastalığa karşı dayanıklı hat seçimi veya dayanıklı ıslah programında kullanışlı bir yöntemdir. Real-time PCR yöntemiyle fitoplazma taşıyan vektör böceklerde hızlı ve güvenilir şekilde belirlenmiştir.

Tseng vd (2014), Tayvan'da susamda phyllody hastalığı üzerine çalışmalar yapmışlardır. Tayvan'da Pitou Township ve Changhau Country bölgelerinde 2013 yılında susam tarlalarında phyllody ve anormal gövde yaprak kıvrılması semptomları gözlemlenmiştir. Alınan bitki örnekleri DNA'sı çıkarılmış ve P1-P7 primerleri ile PCR yapılmıştır. Ardından çıkan ürün kalıp DNA olarak kullanılmış ve R16F2n-R16R2 primerleri ile PCR yapılmıştır. Daha sonra RLFP ve sekans analizleri sonucu 16SrII-A grubuna ait fitoplazma ırkı olduğunu söylemişler ve bu çalışmanın Tayvan'da ilk olduğunu rapor etmişlerdir.

İkten vd (2014), Türkiye'de susamda phyllody hastalığının; belirtilerinin, etiyojisi, taksonomisi ve taşınması üzerine araştırmalar yapmışlardır. Hastalıklı, sağlıklı bitki örnekleri ve toplanılan böcek örnekleri DNA'sı çıkarılmış ve P1-P7 primerleri ile PCR yapılmış, ardından direk R16F2n/R2 primerleri ile nested PCR yapılmıştır. Sadece hastalıklı susam bitkileri ve böcekleri sırasıyla 1.8 kb ve 1.2 kb PCR ürünü oluşmuş ve hastaliksız bitkiler PCR ürünü vermemiştir. PCR ürünü sekansı ve RFLP analizi sonucuna göre sınıflandırarak fitoplazmaların pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) ve peanut witches'-broom (16SrII-D) gruplarına ait olduğunu belirtmişlerdir. Toplanan böcekler arasından sadece *Orosius orientalis* Matsumara'nın phyllody hastalığı taşıdığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak susamda hastalığa sebep olan fitoplazma ırklarının 16SrIX-C ve 16SrII-D gruplarına ait olduğunu ve hastalığı taşıyan vektör böceğin *O. orientalis* olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme yeri

Tarla denemeleri Antalya koşullarında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü 30°50' doğu boylamı 36°52' kuzey enleminde yer alan ve deniz seviyesinden 15 m yükseklikte olan deneme arazilerinde yürütülmüştür. Sera denemeleri ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ile Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ait seralarda yürütülmüştür.

3.1.2. Deneme yerinin toprak analiz sonuçları

Denemelerin kurulduğu, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ndeki alanın farklı yerlerinden alınan toprak örneklerinin enstitünün toprak analiz laboratuvarında yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Deneme yeri toprağının fiziksel ve kimyasal özellikleri

Toprak Analizi Sonuçları		
pH (H ₂ O)	7.8	Alkali
Kireç (%)	26.7	Çok yüksek
ECX10 ⁶ (25°)	168	Tuzsuz
Kum (%)	8	
Kil (%)	24	Siltli Killi Tın
Silt (%)	68	
Organik Madde (%)	2.1	Az
P (ppm)	31	Yüksek
K (ppm)	218	Orta
Ca (ppm)	4125	Yüksek
Mg (ppm)	376	Yüksek

Toprak analiz sonuçlarından anlaşılacağı üzere toprağın pH'sı 7.8 ile alkali toprak sınıfına girmektedir. Kireç değeri % 26.7 olup üst sınıfta yer almaktadır. Arazinin toprak yapısı milli, killi tın yapıdadır. Organik madde, % 2.1; P, 31 ppm; K, 218 ppm; Ca, 4125 ppm ve Mg, 376 ppm düzeylerindedir. Susam bitkisi belirli bir toprak isteği olmamasının yanında, drenajı iyi olan, nötr karakterli, tuz oranı yüksek olmayan ve orta yapılı topraklarda iyi yetişmektedir (Beg 1993). Dolayısıyla deneme alanının toprak yapısı ve durumu susam yetiştirilmesine oldukça elverişlidir.

3.1.3. Deneme yerinin iklim özellikleri

Antalya, Akdeniz'e kıyısı olan ve tipik Akdeniz ikliminin gözlendiği bir kenttir. Özellikle yaz döneminde sıcaklığın üst seviyede olması sıcaklık isteği fazla olan susam için son derece elverişlidir. Susamın gelişme süresi boyunca toplam 2700 °C sıcaklığa

ihtiyaç duyduğu düşünülürse (Weiss 1971), Antalya'nın sıcaklık bakımından susam yetiştiriciliğine son derece uygun olduğu görülmektedir. Bölgede susam hem ana hem de ikinci ürün olarak ekilmekte olup, ekim tarihi ana ürün ve ikinci ürün için değişmektedir. Ana ürün ekim zamanı Nisan sonu ile Mayıs başı olup, ikinci ürün ekim zamanı ise Haziran ayının içerisinde gerçekleşmektedir.

2012 yılındaki deneme 6 Haziran'da, 2013 yılındaki deneme 24 Mayıs tarihinde ekilmiştir. Ekim yapılan zaman hem sıcaklık hem de nem oranı bakımından her iki yılda uzun yılların ortalaması ile büyük benzerlik göstermektedir (Çizelge 3.2). Bu durum aynı zamanda Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim ayları için geçerli olup sıcaklık ve nem adına uç bir durum gözlenmemiştir. Ancak yağış bakımından yıllar ve uzun yıllar arasında fark olduğu gözlenmiştir. Her iki yılın maksimum ve minimum sıcaklık ortalamaları dikkate alındığında 2012 yılının maksimum ortalama sıcaklığı Ağustos ayında 30.4°C, minimum ortalama sıcaklığı ise Ekim ayında 21.8°C'dir. Bu durum 2013 yılında maksimum 29.5°C ile Ağustos ayında ve minimum 20.2°C ile Ekim ayında gözlenmiştir. Yağışların uzun yıllar ortalamasına göre yüksek olmasına rağmen, bu yağışlar susam için yetersiz kalmaktadır. Bu olumsuz durumu gidermek için gerekli sulamalar zamanında yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Araştırma yerinin bitki yetiştirme dönemine ait iklim verileri

Aylar	Sıcaklık °C			Nem (%)			Toplam Yağış (kg m ⁻²)		
	2012	2013	Uzun yıllar ortalaması*	2012	2013	Uzun yıllar ortalaması	2012	2013	Uzun yıllar ortalaması*
Mayıs	20.6	22.8	20.5	69.6	66.4	63.0	55.7	45	31.8
Haziran	26.3	25.5	25.4	63.2	63.2	59.0	0	19.3	7.9
Temmuz	30.3	28.8	28.4	52.4	54.6	56.0	0	0	3.0
Ağustos	30.4	29.5	28.2	42.8	53.8	59.0	0	0	2.4
Eylül	26.6	25.8	24.7	54.8	53.6	60.0	29.9	0	13.7
Ekim	21.8	20.2	20	64.9	43.6	61.0	205.7	104.9	78.8

Kaynak: Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü, *1954-2013 yılı ortalamaları

3.1.4. Genetik materyal

Uluslararası orijinli toplam 542 genotip bu çalışmada genetik materyal olarak kullanılmıştır. Bu genetik koleksiyon hastalık gözlem bahçesi şeklinde Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün (BATEM) Aksu/Antalya'daki deneme tarlasına 06 Haziran 2012 tarihinde ekilmiştir. Muganlı-57, Özberk-82, Göl marmara ve Uzun olmak üzere tescilli dört çeşit denemede kontrol olarak yer almıştır. Denemede kullanılan bütün genotip ve çeşitler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Araştırmada kullanılan genetik materyalin kodu ve orijini

No	Kodu	Orijini	No	Kodu	Orijini
1	ACS1	Afganistan	39	ACS44	Mısır
2	ACS2	Afganistan	40	ACS45	Mısır
3	ACS3	Afganistan	41	ACS46	Mısır
4	ACS4	Afganistan	42	ACS47	Etiyopya
5	ACS5	Afganistan	43	ACS48	Yunanistan
6	ACS6	Afganistan	44	ACS49	Yunanistan
7	ACS7	Afganistan	45	ACS50	Yunanistan
8	ACS8	Afganistan	46	ACS51	Yunanistan
9	ACS9	Afganistan	47	ACS52	Yunanistan
10	ACS10	Afganistan	48	ACS53	Yunanistan
11	ACS11	Afganistan	49	ACS54	Yunanistan
12	ACS12	Afganistan	50	ACS55	Yunanistan
13	ACS13	Afganistan	51	ACS56	Yunanistan
14	ACS14	Afganistan	52	ACS57	Yunanistan
15	ACS15	Afganistan	53	ACS58	Yunanistan
16	ACS17	Afganistan	54	ACS59	Guatemala
17	ACS18	Afganistan	55	ACS62	Hindistan
18	ACS19	Afganistan	56	ACS63	Hindistan
19	ACS20	Angola	57	ACS64	Hindistan
20	ACS21	Angola	58	ACS66	Hindistan
21	ACS22	Arjantin	59	ACS67	Hindistan, Punjab
22	ACS24	Çin	60	ACS68	Hindistan, Delhi
23	ACS25	Çin	61	ACS69	Iran
24	ACS26	Çin	62	ACS71	Iran
25	ACS27	Çin	63	ACS72	Iran
26	ACS29	Çin	64	ACS73	Iran
27	ACS30	Çin	65	ACS74	Iran
28	ACS31	Çin	66	ACS75	Iran
29	ACS32	Çin	67	ACS77	Iran
30	ACS33	Çin	68	ACS78	Iran
31	ACS34	Çin	69	ACS79	Iran
32	ACS37	Çin	70	ACS80	Iran
33	ACS38	Çin	71	ACS81	Iran
34	ACS39	Çin	72	ACS82	Iran
35	ACS40	Çin	73	ACS83	Iran
36	ACS41	Çin	74	ACS84	Iran
37	ACS42	Mısır	75	ACS85	Iran
38	ACS43	Mısır	76	ACS86	Iran

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün devamı

77	ACS87	Iran	118	ACS130	Güney Kore
78	ACS88	Iran	119	ACS131	Güney Kore
79	ACS89	Irak	120	ACS132	Güney Kore
80	ACS90	Irak	121	ACS134	Güney Kore
81	ACS91	Irak	122	ACS135	Güney Kore
82	ACS92	Irak	123	ACS136	Güney Kore
83	ACS93	Irak	124	ACS137	Güney Kore
84	ACS94	Irak	125	ACS138	Güney Kore
85	ACS95	Irak	126	ACS139	Güney Kore
86	ACS96	Irak	127	ACS140	Güney Kore
87	ACS97	Irak	128	ACS141	Güney Kore
88	ACS98	İsrail	129	ACS142	Güney Kore
89	ACS99	İsrail	130	ACS144	Fas
90	ACS100	İsrail	131	ACS145	Myanmar
91	ACS101	İsrail	132	ACS146	Myanmar
92	ACS102	İsrail	133	ACS147	Myanmar
93	ACS103	İsrail	134	ACS151	Nijerya
94	ACS104	İsrail	135	ACS152	Pakistan
95	ACS105	İsrail	136	ACS153	Pakistan
96	ACS106	İsrail	137	ACS154	Pakistan
97	ACS107	İsrail	138	ACS155	Pakistan
98	ACS108	İsrail	139	ACS156	Pakistan
99	ACS109	İsrail	140	ACS157	Pakistan
100	ACS110	İsrail	141	ACS158	Pakistan
101	ACS111	İsrail	142	ACS159	Pakistan
102	ACS 113	İsrail	143	ACS160	Pakistan
103	ACS 114	İsrail	144	ACS161	Pakistan
104	ACS115	İsrail	145	ACS162	Pakistan
105	ACS116	İsrail	146	ACS163	Pakistan
106	ACS117	İsrail	147	ACS164	Pakistan
107	ACS118	İsrail	148	ACS165	Pakistan
108	ACS119	İsrail	149	ACS166	Pakistan
109	ACS120	İsrail	150	ACS167	Pakistan
110	ACS121	İtalya	151	ACS168	Pakistan
111	ACS122	Japonya	152	ACS169	Rusya
112	ACS123	Japonya	153	ACS170	Rusya
113	ACS124	Japonya	154	ACS171	Rusya
114	ACS125	Japonya	155	ACS172	Rusya
115	ACS126	Ürdün	156	ACS173	Rusya
116	ACS127	Ürdün	157	ACS174	Rusya
117	ACS128	Kore	158	ACS175	Rusya

Çizelge 3.3'ün devamı

159	ACS176	Rusya	198	ACS219	Türkiye
160	ACS177	Rusya	199	ACS220	Türkiye
161	ACS178	Rusya	200	ACS221	Türkiye
162	ACS179	Rusya	201	ACS222	Türkiye
163	ACS180	Rusya	202	ACS223	Türkiye
164	ACS181	Rusya	203	ACS227	Türkiye
165	ACS182	Rusya	204	ACS229	Türkiye
166	ACS183	Rusya	205	ACS230	Türkiye
167	ACS184	Rusya	206	ACS231	Türkiye
168	ACS186	Rusya	207	ACS232	Türkiye
169	ACS187	Rusya	208	ACS235	Türkiye
170	ACS188	Rusya	209	ACS238	Türkiye
171	ACS189	Rusya	210	ACS239	Türkiye
172	ACS190	Rusya	211	ACS241	Türkiye
173	ACS191	Rusya	212	ACS242	Türkiye
174	ACS192	Rusya	213	ACS244	Türkiye
175	ACS194	Güney Amerika	214	ACS245	Türkiye
176	ACS195	Sri Lanka	215	ACS246	Türkiye
177	ACS196	Suriye	216	ACS247	Türkiye
178	ACS197	Suriye	217	ACS248	Türkiye
179	ACS198	Tayland	218	ACS250	Türkiye
180	ACS199	Türkiye	219	ACS251	Türkiye
181	ACS200	Türkiye	220	ACS252	Türkiye
182	ACS201	Türkiye	221	ACS253	Türkiye
183	ACS202	Türkiye	222	ACS254	Türkiye
184	ACS203	Türkiye	223	ACS255	Türkiye
185	ACS204	Türkiye	224	ACS257	Türkiye
186	ACS205	Türkiye	225	ACS258	Türkiye
187	ACS206	Türkiye	226	ACS259	Türkiye
188	ACS207	Türkiye	227	ACS260	Türkiye
189	ACS208	Türkiye	228	ACS261	Türkiye
190	ACS209	Türkiye	229	ACS262	Türkiye
191	ACS211	Türkiye	230	ACS263	Türkiye
192	ACS212	Türkiye	231	ACS265	Türkiye
193	ACS213	Türkiye	232	ACS266	Türkiye
194	ACS214	Türkiye	233	ACS267	Türkiye
195	ACS216	Türkiye	234	ACS268	Türkiye
196	ACS217	Türkiye	235	ACS269	Türkiye
197	ACS218	Türkiye	236	ACS270	Türkiye

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün devamı

237	ACS271	Türkiye	276	ACS313	Türkiye
238	ACS272	Türkiye	277	ACS314	Türkiye
239	ACS273	Türkiye	278	ACS315	Türkiye
240	ACS274	Türkiye	279	ACS316	Türkiye
241	ACS275	Türkiye	280	ACS317	Türkiye
242	ACS276	Türkiye	281	ACS318	Türkiye
243	ACS277	Türkiye	282	ACS319	Türkiye
244	ACS279	Türkiye	283	ACS320	Türkiye
245	ACS280	Türkiye	284	ACS321	Türkiye
246	ACS281	Türkiye	285	ACS322	ABD
247	ACS284	Türkiye	286	ACS323	ABD
248	ACS285	Türkiye	287	ACS325	ABD
249	ACS286	Türkiye	288	ACS326	ABD
250	ACS287	Türkiye	289	ACS327	ABD
251	ACS288	Türkiye	290	ACS339	ABD
252	ACS289	Türkiye	291	ACS340	ABD
253	ACS290	Türkiye	292	ACS341	ABD
254	ACS291	Türkiye	293	ACS342	ABD
255	ACS292	Türkiye	294	ACS343	ABD
256	ACS293	Türkiye	295	ACS345	ABD
257	ACS294	Türkiye	296	ACS348	ABD
258	ACS295	Türkiye	297	ACS349	ABD
259	ACS296	Türkiye	298	ACS351	ABD
260	ACS297	Türkiye	299	ACS353	ABD
261	ACS298	Türkiye	300	ACS354	Venezüella
262	ACS299	Türkiye	301	ACS355	Venezüella
263	ACS300	Türkiye	302	ACS356	Venezüella
264	ACS301	Türkiye	303	ACS357	Venezüella
265	ACS302	Türkiye	304	ACS362	Zaire
266	ACS303	Türkiye	305	ACS363	Türkiye
267	ACS304	Türkiye	306	ACS364	Türkiye
268	ACS305	Türkiye	307	ACS365	Türkiye
269	ACS306	Türkiye	308	ACS366	Türkiye
270	ACS307	Türkiye	309	ACS380	Türkiye
271	ACS308	Türkiye	310	ACS381	Türkiye
272	ACS309	Türkiye	311	ACS382	Türkiye
273	ACS310	Türkiye	312	ACS383	Türkiye
274	ACS311	Türkiye	313	ACS384	Türkiye
275	ACS312	Türkiye	314	ACS385	Türkiye

Çizelge 3.3'ün devamı

315	ACS386	Türkiye	354	ACS425	Türkiye
316	ACS387	Türkiye	355	ACS426	Türkiye
317	ACS388	Türkiye	356	ACS427	Türkiye
318	ACS389	Türkiye	357	ACS428	Türkiye
319	ACS390	Türkiye	358	ACS429	Türkiye
320	ACS391	Türkiye	359	ACS430	Türkiye
321	ACS392	Türkiye	360	ACS431	Türkiye
322	ACS393	Türkiye	361	ACS432	Türkiye
323	ACS394	Türkiye	362	ACS433	Türkiye
324	ACS395	Türkiye	363	ACS434	Türkiye
325	ACS396	Türkiye	364	ACS435	Türkiye
326	ACS397	Türkiye	365	ACS436	Türkiye
327	ACS398	Türkiye	366	ACS437	Türkiye
328	ACS399	Türkiye	367	ACS438	Türkiye
329	ACS400	Türkiye	368	ACS439	Türkiye
330	ACS401	Türkiye	369	ACS440	Türkiye
331	ACS402	Türkiye	370	ACS441	Türkiye
332	ACS403	Türkiye	371	ACS442	Türkiye
333	ACS404	Türkiye	372	ACS443	Türkiye
334	ACS405	Türkiye	373	ACS444	Türkiye
335	ACS406	Türkiye	374	ACS445	Türkiye
336	ACS407	Türkiye	375	ACS446	Türkiye
337	ACS408	Türkiye	376	ACS447	Türkiye
338	ACS409	Türkiye	377	ACS448	Türkiye
339	ACS410	Türkiye	378	ACS449	Türkiye
340	ACS411	Türkiye	379	ACS450	Türkiye
341	ACS412	Türkiye	380	ACS451	Türkiye
342	ACS413	Türkiye	381	ACS452	Türkiye
343	ACS414	Türkiye	382	ACS453	Türkiye
344	ACS415	Türkiye	383	ACS454	Türkiye
345	ACS416	Türkiye	384	ACS455	Türkiye
346	ACS417	Türkiye	385	ACS456	Türkiye
347	ACS418	Türkiye	386	ACS457	Türkiye
348	ACS419	Türkiye	387	ACS458	Türkiye
349	ACS420	Türkiye	388	ACS459	Türkiye
350	ACS421	Türkiye	389	ACS460	Türkiye
351	ACS422	Türkiye	390	ACS461	Türkiye
352	ACS423	Türkiye	391	ACS462	Türkiye
353	ACS424	Türkiye	392	ACS463	Türkiye

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün devamı

393	ACS464	Türkiye	432	ACS503	Türkiye
394	ACS465	Türkiye	433	ACS504	Türkiye
395	ACS466	Türkiye	434	ACS505	Türkiye
396	ACS467	Türkiye	435	ACS506	Türkiye
397	ACS468	Türkiye	436	ACS507	Türkiye
398	ACS469	Türkiye	437	ACS508	Türkiye
399	ACS470	Türkiye	438	ACS509	Türkiye
400	ACS471	Türkiye	439	ACS510	Türkiye
401	ACS472	Türkiye	440	ACS511	Türkiye
402	ACS473	Türkiye	441	ACS512	Türkiye
403	ACS474	Türkiye	442	ACS513	Türkiye
404	ACS475	Türkiye	443	ACS514	Türkiye
405	ACS476	Türkiye	444	ACS515	Türkiye
406	ACS477	Türkiye	445	ACS516	Türkiye
407	ACS478	Türkiye	446	ACS517	Türkiye
408	ACS479	Türkiye	447	ACS518	Türkiye
409	ACS480	Türkiye	448	ACS519	Türkiye
410	ACS481	Türkiye	449	ACS520	Türkiye
411	ACS482	Türkiye	450	ACS521	Türkiye
412	ACS483	Türkiye	451	ACS522	Türkiye
413	ACS484	Türkiye	452	ACS523	Türkiye
414	ACS485	Türkiye	453	ACS524	Türkiye
415	ACS486	Türkiye	454	ACS525	Türkiye
416	ACS487	Türkiye	455	ACS526	Türkiye
417	ACS488	Türkiye	456	ACS527	Türkiye
418	ACS489	Türkiye	457	ACS528	Türkiye
419	ACS490	Türkiye	458	ACS529	Türkiye
420	ACS491	Türkiye	459	ACS530	Türkiye
421	ACS492	Türkiye	460	ACS531	Türkiye
422	ACS493	Türkiye	461	ACS532	Türkiye
423	ACS494	Türkiye	462	ACS533	Türkiye
424	ACS495	Türkiye	463	ACS534	Türkiye
425	ACS496	Türkiye	464	ACS535	Türkiye
426	ACS497	Türkiye	465	ACS536	Türkiye
427	ACS498	Türkiye	466	ACS537	Türkiye
428	ACS499	Türkiye	467	ACS538	Türkiye
429	ACS500	Türkiye	468	ACS539	Türkiye
430	ACS501	Türkiye	469	ACS540	Türkiye
431	ACS502	Türkiye	470	ACS541	Türkiye

Çizelge 3.3'ün devamı

471	ACS542	Türkiye	507	ACS578	Türkiye
472	ACS543	Türkiye	508	ACS579	Türkiye
473	ACS544	Türkiye	509	ACS580	Türkiye
474	ACS545	Türkiye	510	ACS581	Türkiye
475	ACS546	Türkiye	511	ACS582	Türkiye
476	ACS547	Türkiye	512	ACS583	Türkiye
477	ACS548	Türkiye	513	ACS584	Türkiye
478	ACS549	Türkiye	514	ACS585	Türkiye
479	ACS550	Türkiye	515	ACS586	Türkiye
480	ACS551	Türkiye	516	ACS587	Türkiye
481	ACS552	Türkiye	517	ACS588	Türkiye
482	ACS553	Türkiye	518	ACS589	Türkiye
483	ACS554	Türkiye	519	ACS590	Türkiye
484	ACS555	Türkiye	520	ACS591	Türkiye
485	ACS556	Türkiye	521	ACS592	Türkiye
486	ACS557	Türkiye	522	ACS593	Türkiye
487	ACS558	Türkiye	523	ACS594	Türkiye
488	ACS559	Türkiye	524	ACS595	Türkiye
489	ACS560	Türkiye	525	ACS596	Türkiye
490	ACS561	Türkiye	526	ACS597	Türkiye
491	ACS562	Türkiye	527	ACS598	Türkiye
492	ACS563	Türkiye	528	ACS599	Türkiye
493	ACS564	Türkiye	529	ACS600	Türkiye
494	ACS565	Türkiye	530	ACS602	Türkiye
495	ACS566	Türkiye	531	ACS603	Türkiye
496	ACS567	Türkiye	532	ACS604	Türkiye
497	ACS568	Türkiye	533	ACS605	Türkiye
498	ACS569	Türkiye	534	ACS601	Türkiye
499	ACS570	Türkiye	535	ACS606	Türkiye
500	ACS571	Türkiye	536	ACS607	Türkiye
501	ACS572	Türkiye	537	ACS608	Türkiye
502	ACS573	Türkiye	538	ACS609	Türkiye
503	ACS574	Türkiye	539	Muganlı-57	Kontrol
504	ACS575	Türkiye	540	Özberk-82	Kontrol
505	ACS576	Türkiye	541	Gölmarmara	Kontrol
506	ACS577	Türkiye	542	Uzun	Kontrol

3.2. Yöntem

3.2.1. Materyalin yetiştirilmesi ve tarla şartlarında yapılan dayanıklılık gözlemleri

542 adet susam genotipinden oluşan geniş bir koleksiyon 6 Haziran 2012 tarihinde Antalya Aksu'da bulunan BATEM deneme arazisine augmented deneme deseninde ekilmiştir. Tohumlar 5 m uzunluğundaki sıralara 70 cm sıra arası ve 10 cm sıra üzeri olacak şekilde ekilmiştir (Şekil 3.1). Deneme arazisi ekimden önce bitki artıklarından temizlenmiş ve sulama yapılarak toprağın tava gelmesi sağlanmıştır. Takiben tarla pullukla sürülmüş ve dekara 6 kg N, 6 kg P₂O₅ ve 6 kg K₂O gelecek şekilde 15:15:15 kompoze gübre ile gübreleme yapılmıştır.



Şekil 3.1. Genetik materyalin ekimi ve çıkış sonrasına ait genel bir görüntüsü

Parsellerin kenarlarına ve her 10 sırada bir phyllody için iyi bir konukçu olan ve laboratuvarında phyllody ile bulaşık hale getirdiğimiz Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) şaşırtılmıştır (Şekil 3.2). Tarlada hastalık epidemisini artırmak için vektör böcek olan *Orosius orientalis* türü kontrollü şartlarda bol miktarda çoğaltılmış ve bu böcekler deneme tarlasına bitkilerin çıkışını takiben bırakılmıştır. Ayrıca çiftçi tarlalarına gidilerek vektör böcek toplanmış, deneme alanına bırakılmıştır. Aynı zamanda Aksu, Denizyaka, Boğazkent, Beşkonak ve Döşemealtı bölgelerindeki susam tarlalarından hastalıklı bitkiler saksılara aktarılmış ve deneme alanına hastalık baskısını arttırmak amacıyla şaşırtılmıştır (Şekil 3.3). Ekimden itibaren deneme alanındaki hastalık epidemisi izlenmiş ve her iki yıl 1-5 skalasına göre gözlemler alınarak, dayanıklı ve çok hassas tipler seçilmiştir (İkten 2014). 1-5 skalasının oranları aşağıda verilmiştir.

Bu skalaya göre;

1. Çok Dayanıklı (Hastalıklı bitki sayısı sıfır, % 100 sağlıklı)
2. Dayanıklı (Hastalıklı bitki oranı maksimum % 10)
3. Toleranslı (Hastalıklı bitki oranı % 11-20 arasında)
4. Hassas (Hastalıklı bitki oranı % 21-30 arasında)
5. Çok hassas (Hastalıklı bitki oranı minimum % 31)



Şekil 3.2. Epidemiyi artırmak için parsellere Cezayir menekşesi fidelerinin şaşırtılması



Şekil 3.3. Diğer tarlalardan toplanan hastalıklı bitkilerin deneme alanına şaşırtılması

1-5 skalasına göre; çok dayanıklı ve dayanıklı gözükten 238 susam genotipi seçilmiş ve 24 Mayıs 2013'de denemenin ikinci yılı olarak hastalığın yaygın bir şekilde ortaya çıktığı aynı parsellere ekilmiştir. 2013 yılında kurulan denemedeki yetiştirme şartları bir önceki yılda olduğu gibi aynı şekilde yapılmış, sadece genotip sayısı azaltıldığı için tesadüf blokları deneme deseninde iki tekerrürlü olarak kurulmuştur. Hastalık epidemisini artırmak için birinci yıl uygulanan metotlara aynen devam edilmiş ve dayanıklılık gözlemleri aynı şekilde alınmıştır. İkinci yılın sonunda da dayanıklı olarak gözlenen genotipler yoğun hastalık baskısı altında sera testlemesine alınmıştır.

3.2.2. Vektör böcek türünün belirlenmesi ve yetiştirilmesi

Antalya bölgesindeki susam tarlalarında görülen tüm böcekler vakumlu böcek toplama aleti ile toplanmıştır (Şekil 3.4). Toplanan böceklerden DNA izole edilmiş ve moleküler analizlerle hastalık taşıyan böcek türü belirlenmiştir. Vektör böcek türünün belirlenmesinden sonra, sadece vektör böcek *in vitro* yetiştirilmiş, hastalık taşımayan diğer böceklerin *in vitro* yetiştirilmesi bırakılmıştır.



Şekil 3.4. Susam tarlalarında görülen böceklerin modifiye vakum cihazı ile toplanması

Vektör böcekleri yetiştirmek için 50 cm x 50 cm x 50 cm ölçülerinde, sert plastik kenarlı ve orta kısımları tül olacak şekilde özel dizayn kafesler hazırlanmıştır. Saksılarda çimlendirilen susam bitkileri kafeslerin içine yerleştirilmiş ve vektör böcek bu kafeslere bırakılarak yetiştirilmiştir. Vektör kolonilerinin *in vitro*'da yetiştirilmesinde akamete uğramaması adına kafeslere belli aralıklarla ve sürekli olarak genç susam fideleri takviye edilmiştir. Vektör böcekler kış döneminde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü böcek yetiştirme odalarında 28 °C'de çoğaltılmıştır. Bahar ve yaz dönemlerinde ise serada yetiştirilmiştir.

Bahar döneminde daha çok böcek yetiştirmek ve aynı zamanda hastalık testlemesi yapmak üzere 1 m eninde 1.5 m boyunda ve 1 m derinliğinde tül kafesler yapılmıştır (Şekil 3.5). Tül kafesler içerisine 3 litrelik saksılara dikilmiş susam bitkileri ve phyllody hastalığının konukçusu olan cezayir menekşesi bırakılmıştır. Bitkiler 10-15 cm kadar boylandıktan sonra kafese böcekler salınmış ve çoğalması için uygun ortam olan seraya bırakılmıştır.



Şekil 3.5. Sera içerisine yerleştirilen büyük tül kafesler

3.2.3. Hastalık transfer çalışmaları

3.2.3.1. Enjeksiyon yöntemi ile hastalık aktarma çalışması

Bu yöntemde öncelikle Aksu, Boğazkent, Denizyaka, Beşkonak ve Döşemealtı bölgelerinden hastalıklı susam bitkileri toplanmıştır. Toplanan bitkiler saf su ile yıkanarak böcek ve zararlılardan arı hale getirilmiştir. Steril hale getirilen bitkiler havan yardımıyla iyice ezilerek bitki öz suyu çıkarılmıştır. Daha sonra phyllody hastalığı taşıyan bitki öz suyu sağlıklı bitkilerin gövde, dal ve yapraklarına enjekte edilmiştir (Şekil 3.6). Enjekte edilen 20 bitki numaralandırılmış ve kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alınan bitkilerden her hafta hem fenotipik gözlemler alınmış hem de DNA örnekleri alınarak hastalığın transfer olup olmadığı analiz edilmiştir.



Şekil 3.6. Enjeksiyon yöntemiyle hastalık aktarma çalışması

3.2.3.2. Aşılama yöntemiyle hastalık aktarma çalışması

Sera ortamında hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere aşılama yöntemi ile hastalık etmeni aktarılmaya çalışılmıştır. Sağlıklı bitkiler yeterli olgunluğa ulaştığında gövde bölgesinden yaklaşık 6-8 cm uzunluğunda ince bir parça uzunlamasına kesilmiştir. Hastalıklı bitkinin gövde kısmından aynı büyüklükte bir kesit alınmıştır. Hastalıklı bitkiden alınan parça, sağlıklı bitkinin uzunlamasına kesilen gövdesine tutturulmuştur. Aşılama yöntemiyle tutturulan hastalıklı bitki parçasının düşmemesi ve aşının dış ortamlardan etkilenmemesi için parafilm ile ne çok sıkı ne de çok gevşek olacak şekilde sarılmıştır (Şekil 3.7). Aşılı bitkiler sera ortamında 1 hafta boyunca düzenli olarak gözlemlenmiştir. 1 haftanın ardından aşılar tutmuştur ve parafilm gerilmeye başlamıştır. Bu dönemde parafilm alınmış ve bitkilerin yetiştirilmesine devam edilmiştir. Aşılama yapılan bitkilerden her hafta hem fenotipik gözlemler alınmış hem de DNA örnekleri alınarak hastalığın transfer olup olmadığı analiz edilmiştir.



Şekil 3.7. Aşılama yöntemiyle hastalık aktarma çalışması

3.2.3.3. Vektör böcek yardımıyla hastalık aktarma çalışması

In vitro yetiştirilen vektör böcek kolonilerinin phyllody bulaşık susam bitkileri ile zorunlu beslenmiş ve hastalık etmenini taşıması sağlanmıştır. Bu kolonilerden rastgele 10'ar böcek örneklenmiş ve DNA analizleri ile hastalık taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir. Kafesler içerisinde 12'şer susam bitkisi yetiştirilmiş ve genç dönemde iki kafese vektör böcek kolonileri bırakılmıştır. Bir kafese böcek salınmamış ve kontrol olarak bırakılmıştır (Şekil 3.8). Vektör böceklerin bırakılmasından sonra kafesin içerisindeki susam bitkilerinden düzenli olarak gözlem alınmıştır. Vektör böceklerin bırakılmasından 30 gün sonra da bitkilerden düzenli olarak haftada bir yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örneklerinin DNA'sı çıkarılmıştır. Phyllody için spesifik olan primerler yardımıyla PCR ve qPCR yapılarak hastalık transferinin olup olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Vektör böcek yardımıyla hastalık transferi

3.2.4. Sera koşullarında dayanıklılığın doğrulanması

Tarlada potansiyel dayanıklı olarak belirlenen genotipler sera ortamında vektör böcek kullanımı yoluyla daha yoğun bir hastalık epidemisi altında tekrar testlenmiştir. Testlenecek potansiyel dayanıklı genotipler 3 litrelik saksılara ekilmiş ve üzerlerine isimleri yapıştırılmıştır. Saksılara ekilen bu genotipler tül kafeslere bırakılmıştır. Her tül kafese hastalığın oluştuğunu fenotipik olarak gözlemleyebilmek amacıyla 2 tane hassas genotip ekilmiştir. Aynı zamanda her bir kafese 2 tane olmak üzere phyllody için iyi bir konukçu olan Cezayir menekşesi bırakılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Genotiplerin sera şartlarında dayanıklılık testlemeleri

Bitkiler yeterli olgunluğa ulaştıca tül kafeslerin içerisine hastalıklı bitkilerle beslenmiş vektör böcek bırakılmıştır. Hastalığın taşınması için uygun koşullar oluşturulduktan sonra düzenli olarak fenotipik gözlemler alınmıştır. Aynı şekilde yaprak örneklerinden DNA izole edilerek qPCR ile dayanıklılık seviyeleri tespit edilmiştir.

3.2.5. Moleküler analizler

3.2.5.1. DNA izolasyonu

Tarla ve seradan alınan bitki yaprak örnekleri ile böceklere ait DNA ekstraksiyonu, Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB metodu ile gerçekleştirilmiştir. 0.1 gr olarak hazırlanan örnekler 1.5 ml hacmindeki tüplere konulmuş ve tüplere 0.5 ml içerisinde binde 5 oranında merkaptolan bulunan CTAB (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, % 2 CTAB) çözelti konularak fiziksel

olarak ezilmiştir. Önceden sıcaklığı 65 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda örnekler 3 saat bekletilirken, her 15 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır. Su banyosundan çıkarılan örnekler, tampon çözeltisi ile eşit miktarda (0.5 ml) kloroform:izoamil alkol (24:1) ilave edilmiştir. Tüpler oda koşullarında çalkalayıcı yardımıyla 15 dakika boyunca hafifçe çalkalanmış ve 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerin üst fazları alınmış ve yeni 1.5 ml hacmindeki tüplere aktarılmıştır. Alınan üst faz kadar tekrar kloroform:izoamil alkol (24:1) konulmuş ve 20 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerin üst fazları tekrar alınmış ve alınan miktar kadar üzerine soğuk (önceden -20 °C'de bekletilmiş) izopropanol ilave edilerek DNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. DNA'nın daha iyi çökmesini sağlamak için 1 gece -20 °C'de bekletilmiştir. Soğuk ortamdan çıkarılan tüpler 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek DNA'nın tüpün dibine çökmesi ve izopropanolün kolayca tüpten uzaklaştırılması sağlanmıştır. İzopropanol boşaltıldıktan sonra içerisine 0.5 ml % 70'lik etanol ilave edilip 15 dakika hafifçe çalkalanmış ve DNA'nın yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra etanol boşaltılmış ve DNA'lar oda koşullarında kurutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra DNA'lar 0.1 ml ultra saf suda çözdürülmüştür. İzole edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Agaroz jel 45 dakika 60 voltta yürütülmüş ve ultraviyole ışık altında görüntüsü alınarak DNA miktarı ve kalitesi belirlenmiştir.

3.2.5.2. Doğrudan ve Nested PCR analizleri

Çıkarılan bitki ve böcek DNA'ları phyllody hastalığı için yaygın olan ve literatürde bildirilen P1-P7 (Deng ve Hiruki 1991, Smart vd 1996) primerleri ile çoğaltılmıştır. Toplam 20 µl olacak şekilde hazırlanan ana karışım bileşenleri ve oranları aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.4).

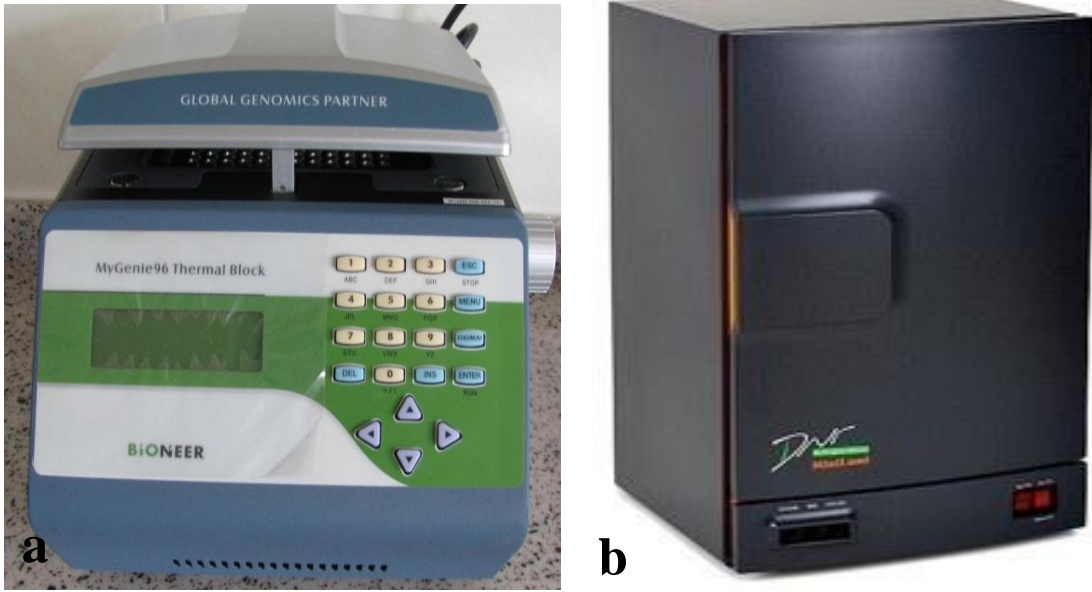
Çizelge 3.4. Doğrudan ve nested PCR'in ana karışım bileşenleri ve oranları

	Ürün Adı	Miktar(µl)	Yoğunluğu
Ana Karışım	10X buffer	2 µl	1/10
	Forward primer	1.5 µl	15 pmol
	Reverse primer	1.5 µl	15 pmol
	Taq DNA polimeraz	0.2 µl	1 Ünite
	dNTP	1.5 µl	0.2 mM
	MgCl ₂	2 µl	1.6 mM
	Template DNA	2 µl	20 ng
	ddH ₂ O	9.3 µl	
	Toplam	20 µl	

Çizelge 3.4'ten de görüleceği üzere PCR analizlerinde kullanılan ana karışım; toplam miktar 20 µl olacak şekilde 2 µl template DNA, Forward ve Reverse primerlerin her birinden 1,5 µl, 0,2 µl Taq DNA polimeraz enzimi, 1,5 µl dNTP karışımı, 2 µl 10X Buffer, 2 µl MgCl₂ ve 9.3 steril saf su şeklindedir.

Kullanılan PCR programı 94 °C’de 1 döngü (5 dk), 94 °C’ de 38 döngü (1 dk), 50 °C’ de 38 döngü (1 dk.), 72 °C’ de 38 döngü (2 dk.) ve 72 °C’ de 1 döngü (5 dakika) olarak belirlenmiştir. Yapılan her PCR da pozitif kontrol için bir tane hastalıklı bitki DNA'sı, negatif kontrol içinse bir tane sağlıklı bitki ve birde saf su kullanılmıştır. PCR uygulamaları Bioneer MyGenie96 marka PCR cihazı ile yapılmıştır (Şekil 3.10.a).

Elde edilen PCR ürünlerinin görsel olarak incelenmesinde agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jele yüklenmiş, 1 saat 60 voltta koşturulmuş ve ultraviyole ışık altında görüntülenerek analizleri yapılmıştır. 100ml 0,5X TAE (Tris-Asetat-EDTA) buffer ve 1.5 g agaroz bir beher içerisine ilave edilerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtılıp, agaroz tamamen çözüldükten sonra biraz soğuması beklenilmiş ve yaklaşık 5 µl EtBr (10 mg/ml) solüsyonu eklenmiştir. PCR ürünlerine 2 µl yükleme boyası eklenerek (bromophenylblue) toplamda 10 µl'lik PCR ürün+yükleme boyası jele yüklenmiştir. Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde üretilen PCR büyüklüğüne göre, marker olarak GeneRuler 100 bp ve 1 kb DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) kullanılmıştır. Oluşan bantlar UV ışık altında DNR-mini lumi cihazıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.10.b).



Şekil 3.10. Doğrudan ve nested PCR analizlerinde kullanılan cihazlar
a) PCR cihazı b) Jel görüntüleme cihazı

P1-P7 primerleri ile yapılan PCR ürünleri alınarak, daha özel olan R16F2n-R16R2 ve Fu5-Ru3 primer çiftleri ile tekrar PCR yapılmış ve böylece nested PCR şartları sağlanmıştır. Primer sekansları ve ürettikleri ürün uzunlukları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Kullanılan primerler, dizinleri ve boy uzunlukları

Primer Adı	Genomik Dizisi	Ürün Büyüklüğü
P1	5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3	1800 bp*
P7	5-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3	1800 bp**
R16F2n	5-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3	1239 bp***
R16R2	5-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3	1239 bp***
Fu5	5-CGGCAATGGAGGAAACT-3	880 bp***
Ru3	5-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3	880 bp***

*Deng ve Hiruki (1991); **Smart vd (1996); ***Lee vd (1995)

Nested PCR koşulları ile kullanılan PCR programı, yukarıda verilen doğrudan PCR koşul ve programı ile aynı şekilde düzenlenmiştir.

PCR ürünleri % 1.5' luk agaroz jele yüklenmiş, 1 saat 60 voltta koşturulmuş ve ultraviyole ışık altında görüntülenerek analizleri yapılmıştır. Jelde bakılan PCR ürünlerinden seçilenler jel üzerinde kesilmiş ve dizilenmek (sekans) üzere temizlenmiştir. PCR ürünü temizleme protokolü aşağıdadır.

Her örnek için 20 µl PCR ürünü için 5 µl temizleme karışımı hazırlanmıştır. 2 µl sodyum EDTA (0.1 M), 2 µl sodyum asetat (3 M), 0.25 µl poliakrilamid (10 mikrogram/ml) ve 0.75 µl steril sudan oluşan karışım hazırlanıp, 20 µl PCR ürünü ve 5 µl temizleme karışımının üzerine 60 µl % 96'lık etanol konularak +4 °C'de 10.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pelet kaybedilmeden üzerindeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Pelet iki defa 200 µl % 70'lik etanol ile 10.000 rpm de 5'er dk santrifüj edilerek yıkanmış, bu yıkamadan sonra etanol tüplerden uzaklaştırılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplerin üzerine ddH₂O su konularak doğrudan ve nested PCR ürünlerinin temizleme işlemi tamamlanmıştır. Sekanslanmaya hazır olan örnekler sekans cihazına (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System) yüklenerek sekansları yapılmıştır (Şekil 3.11.a).

3.2.5.3. Real-Time PCR (qPCR) analizleri

Real-time PCR analizleri Ikten vd'nin (2013) geliştirmiş olduğu yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qPCR'da kullanılan ana karışım bileşenleri ve oranları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.6).

Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C'de 1 döngü (5 dakika), 95 °C'de 40 döngü (60 sn), 60 °C'de 40 döngü (15 sn) olarak belirlenmiştir. qPCR çalışmaları QIAGEN Rotor-Gene Q (Corbett Rotor-Gene 6000) cihazında yapılmıştır (Şekil 3.11.b).



Şekil 3.11. Dizileme ve qPCR analizlerinde kullanılan cihazlar
a) Sekans cihazı b) Real-Time PCR cihazı

Çizelge 3.6. qPCR karışım bileşenleri ve oranı

Ürün Adı	Miktar(μ l)	Konsantrasyonu
Hazır master miks	7.5 μ l	
Housekeeping forward primer	0.5 μ l	15 pmol
Housekeeping reverse primer	0.5 μ l	15 pmol
Phyllody evrensel forward primer	0.5 μ l	15 pmol
Phyllody evrensel reverse primer	0.5 μ l	15 pmol
Housekeeping probu	0.15 μ l	15 pmol
16Sr-II probu	0.15 μ l	15 pmol
16Sr-IX probu	0.15 μ l	15 pmol
Template DNA	2 μ l	20 ng
ddH ₂ O	3.05	
Toplam	15 μ l	

4. BULGULAR

4.1. Tarla şartlarında dayanıklılık testlemeleri

Tarla şartlarında dayanıklılık testlemeleri 2012 ve 2013 yıllarına ait yetiştirme dönemlerinde iki yıl boyunca yürütülmüştür. Birinci yıl yürütülen testleme çalışmalarında tüm genetik materyal yetiştirilmiş, tarlada phyllody epidemisi sağlanmış ve susam bitkilerinde hastalık semptomları yaygın bir şekilde gözlenmiştir. Hastalık etkisi olarak bitkilerde sürgün uçlarında kontrolsüz çoğalma (Şekil 4.1), çiçeklerin döllememesi sonucu boş ve deforme susam kapsülleri (Şekil 4.2.a, b), yapraklarda sararma ve kıvrılma gibi çeşitli semptomlar görülmüştür. Özellikle bitkilerin genç sürgünlerinde yer alan büyüme uçlarında birçok sürgün oluşması ve kontrolsüz vejetatif büyüme meydana gelmiştir. İlerleyen safhalarda ise bitki yapraklarında sararma, çiçeklerde fertilite kaybı gözlenmiş ve son safhada tamamen yeşil aksamdan oluşan, tohumuz ve verimsiz bitkilerle karşılaşmıştır.



Şekil 4.1. Phyllody hastalığı sorgu oluşurması



Şekil 4.2. a) Çiçeklerin döllememesi sonucu boş ve deforme susam kapsülleri



Şekil 4.2. b) Sağlıklı ve phyllody bulaşık susam kapsül ve çiçekleri (soldan sırasıyla; sağlıklı çiçek, phyllody hastalıklı çiçek, sağlıklı kapsül, phyllody hastalıklı kapsül)

2012 yılında ekilen 29 farklı ülkeden orijin alan 542 susam genotipi tarla koşullarında 1-5 skalasına göre değerlendirilmiştir. Koleksiyonda en çok Türkiye orijinli genotipler yer almış olup 119 genotip çok dayanıklı (1) olarak skorlanmıştır. Geriye kalan 224 genotipten ise 15 genotip dayanıklı (2), 113 genotip toleranslı (3), 51 genotip hassas (4) ve 45 genotip ise çok hassas (5) olarak belirlenmiştir. Türkiye orijinli 119 genotip 2012 yılında 1 skoru almasına rağmen 2013 yılında sadece 9 genotip çok dayanıklı (1) olarak skorlanmıştır. 23 genotipten oluşan Rusya populasyonunda ise sadece 3 genotip 2012 yılında çok dayanıklı olarak gözlemlenmiştir. 2012 yılında çok dayanıklı olarak seçilen Afganistan orijinli 5 genotip, 2013 yılında da benzer şekilde çok dayanıklı olarak skorlanmıştır. İran, Irak ve Suriye'den toplam 33 genotip hastalığa dayanıklılık bakımından incelenmiş ve 2012 yılında sadece 6 genotip çok dayanıklı (1) olarak skorlanmıştır. Bu 6 genotipten sadece 1 tanesi 2013 yılında tekrar çok dayanıklı olduğu değerlendirilmiştir. 13 ABD orijinli genotipten sadece bir tanesi 2012 yılında çok dayanıklı (1) gözlenirken, 2013 yılında ise bu genotip dayanıklı (2) olarak belirlenmiştir. Mısır, Ürdün, Angola Fas, Myanmar, Nijerya ve Venezüella orijinli bazı genotipler 2012 yılında çok dayanıklı olarak gözlenmesine rağmen, bu ülkelerden hiçbir genotip 2013 yılında çok dayanıklı olarak belirlenmemiştir (Çizelge 4.1). Alınan skorlar bakımından iki yıl topluca değerlendirildiğinde 3,75 ortalama hastalık skoru ile İran orijinli genotipler en yüksek değere sahiptir. İran'ı, 3,67 ortalama ile Hindistan takip etmekte olup, Hindistan orijinli 6 genotipin tamamının 2012 yılında çok hassas (5) olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. Ülkesel orijinlere göre uluslararası susam koleksiyonunun her iki deneme yılında hastalık gözlem skorları

Ülkesel orijin	2012					Toplam Genotip	2013					Toplam Genotip
	Skora ait genotip sayısı						Skora ait genotip sayısı					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
Afganistan	5	2	2	9	0	18	5	0	0	1	0	6
Angola	1	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	1
Arjantin	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Çin	4	3	2	2	3	14	1	3	0	0	0	4
Mısır	2	1	0	1	1	5	0	1	0	0	1	2
Etiyopya	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Yunanistan	6	1	1	2	1	11	3	4	0	0	0	7
Guatemala	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Hindistan	0	0	0	0	6	6	2	2	1	0	1	6
İran	4	0	1	1	12	18	0	1	11	2	2	16
Irak	2	2	4	1	4	13	1	2	0	1	0	4
İsrail	5	2	13	2	0	22	2	1	2	0	0	5
İtalya	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Japonya	2	0	2	0	0	4	0	1	0	1	0	2

Çizelge 4.1'in devamı

Ürdün	1	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	1
Kore	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Güney Kore	5	0	5	2	0	12	1	0	2	2	1	6
Fas	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Myanmar	1	0	0	2	0	3	0	1	0	0	0	1
Nijerya	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pakistan	10	2	4	1	0	17	3	0	0	0	0	3
Rusya	3	4	13	3	0	23	2	0	0	1	1	4
Güney Amerika	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Sri Lanka	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Suriye	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Tayland	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Türkiye	120	13	113	50	46	342	9	40	48	39	28	164
ABD	1	0	6	3	3	13	0	1	0	0	0	1
Venezüella	3	0	1	0	0	4	0	0	2	0	1	3

2012 yılında oldukça kapsamlı olarak yapılan değerlendirmeler neticesinde çok dayanıklı (1) olarak değerlendirilen tüm genotipler ile dayanıklı (2) olarak değerlendirilen bazı genotipler, 2013 yılında tekrar denemeye alınarak testlenmiştir. Toplamda 237 genotipe ulaşılmış ve bunlarda 2012 yılında yapıldığı gibi aynı şekilde tarlada epidemi oluşturulmuş ve 1-5 skalasına göre skorlama yapılmıştır. Alınan gözlemler sonucunda 30 genotip çok dayanıklı (1) olarak belirlenmiştir. Bu genotiplerin listesi Çizelge 4.2'de sunulmuştur. İki yıl boyunca yürütülen tarla testlemeleri sonucunda dayanıklı bulunan bu 30 genotip sera şartlarında dayanıklılıkları bir kez daha test edilmiştir.

Çizelge 4.2. 2013 yılı gözlemleri sonucu dayanıklı olarak gözlemlenen genotipler

No	Kodu	Gözlem Değeri	No	Kodu	Gözlem Değeri	No	Kodu	Gözlem Değeri
1	ACS15	1	11	ACS142	1	21	ACS467	1
2	ACS37	1	12	ACS165	1	22	ACS487	1
3	ACS38	1	13	ACS166	1	23	ACS489	1
4	ACS55	1	14	ACS169	1	24	ACS494	1
5	ACS56	1	15	ACS365	1	25	ACS496	1
6	ACS57	1	16	ACS366	1	26	ACS503	1
7	ACS62	1	17	ACS380	1	27	ACS505	1
8	ACS67	1	18	ACS446	1	28	ACS591	1
9	ACS102	1	19	ACS453	1	29	ACS600	1
10	ACS105	1	20	ACS463	1	30	Uzun	1

4.2. Sera Koşullarında dayanıklılığının doğrulanması

2012 ve 2013 yıllarında kurulan tarla denemeleri sonrasında 30 genotip çok dayanıklı (1) olarak tespit edilmiştir. Bu genotiplerin dayanıklılığını doğrulamak adına sera koşullarında testleme işlemi yürütülmüştür. Tül kafesler içerisine konulan bu genotipler vektör böceklerle maruz bırakılarak hastalıkla bulaşık hale getirilmiş ve yaklaşık 30 gün sonra ilk hastalık belirtileri gözlemlenmiştir. Yetiştirme sezonu sonunda ise tarla koşullarında belirlenen 30 genotipten 28 tanesi sera koşullarında hassas çıkmış ve hastalık belirtileri göstermişlerdir. Buna karşın ACS38 ve ACS102 genotipleri kontrollü şartlarda gerçekleştirilen yoğun hastalık baskısı altında dayanıklı olarak seçilmiştir. ACS102 genotipinde hastalık semptomlarına rastlanmazken, ACS38’de hastalıklı bitkiler görülmekle beraber, hastalık semptomu oluşumu kontrol bitkilere göre 15 ila 30 gün sonrasında oluşmuştur.

Bu dayanıklılığı tekrar doğrulamak amacıyla bu 2 genotip ve hassas genotiplerden oluşan kontrol grubları tekrar sera koşullarında testlenmek üzere 3 tekerrür ekilmiştir. Bu genotipler 3 ayrı tül kafese konulmuş ve eşit sayıda vektör böcek (120’şer adet) kafeslere atılmıştır. Kafeslerden bir tanesine vektör böcek atılmamıştır. Daha sonra bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri doğrudan ve nested PCR ile analiz edilmiş ve fitoplazma etmenine rastlanmamıştır. Ancak yürütülen real-time PCR ile bu genotiplerin hastalık yükü taşıdığı ortaya konulmakla beraber, bu hastalık yükü bitkide hastalık semptomu ortaya çıkaracak kadar etkili olmamıştır.

4.3. Böcek türünün belirlenmesi ve yetiştirilmesi

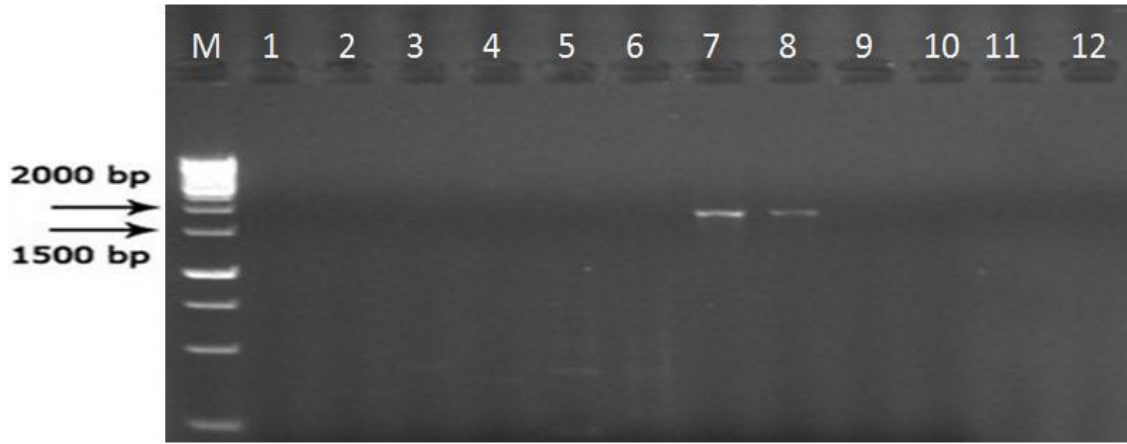
Susam tarlalarında, fitoplazma etmenini taşıyan vektör böceği belirlemek amacıyla Antalya'nın Aksu, Boğazkent, Denizyaka, Beşkonak ve Döşemealtı bölgelerinde belli aralıklarla sörvey çalışması yapılmış ve birçok böcek türü toplanmıştır. Toplanan böcek türlerinin tamamı moleküler olarak testlenmiş ve PCR pozitif olarak sadece bir böcek türü belirlenmiştir. Sörvey tarlalarından çok farklı sayıda böcek türü belirlenmesine rağmen, kesin ayırmada bulunulan türlerin listesi ile analiz sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Susam tarlalarında toplanan böcek türleri ve PCR analiz sonuçları

Böcek türü	Doğrudan PCR	Nested PCR	Real-Time PCR
<i>Empoasca decipiens</i>	-	-	-
<i>Bemisia tabaci</i>	-	-	-
<i>Orosius orientalis</i>	+	+	+
<i>Circulifer haematoceps</i>	-	-	-
<i>Hemiptera ssp</i>	-	-	-

Çizelge 4.3'te bahse konu böcek türlerinin DNA analiz sonuçları Şekil 4.3'te sunulmuştur. Toplanan böcek türlerinde DNA izolasyon işleminin ardından P1-P7 primerleri kullanılarak PCR analizi yapılmış ve PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel yürütülerek, ultraviyole ışık altında değerlendirilmiştir. Örnek olarak yürütülen Şekil

4.3'teki jel görüntüsü incelendiğinde sadece *Orosius orientalis* böcek türünde bant elde edildiği görülmekte olup, bu böcek türünün hastalık pozitif olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.3. P1-P7 primerleri ile kurulan böcek PCR ürünleri (1800 bp) jel görüntüsü (1-2: *Empoasca decipiens* 3-4: *Bemisia tabaci* 5-6: *Circulifer haematoceps* 7-8: *Orosius orientalis* 9-10: *Hemiptera ssp.* 11-12: Su)

Vektör böcek türünün moleküler olarak belirlenmesinin ardından farklı bölgelerden bu böcek türü toplanmış ve bölgelere özgü hastalık taşınma oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Çizelge 4.4'ten de görüleceği üzere en çok hastalık taşınma oranı % 35 ile Boğazkent'te gözlenmiş ve sırasıyla; % 32,8 ile Aksu, % 31,3 ile Döşemealtı, % 22,5 ile Denizyaka ve en az hastalık taşınma oranı % 20 ile Beşkonak bölgesinde belirlenmiştir. Çalışılan Antalya bölgelerinin ortalaması ise % 28,3 olarak gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı bölgelerden toplanan *Orosius orientalis* türüne ait hastalık epidemisi taşıma oranı

Bölge	Toplanan böcek sayısı	Hastalık verenler	Negatif sonuç verenler	Yüzdesi
Aksu	64	21	43	32.8
Boğazkent	40	14	26	35
Denizyaka	40	9	31	22.5
Beşkonak	35	7	28	20
Döşemealtı	48	15	33	31.3
Toplam	227	66	161	28.3

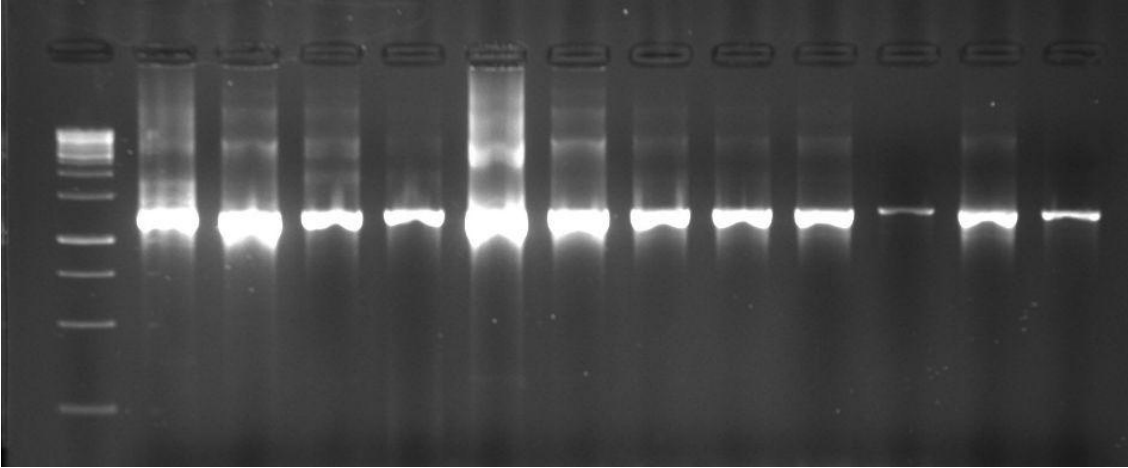
4.4. Hastalık transfer çalışmaları

Hastalığın bitkiden bitkiye transferini gerçekleştirmek amacıyla enjeksiyon ve aşılama yöntemleri vektör böcek kullanımına ilaveten çalışılmıştır. Enjeksiyon yönteminde toplam 20 bitkiye bu yöntem uygulanmış ve yetiştirme süresi boyunca fenotipik gözlemler alınmıştır. Enjeksiyon yapılan bitkilerde herhangi bir hastalık semptomu gözlenmemiş olup, moleküler olarak da pozitif sonuç elde edilememiştir.

Hastalık transfer çalışmasında kullanılan diğer bir yöntem olan aşılama yönteminde ise hastalıklı bitkilerin vejetatif aksamaları 10 sağlıklı bitkiye aşılanmıştır. Aşılamadan yaklaşık 30 gün sonra hastalık belirtileri gözlemlenmiştir. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri moleküler analizlere tabi tutulmuş ve fenotipik gözlemlerle paralel olarak pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Böylelikle hastalıklı bitkiden sağlıklı bitkiye aşılama yöntemiyle hastalık başarılı şekilde aktarılmıştır.

4.5. Doğrudan ve Nested PCR analizleri

Doğrudan ve nested PCR analizleri susamda phyllody hastalığının teşhisi amacıyla başarılı bir şekilde adapte edilmiş ve etkin ve yoğun bir şekilde bu çalışmada kullanılmıştır. Doğrudan PCR analizleri P1 ve P7 primerleri ile nested PCR analizleri ise R16F2n-R16R2 ve Fu5-Ru3 primer çiftleri ile yapılmıştır. Bu PCR analizleri ile hem susam bitkileri hem de böceklerin fitoplazma içerip içermediği belirlenebilmiştir. Hastalıklı bitkilerde doğrudan PCR ürünü olan 1800 bp'lik bant çoğunlukla elde edilmiş nested PCR aynı doğrultuda teyit etmiştir. Böceklerde ise bazı drumlarda 1800 bp'lik doğrudan PCR ürünü alınmazken, aynı örneklerde nested PCR ile 1200 bp veya 880 bp'lik ürünler elde edilmiştir. Doğal olarak böceklerdeki hastalık yükü ile susamdaki hastalık yükü kıyaslanamayacak düzeyde az olduğundan, bazı durumlarda hastalık taşıyıcılığı ancak nested PCR ile ortaya çıkarılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Fu5-Ru3 primerleri ile yapılan nested PCR jel görüntüsü

4.6. Sekans analizleri

Susam phyllody hastalığına sebep olan fitoplazmanın hangi grup ve alt gruba ait olduğunu belirlemek amacıyla sekans analizi ve sanal RFLP yapılmıştır. Bunun için PCR ürünleri temizlenmiş ve pTZ57R/T vektörüne klonlanmıştır. Ardından Beckman Coulter 8000 CEQ Genetic Analysis System cihazı kullanılarak dizileme yapılmıştır. Sekans blastları, 16SrIX grubu '*Brassica rapa*' phyllody phytoplasma (NCBI Aksesyon No: HM559246.1) ve Iranian Almond witches'-broom phytoplasma (NCBI Aksesyon No: DQ195209.1) ırkları ile peanut witches'-broom (NCBI Aksesyon No: L33765.1) (16SrII) phytoplasma ırkı gibi birçok NCBI aksesyonu ile % 99 benzer olduğu görülmüştür. Bu dizilerin sanal RFLP ile analizi neticesinde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Analizler sonrasında susamda phyllody oluşturan fitoplazmaların pigeon pea

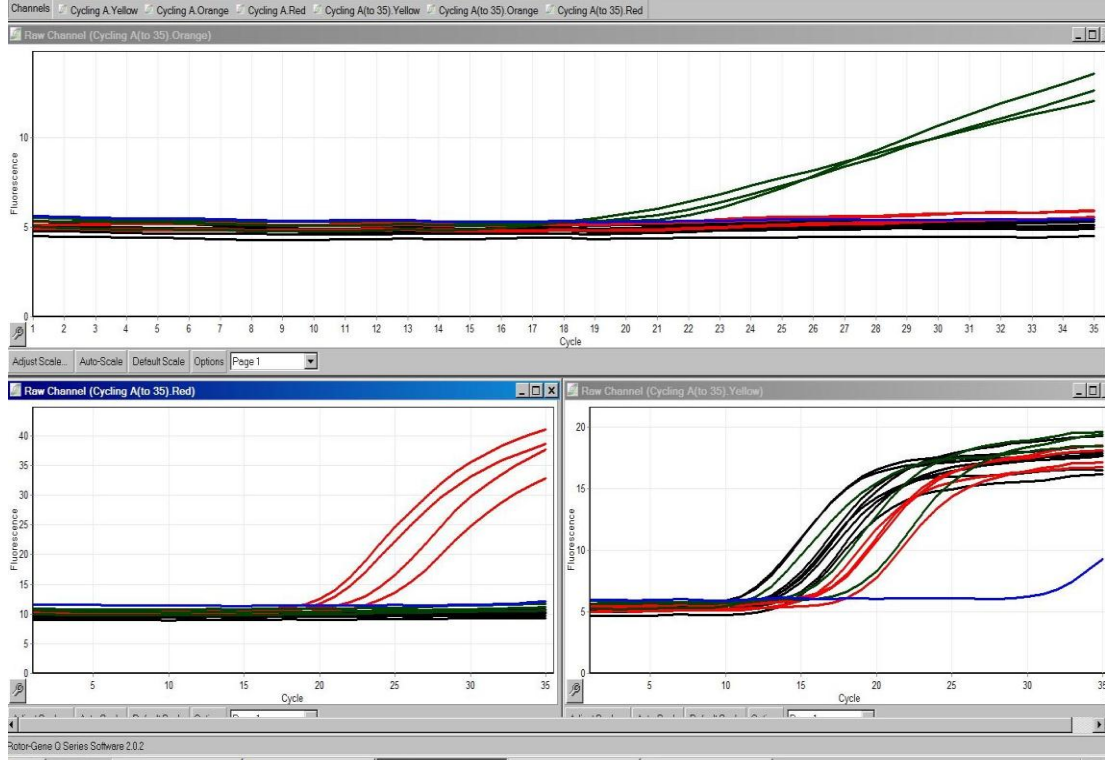
witches'-broom (16SrIX-C) ve peanut witches'-broom (16SrII-D) gruplarına ait olduğu belirlenmiş ve ilgili ırklara ait elde edilen sekanslar Ek.1 ve Ek.2'de sunulmuştur. Bu sekanslar ayrıca NCBI databankta KC139791, KC756845, KC756846, KC756847, KC756848 aksesyon numaraları ile yer almaktadır.

4.7. Real-Time PCR analizleri

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real-Time PCR veya qPCR), nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan önemli bir metottur. Bu yöntemin kullanılması ile oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılmaktadır.

Real-time PCR analizi için her iki ırka ait (16Sr-II ve 16Sr-IX) ayrı forward ve reverse primerleri ve probe dizayn edilmiştir. Aynı şekilde susam genomunu çoğaltmak için primer ve probe geliştirilmiştir. Dolayısıyla 3 kanallı bir real-time PCR metodu oluşturulmuştur. Bu geliştirilen yöntemle aynı anda hastalık türü ve miktarı belirlenmiştir. Aynı zamanda total susam genomunun miktarı belirlenip, hastalık miktarlarına oranlanarak genotiplerin hastalık yükü ortaya çıkarılmıştır.

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere raw channel orange, raw channel red ve raw channel yellow diye 3 kanal oluşturulmuştur. Pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) grubuna ait PCR ürünleri yeşil renkte, peanut witches'-broom (16SrII-D) grubuna ait fitoplazmalar kırmızı, sağlıklı bitkiler siyah ve kontrol olarak kullanılan saf su mavi renkte gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Real time PCR görüntüsü

Raw channel orange yazan üst kanalda pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) grubuna ait fitoplazma hastalığını üretmiş ve yeşil renkle gösterilmiştir. Üst kanalda görüldüğü üzere 3 tane genotip ürün üretmiş ve prob aracılığı ile yükselti vermişlerdir. Diğer hastalık grubu, sağlıklı bitkiler ve saf su hiç yükselme göstermemiş dümdüz çizgi şeklinde görülmüştür. Alt sol taraftaki kanalda ise peanut witches'-broom (16SrII-D) grubuna ait hastalık fitoplazması üretilmiştir ve kırmızı renkte gösterilmiştir. Diğer hastalık grubu, sağlıklı bitkiler ve saf suda hiç bir eğri görülmemiş dümdüz çizgi şeklinde devam etmiştir. Sağ alt taraftaki kanalda ise susam bitkisinin DNA'sı çoğaltılmıştır. Şekilde görüldüğü üzere yeşil, kırmızı ve siyah renkli olan DNA'lar susam bitkisine ait ürünlerdir. Mavi renkli olan ise saf su olup, kontrol olarak kullanılmıştır ve şekilde görüldüğü üzere yükselti vermemiştir (Şekil 4.5).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, 29 farklı ülkeden orijin alan 542 susam genotipi açık tarla koşullarında phyllody hastalığına dayanıklılık bakımından test edilmiş, seleksiyon sonucu elde edilen genetik materyal bir sonraki yıl tarlaya tekrar ekilmiş ve potansiyel dayanıklılar belirlenmiştir. Son aşamada potansiyel dayanıklılar serada saksı denemelerine alınmış ve yoğun phyllody hastalık baskısı altında dayanıklılık reaksiyonları hem morfolojik hem de moleküler olarak izlenmiştir. Bu amaca ulaşmak için susamda phyllody hastalığına neden olan fitoplazma ırkları ve hastalığın vektörü tespit edilmiş, klasik, nested ve real-time PCR uygulamaları, hastalık teşhisinde ve dayanıklıların tespitinde etkin ve başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Susamda phyllody hastalığı ile ilişkili değişik araştırmalar literatürde mevcuttur. Salehi vd (1992), susam bitkilerinde phyllody hastalığının etiyolojisi ve hastalık etmeninin taşınması üzerine yaptıkları çalışmada, phyllody hastalığının İran'da yıkıcı bir etkiye sahip olduğunu ve temel belirtilerin yapraklarda ve çiçeklerde sararma, çiçeklerde dölllenme sorunu ve kapsül oluşturmama olduğunu belirtmişlerdir. Kersting vd (1993), Türkiye'de yaptıkları çalışmada susam phyllody hastalığının ana belirtilerinin cadı süpürgesi ve virescence (yeşil pigmentin anormal gelişimi) olarak belirtmişlerdir. Akhtar vd (2009) ise, Pakistan'da susam bitkisinde phyllody hastalığının belirtileri olarak sararma, kapsüllerin açılması, kapsüldeki tohumların çimlenmesi ve kapsüllerde kararma olduğunu ifade etmişlerdir. İkten vd (2011), Antalya bölgesinde susam tarlalarındaki phyllody hastalığının frekans dağılımı üzerine yürüttüğü bir çalışmada, phyllody hastalığının bitkileri bodurlaştırdığını, yaprak yapısını bozduğunu, yaprakların kıvrıkcılaştırdığını, meyve oluşumunu azalttığını ve bunun sonucunda önemli verim kayıplarına yol açtığını belirtmişlerdir. Buna ek olarak yine Antalya ilinde yapılan diğer bir çalışmada ise Çatal vd (2013), susam tarlalarında phyllody hastalığının 2007 yılından beri artarak yayılmakta olduğunu belirtmişler ve başlıca belirtilerin; kıvrıkcılanma, tepe uçlarının çalı süpürgesi halini alması, döllenenemeyen çiçek oluşumu, yaprakların küçük ve zayıf olması olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tseng vd (2014), susam tarlalarında phyllody semptomlarının; anormal gövde, yaprak kıvrılması, tepe kısmının cadı süpürgesi halini alması ve çiçeklerin döllennememesi şeklinde gözlemlenmiştir. Gerek yurtdışında, gerekse ülkemizde susam phyllody hastalığı belirtileri üzerine yapılan birçok araştırma elde edilen morfolojik bozukluklar yönünden büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Susamda phyllody hastalığının vektörünü belirlemek amacıyla birkaç çalışma yürütülmüştür. Salehi vd (1992), hastalık vektörünü *Neoliturus haematoceps* olarak belirlemişlerdir. Esmailzadeh-Hosseini vd (2007), Yazd bölgesinde (İran) hastalığı taşıyan vektörün *Orosius albicinctus* olduğunu saptamışlardır. Pakistan'da yapılan bir çalışmada ise Akhtar vd (2009), hastalık etiyolojisi ve taşınması üzerine çalışmalar yapmışlar ve vektör böceğin ise *Orosius albicinctus* olduğunu belirtmişlerdir. Bu konudaki başka bir çalışma Hindistan'da yürütülmüş, vektör böceğin *Orosius albicinctus* olduğu ifade edilmiştir (Selvanarayanan vd 2000). Ülkemizde yapılan bir çalışmada Kersting (1993), susamda phyllody oluşumu, dağılımı ve yaprak zararlısı vektörler hakkında araştırmalar yürütmüş ve vektörün *Circulifer haematoceps* olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmaya ilaveten Adana'da yapılan bir çalışmada Başpınar vd (1993), vektör böceğin *O. orientalis* olduğunu ifade etmişlerdir. Hatay ve Adana bölgelerinde

fitoplazma enfekteli susam ve Solanace familyasına ait bitkilerde moleküler karakterizasyon ve vektör belirleme çalışmaları yapılmış (Sertakaya vd 2007), moleküler çalışmalar sonucunda vektör böceğin *Orosius orientalis* olduğu belirlenmiştir. Antalya'da yapılan çalışmada ise İkten vd (2014), susam tarlalarından birçok böcek türü toplamışlar ve toplanan böcekler arasından sadece *Orosius orientalis* Matsumara'nın fitoplazma taşıdığını belirlemişlerdir. Yukarıda sunulan literatürle uyumlu olarak *Orosius orientalis* bu tez çalışmasında da vektör böcek olarak belirlenmiştir.

Smart vd (1996), evrensel primer ile birlikte test edildiğinde fitoplazmaların teşhisinin güvenilir şekilde yapılabileceğini ifade etmişlerdir. Bu primerlerin, arazi örneklerinde belirli gruptaki fitoplazmaların teşhisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği ise yine araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada, Smart vd (1996) tarafından ortaya konan P1 ve P7 evrensel primerleri kullanılarak tüm bitki örnekleri test edilmiş ve bu primerlerin etkili şekilde çalıştığı saptanmıştır.

Günümüze kadar fitoplazmalar RFLP analizlerine göre sınıflandırılmış ve 31'den fazla grup ve 100 den fazla alt grup tespit edilmiştir (Martini ve Lee 2013). Susamda ilk sınıflandırma Umman'da susam phyllody hastalığı üzerine yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (Al-sakeiti vd 2004). Moleküler teknikler kullanılarak phyllody hastalığının varlığı tespit edilmiş, RFLP analiz tekniğiyle hastalık ırkının sınıflandırması yapılmış ve Umman'daki fitoplazma etmeninin 16SrII grubuna ait olduğu ifade edilmiştir. İran'ın Yazd bölgesinde susam phyllody üzerine yürütülen bir çalışmada hastalık etmeninin 16Sr-II grubuna ait olduğu belirtilmiştir (Esmailzadeh-Hosseini vd 2007). Aynı yıl Hindistan'da yapılan çalışmada ise moleküler analizler sonucu hastalığın 16SrI grubuna ait bir fitoplazma varlığında ortaya çıktığı saptanmıştır (Khan vd 2007). Akhtar vd (2009), Pakistan'da yaptıkları çalışmada PCR ve RFLP analizi ile sekans sonuçlarına dayanarak hastalığa sebep olan fitoplazma ırkının 16SrII grubuna ait olduğunu bildirmişlerdir. Win vd (2010), Burma'da Yezin ve Naypyitaw bölgelerinde phyllody belirtisi gösteren susam bitkilerinde araştırmalar yürütmüş ve RFLP analizleri sonucu sahip oldukları fitoplazmaların '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (16SrI-B) ırkına ait olduğunu belirlemişlerdir. Manjunatha vd (2012), Hindistan'ın Karnataka bölgesinin güneyinde 2009-2010 yıllarında susamda phyllody hastalığına neden olan fitoplazma ırkının 16SrI gruba ait olduğunu rapor etmişlerdir. Win vd (2012), Burma'da (Myanmar) fitoplazma hastalıkları ile ilgili moleküler analizler yapmışlar ve Burma'nın farklı bölgelerinde siyah ve yeşil mercimekte, sırk fasulye ve susamda tipik fitoplazma hastalıklarını gözlemlemişlerdir. Moleküler analizlere dayanarak susam dâhil tüm bitkilerin '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' (16SrII) grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir. Tseng vd (2014), Tayvan'da susamda phyllody hastalığı üzerine çalışmalar yapmışlar ve RLFP ve sekans analizleri sonucu 16SrII grubuna ait bir fitoplazma ırkının hastalığa sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Sertakaya vd (2007), fitoplazma enfekteli susam bitkilerinde moleküler karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. Yapılan çalışmada, phyllody hastalığına neden olan fitoplazma etmeninin 16SrVI grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir. İkten vd (2013), Antalya bölgesinde, susam bitkilerini etkileyen fitoplazma ırkının 16SrII grubuna ait olduğunu rapor etmişlerdir. Çatal vd (2013), benzer bölgede susamda phyllody hastalığına sebep olan etmenin 16SrIX grubuna ait

olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise doğrudan ve nested PCR yapılarak, PCR ürünleri pTZ57R/T vektörüne aktarılmış ve sekans edilmiştir. Sekanslardan bazıları 16SrIX grubu olan '*Brassica rapa*' phyllody phytoplasma (HM559246.1) ve Iranian Almond witches'-broom phytoplasma (DQ195209.1) ırklarıyla % 99 benzerlik göstermiştir. Bazıları ise peanut witches'-broom phytoplasma ırkı ile % 99'lük benzerliğe sahiptir. PCR ürünü sekansı ve sanal RFLP analizi sonucuna göre fitoplazmaların pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) ve peanut witches'-broom (16SrII-D) gruplarına ait olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucu belirlenen hastalık ırkı 16SrII, Ummandaki Al-sakeiti vd (2004), İran'daki Esmailzadeh-Hosseini vd (2007), Pakistan'daki Akhtar vd (2009), Burma'daki Win vd (2012), Tayvan'daki Tseng vd (2014), ve Türkiye'deki İkten vd (2013) tarafından elde edilen gruplar ile bire bir benzerdir. 16SrIX ırkı ise Çatal vd (2013)'teki çalışmamızda gösterdiğimiz üzere ülkemizde ve dünyada ilk rapor olarak literatüre geçmiştir.

Bu çalışmada, real time PCR metodu susamlarda phyllody hastalık grubu ve bitkinin hastalık yükünü belirlemede hızlı ve pratik şekilde ilk kez kullanılmıştır. Bu yöntem sayesinde hassas, toleranslı ve dayanıklı genotipler kolay bir biçimde ayırt edilebilmiştir. Normal klasik PCR yöntemi uzun sürmekte ve hastalık ırkı ile hastalık yükü belirlemede yetersiz kalmaktadır. Buna karşılık real-time PCR yöntemi hızlı ve pratik şekilde hastalık ırkı ve miktarı bakımından sonuç vermektedir. Real-time malzemelerinin pahalı olması ise bu yöntemin dezavantajıdır. Gori vd (2007), üzüm fitoplazma çalışmalarında real-time PCR metodunu kullanmışlardır. Flavescence dorée (FD) ve Bois noir (BN) fitoplazma hastalıklarını real-time metodu kullanarak hızlı ve pratik yolla ayırmışlardır. Pelletier vd (2009), üzümlerde hastalık yapan 16SrV ve 16SrXII fitoplazma ırklarını real-time PCR yöntemiyle hızlı ve pratik bir şekilde ayırt etmişlerdir. Susamda phyllody hastalığının tanısı, grubu ve yükünün belirlenmesinde real-time PCR protokolünün geliştirilmesi, bu tez çalışmasının da bir parçası olduğu 1110027 numaralı TÜBİTAK-COST projesi kapsamında gerçekleştirilmiş bulunmaktadır. Geliştirilen real time PCR (qPCR) yöntemi, potansiyel dayanıklı olarak belirlenen genotiplerin dayanıklılığı ve dayanıklılık seviyelerinin tespit edilmesinde kullanılmıştır. 542 susam genotipiyle başlanarak iki yıl süreyle tarlada hastalığa karşı dayanıklılık aranmış ve tarla çalışmalarında potansiyel olarak 20 dayanıklı genotip belirlenmiştir. Serada yoğun hastalık baskısı altında bire bir bir kez daha test edilen bu 20 genotipten elde edilen morfolojik gözlemler ve qPCR sonuçları, 542 genotipli uluslararası susam koleksiyonundan 2 genotipin dayanıklı olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ

Günümüzde phyllody hastalığının susam tarlalarındaki varlığı üretimi önemli düzeyde azaltan bir etkiye sahiptir (Uzun 2010). Susamda bu hastalığa karşı mücadele için değişik kültürel tedbirler kullanılabilir. Fitoplazma hastalığının semptomları, belirli antibiyotik uygulamaları ile hafifletilebilir veya ertelenebilir. Fakat bu yaklaşım genellikle uygulanmaz. Bitkiler bu yöntemle gerçekte tedavi edilmez, tedavi uygulamalarına son verildiği zaman bitkilerde tekrar semptomlar ortaya çıkar. Fitoplazma hastalığından korunabilmenin en güvenilir yolu, dayanıklı bitki çeşitlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesidir. Hastalığın kontrolünde; bitkilerin fitoplazmadan arı olarak üretilmesi, yabancı ot konukçularının yok edilmesi, semptomlu bitkilerin yok edilmesi, hastalıklı alanlara yakın yerlere hassas bitkilerin ekiminden kaçınılması, bitkilerde vektör kontrolü yapılması, erken sezonda yabancı ot kontrolü yapılması ve hastalığa daha dayanıklı bitki çeşitleri kullanılması önerilmektedir (Welliwer 1999). Bu yöntemler içersinde en etkin, kullanışlı ve çevreci yöntemin dayanıklı çeşit kullanımı olduğu bilinmektedir. Susamda phyllody hastalığını oluşturan fitoplazmalara karşı dayanıklılık kaynağı belirlenmesinin ana hedef olduğu bu tezde, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Fitoplazmaların belirlenmesinde moleküler yöntemler tüm dünyada kullanılan en güvenilir yöntem olarak bildirilmektedir (Jarausch 2000). Uygun nükleik asit izolasyon yöntemleriyle bitkiden elde edilecek DNA'nın uygun primerlerle PCR'ı ve daha sonra bu PCR ürünlerinden uygun restrüksiyon endonükleaz enzimleriyle yapılacak kesimi sonrası elde edilecek RFLP sonuçları etmen fitoplazmaların belirlenmesinde kullanılabilir sonuç vermektedir. Bu çalışmada susam fitoplazmalarının teşhis ve sınıflandırılmasında klasik, nested ve real-time PCR ile sanal RFLP analizi etkin olarak kullanılmış ve susam bitkisine adapte edilmiştir. Bu yöntemlerden en hızlı ve pratik olanı real-time PCR olarak belirlenmiştir.
2. Moleküler analizler sonucunda *Orosius orientalis* türü böceğin bünyesinde fitoplazma hastalığı varlığı tespit edilmiştir. Fitoplazmanın bünyede tespit edilmesiyle, böceğin vektör olacağı anlamı çıkmamaktadır. Bu nedenle, ilerleyen aşamalarda yapılan hastalık transfer çalışmalarında, bu böcek türü kullanılarak sağlıklı susam bitkilerine hastalığın transferi yapılmıştır. Kontrollü şartlarda sadece böcek kullanılarak sağlıklı susam bitkilerinde phyllody hastalığının oluşturulması, bu hastalığın vektörünün *Orosius orientalis* türü böcek olduğunu göstermiştir.
3. Yine hastalık transfer çalışmalarında hastalıklı bitkiden sağlıklı bitkiye, bitki dokusu aşılama suretiyle hastalık transferi sağlanmıştır. Bununla birlikte hastalıklı bitki öz suyunun sağlıklı bitkilere enjeksiyonunda olumlu sonuç alınmamıştır.

4. Yapılan moleküler analizler sonucunda hastalık etmenlerinin ırkları belirlenmiştir. Fitoplazmaların pigeon pea witches'-broom (16SrIX-C) ve peanut witches'-broom (16SrII-D) gruplarına ait olduğu belirlenmiştir.
5. İki yıl tarla koşullarında ve yaklaşık bir yıl süre ile sera şartlarında yürütülen dayanıklılık çalışmaları neticesinde, testlenen 542 genotipten sadece ACS38 ve ACS102 nolu genotipler dayanıklı olarak belirlenmiştir.

7. 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.
- AKHTAR, K.P., SARWAR, G., SARWAR, N. and ELAHI, M.T. 2013. Field evaluation of sesame germplasm against sesame phyllody disease. *Pakistan Journal of Botany*, 45(3): 1085-1090
- AKHTAR, K.P., SARWAR, G., DICKINSON, M., AHMAD, M., HAQ, M.A. and HAMEED, S., IQBAL, M.J. 2009. Sesame phyllody disease: symptomatology, etiology and transmission in Pakistan. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 5: 477-486.
- AL-SAKEITI, M.A., AL-SUBHI, A.M., AL-SAADY, N.A. and DEADMAN, M.L. 2005. First report of witches'-broom disease of sesame (*Sesamum indicum*) in Oman. *Plant Disease*, 89: 530.
- ASHRI, A. 1989. Oil crops of the world: Their breeding and utilization. In: G. Göbbelen, R.K. Downey, A. Ashri (Editors), Mc Graw-Hill Pub. Company, USA, 522 p.
- BASPINAR, H., KORKMAZ, S., ONELGE, N., CINAR, A., UYGUN, N. and KERSTING, U. 1993. Studies on citrus stubborn disease pathogen and sesame phyllody MLO and their associated leafhopper vectors in sesame. *Journal of Turkish Phytopathology*, 1: 1-8.
- BAYDAR, H., ve TURGUT, I. 2000. Susam (*Sesamum indicum* L.) genetiği ve ıslahı üzerinde araştırmalar I. Bitki tipini belirleyen özelliklerin kalıtımı. *Turkish Journal of Biology*, 24(3): 503-512.
- BAYDAR, H., TURGUT, I. and TURGUT, K. 1999. Variation of certain characters and line selection for yield, oil, oleic and linoleic acids in the Turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) Populations. *Turkish Journal of Agriculture Forestry*, 23: 431-441.
- BEG, A. 1993. Status and potential of some oilseed crops in the WANA region, Aleppo. ICARDA, 38p.
- BERTACCINI, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673-689.
- CATAL, M., İKTEN, C., YOL, E., USTUN, R. and UZUN, B. 2013. First report of a 16SrIX group (pigeon pea witches'-broom) phytoplasma associated with sesame phyllody in Turkey. *Plant Disease*, 97: 835.

- CHEN, P.R., CHIEN, K.L., SU, T.C., CHANG, C.J., LIU, T.L., CHENG, H. and TSAI, C. 2005. Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. *Nutrition Research*, 25: 559-567.
- 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.
- DENG, S. and HIRUKI, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.
- DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K. and ASUYAMA, H. 1967. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches broom, aster yellows of pawlownia witches broom. *Ann. Phytopath Soc. Japan*, 33: 259-266.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- ESMAILZADEH-HOSSEINI, S.A., MIRZAIE, A., JAFARI-NODOOSHAN, A. and RAHIMIAN, H. 2007. The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by *Orosius albicinctus* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, 2: 33-34.
- FAO. 2012. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (FAO). [Son erişim tarihi: 04.03.2014]
- FRANK, J. 2005. Beyond vitamin E supplementation: An alternative strategy to improve vitamin E status. *Journal of Plant Physiology*, 162: 834-843.
- GUNDERSEN, D.E. and LEE, I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- IKTEN, C., CATAL, M., YOL, E., USTUN, R. and UZUN, B. 2014. Molecular identification, characterization and transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Turkey. *European Journal Plant Pathology*, 139: 217-229.
- IKTEN, C., YOL, E., CATAL, M., USTUN, R. and UZUN, B. 2013. Molecular diagnosis of peanut witches'-broom group (16SrII) phytoplasma infecting sesame in Turkey. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 28-47.
- IKTEN, C., YOL, E., CATAL, M. and UZUN, B. 2011. Frequency distribution of sesame phyllody disease associated with phytoplasmas in Antalya province of Turkey. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1: 101-102.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. 'Candidatus Phytoplasma' a taxon for the wall-less, non-helical

prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1243-1255.

- JARAUSCH, W., SAILLARD, C., HELLIOT, B., GARNIER, M. and DOSBA, F. 2000. Genetic variability of Apple Proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a nonribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes*, 14: 17-24.
- KAPADIA, G.J., AZUINE, M.A., TOKUDA, H., TAKASAKI, M., MUKAINAKA, T., KONOSHIMA, T. and NISHINO, H. 2002. Chemopreventive effect of resveratrol, sesamol, sesame oil and sunflower oil in the epstein-barr virus early antigen activation assay and the mouse skin two-stage carcinogenesis. *Pharmacological Research*, 45: 500-505.
- KAUR, I.P. and SAINI, A. 2000. Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity. *Mutation Research*, 470: 71-76.
- KERSTING, U. 1993. Symptomatology, etiology and transmission of sesame phyllody in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 22: 47-54.
- KHAN, M.S., RAJ, S.K. and SNEHI, S.K. 2007. First report of 'Candidatus phytoplasma asteris' affecting sesame cultivation in India. *Journal of Plant Pathology*, 89: 301-305.
- KOBAYASHI, T. 1981. The type classification of cultivated sesame based on genetic characters. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 29: 86-89.
- LEFORT, F., LALLY, M., THAMPSON, D. and DOUGLAD, G.C. 1998. Morphological traits mikrosatellite fingerprinting and genetic relatedness a standard of elite oaks (*Q. rubur*) at Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 5-6.
- LEE, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E. and BERTACCINI, A. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88: 1359-1366.
- LEE, I.M., HAMMOND, R.W., DAVIS, R.E. and GUNDERSEN, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16SrDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- MANJUNATHA, N., PRAMEELA, H.A., RANGASWAMY, K.T., PALANNA, K.B. and WICKRAMAARACGCHI, W.A.R.T. 2012. Phyllody phytoplasma infecting sesame (*Sesamum indicum* L.) in south India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2: 29-32
- MARTINI, M. and LEE, I.M. 2013. PCR and RFLP analyses based on the ribosomal protein operon. *Methods in Molecular Biology*, 938: 173-188.
- PARANI, M., SINGH, K.N., RANGASWAMY, S., RAMALINGAM, R.S. and RANGASWAMY, S. 1996. Identification of *Sesamum alatum* x *Sesamum*

indicum hybrid using protein, isozyme and RAPD markers. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 57(4): 381-388.

- RAJESWARI, S., THIRUVENGADAM, V. and RAMASWAMY, N.M. 2010. Production of interspecific hybrids between *Sesamum alatum* Thonn and *Sesamum indicum* L. through ovule culture and screening for phyllody disease resistance. *South African Journal of Botany*, 76: 252-258.
- SALEHI, M. and IZADPANA, K. 1992. Etiology and transmission of sesame phyllody in Iran. *Journal of Phytopathology*, 135: 37-47.
- SCHNEIDER, B., AHRENS, U., KIRKPATRICK, B.C. and SEEMULLER, E. 1993. Classification of plant-pathogenic Mycoplasma-like Organisms using restriction site analysis of PCR amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139: 519-527.
- SEEMULLER, E., GARNIER, M. and SCHNEIDER, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: Razin S., Herrmann R. (Editors), *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, London, UK, 91-116 p.
- SELVANARAYANAN, V. and SELVAMUTHUKUMARAN, T. 2000. Field resistance of sesame cultivars against phyllody disease transmitted by *Orosius albicinctus* Distant. *Sesame and Safflower Newsletter*, 15: 71-75.
- SERTKAYA, G., MARTINI, M., MUSETTI, R. and OSLER, R. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60: 141-142.
- SINGH, P.K., AKRAM, M., VAJPEYI, M., SRIVASTAVA, R.L., KUMAR, K. and NARESH, R. 2007. Screening and development of resistant sesame varieties against phytoplasma. *Bulletin of Insectology*, 60 (2): 303-304.
- SINGH, K.B. and CHAUDHARY, B.D. 1977. *Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis*. Kalyani Publishers, New Delhi-India.
- SMART, C.D., SCHNEIDER, B., BLOMQUIST, C.L., GUERRA, L.J., HARRISON, N.A. and AHRENS, U. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2988-2993.
- TUİK, 2013. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (TUİK). [Son erişim tarihi: 04.03.2014]
- TSENG, Y.W., DENG, W.L., CHANG, C.J., HUANG, J.W. and JAN, F.J. 2014. First Report on the Association of a 16SrII-A Phytoplasma with Sesame (*Sesamum indicum* L.) Exhibiting Abnormal Stem Curling and Phyllody in Taiwan. *The American Phytopathological Society*, 98(7): 990.

- UZUN, B. 2010. Sesame cultivation and use in Turkey. In: Sesame: The Genus *Sesamum*, D. Bedigian (Editor). CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 349-365, Boca Raton.
- UZUN, B., ARSLAN, Ç. and FURAT, S. 2008. Variation in fatty acid compositions, oil content and oil yield in a germplasm collection of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 85: 1135-1142.
- UZUN, B., ARSLAN, Ç., KARHAN, M. and TOKER, C. 2007. Fat and fatty acids of the white lupin (*Lupinus albus* L.) in comparison to Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Food Chemistry*, 102: 45-49.
- VIDHYASEKARAN, P. 2004. Concise Encyclopedia of Plant Pathology: Phytoplasmas and Spiroplasmas. In: Amarjit, S.B. Vidhyasekaran, P. and Manjit, S.K. (Editors). The Haworth Press, USA, 99 p.
- WEISS, E.A. 1983. Sesame. Oilseed Crops. Longman, Londra, 282-340 p.
- WEI, W., DAVIS, R.E., LEE, I.M. and ZHAO, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1855-1867.
- WEI, W., LEE, I.M., DAVIS, R.E., SUO, X. and ZHAO, Y. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2368-2377.
- WELLIVER, R. 1999. Diseases Caused by Phytoplasmas. *Regulatory Horticulture, Plant Pathology* 25(1), Circular No: 82: 17-22.
- WIN, N.K.K., BACK, C.G. and JUNG, H.Y. 2010. Phyllody phytoplasma infecting Sesame (*Sesamum indicum*) in Myanmar. *Tropical Plant Pathology*, 35: 310-313.
- WIN, N.K.K. and JUNG, H.Y. 2012. Molecular analysis of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' associated with phytoplasma diseases in Myanmar. *J. Gen. Plant Pathology*, 78: 260-263.
- WOESE, C.R., MANILOFF, J. and ZABLEN, L.B. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 494-498.
- YOSHIDA, H. and TAKAGI, S. 1997. Effects of seed roasting temperature and time on quality characteristics of sesame (*Sesamum indicum* L.) oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75: 19-26.
- ZHAO, Y., WEI, W., LEE, I.M., SHAO, J., SUO, X. and DAVIS, R.E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, PhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma

group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2582-2593.

8. EKLER

EK-1. 16SrIX-C phytoplasmasına ait örnek sekans

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATTAACGCTGGCGGCGCGCCTAATACATGC
AAGTCGAACGGAAACCTTCGGGTTTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
AAGCAACCTGCCTTTAAGACGTGGATAACAATTGGAAACAGTTGCTAAGAC
AGGATAGGAAATTAAGAGGCATCTTTTAATTTTTAAAAGACCTTTTTTCGAAA
GGTATACTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTAAGGTAAAG
GCTTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTGGAACAGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTT
TTGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCGACGTCGCGTGAACAATGAAGTA
CTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAAAAGAAAAAATAGTGGAAAACT
ATCTTGACATTATCAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACATAAGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGT
GCGTAGGCGGTTTGATAAGTCTATAGTTTTAAATGCAGTGCTTAACGCTGTAG
CGCTATAGAACTGTCTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCCAT
GTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGC
GGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTC
GGGTTTCGGCTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGT
ACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACCCCGCACAAGCGG
TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGA
CATAATTTGCGACATTATAGAAATATAATGAAGGTTATCAGAATTACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAA
ACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAGTTGCGACCACGTAATGGTGAGCACTTTAG
CGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGA
GTAGCTACAACGTGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGG
ATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGA
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA
AACCACGAAAGTTGATAATACCCGAAAGCGGTCGCCTAACTTCGTCAGAAG
AGGGAGCCGTCTAAGGTAGGATCGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGT
ATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAACATAGA
TCATCATCTTCAGTTTTGAAAGACTTAGTTAGGTTTTTCTAATTTGAAAACCTT
AGTTAAGTTTTTCTCATTTCTTTTATTTTTTGGTATCCTGGGCCTATAGCCAG
TTGGTTAGAGCACACGCCTGATAAGCGTGAGGTGCGGTGGTTCAAGTCATTTA
GGCCACCAAACGTTTTGCTAAAAAAAACGTGTTATCAAAAAAATTCTTT
GAAAAGTAGATAAACAAGAAAACAATAGCCATTTTTAAAGGAAGAAGGGC
GTACAGTGGATGCCTTGGCACTAAGAGCCGATGAAGGACGA

EK-2. 16SrII-D phytoplasmasına ait örnek sekans

AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATTAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG
CAAGTCGAACGGAAACCTTCGGGTTTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG
TAAGCAACCTACCCTAAAGACGAGGATAACCATTGGAAACAGTGGCTAAGA
CTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTAAT
AGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATG
GCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTT
TCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAATGACGAAGTA
CTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCA
TTTGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGC
CGCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGTAAATGTCAACGCTTAACGTTGT
CCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGGAAATTC
ATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGG
CGGCTCGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGT
CGGGTTAAACCGGTAAGTAAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGT
ACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG
TGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGA
CATGTTTTTGCAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAA
AACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTA
ACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAG
CATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAG
GGTAGCTGAAACGCAAGTTCCTTGGCCAATCCCCAAAACAGTCCCAGTCCG
GATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCG
AATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTC
AAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAACGGTAGCCTAACTCGTTTATTC
GAGAGGGCGCCGTCTAAGGTAGGGTCGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAA
GGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAACCA
ATAAAATCAATCATCTTCAGTTTTGAAAGACTTAGGCAACTAAGTTTTTCTT
CGTGACTTCACGAAGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCTGAT
AAGCGTGAGGTTCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCAGAGTTATAGGT
TTCGTAAGAACACAAATCTTTGAAAATTAGGTAAATAATAGTTATTTATCC
GGAACATTAAAGGAAATAAGAGCGCACAGTGGATGCCTAGGCACCAAGAG
CCGATGAAGGACG

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Muğla ilinin Fethiye ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Fethiye'de, lise öğrenimini ise Burdur'da tamamladı. 2004 yılında başladığı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Programı Lisans öğrenimini, 2009 yılında tamamladı. 2009-2010 yılları arasında askerlik görevini yedek subay olarak İzmir'de tamamladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda başladı. 2013 yılı Aralık ayında ÖYP kapsamında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne araştırma görevlisi olarak atanmış ve görevine devam etmektedir. Uluslararası tanınırlığı olan bilimsel dergilerde yayınlanmış toplam 4 adet makalesi bulunmaktadır.