



***Erwinia amylovora*'YA DAYANIKLI ELMA ÇEŞİTLERİNİ
VE GENOTİPLERİNİ BELİRLEYEBİLMEK İÇİN ERKEN
SELEKSİYONA OLANAK SAĞLAYACAK
BİR BELİRTEÇ TESPİTİ ÇALIŞMASI**

Şahin KAYA

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Emine ORHAN
2018
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Erwinia amylovora*'YA DAYANIKLI ELMA
ÇEŞİTLERİNİ VE GENOTİPLERİNİ
BELİRLEYEBİLMEK İÇİN ERKEN
SELEKSİYONA OLANAK SAĞLAYACAK BİR
BELİRTEÇ TESPİTİ ÇALIŞMASI**

Şahin KAYA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Erwinia amylovora*'YA DAYANIKLI ELMA ÇEŞİTLERİNİ VE GENOTİPLERİNİ
BELİRLEYEBİLMEK İÇİN ERKEN SELEKSİYONA OLANAK SAĞLAYACAK BİR
BELİRTEÇ TESPİTİ ÇALIŞMASI**

Doç. Dr. Emine ORHAN danışmanlığında, Şahin KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 22/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3./3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun **12...** / **07...** / **2018...** tarih ve **28...** / **28...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Erwinia amylovora*'YA DAYANIKLI ELMA ÇEŞİTLERİNİ VE GENOTİPLERİNİ BELİRLEYEBİLMEK İÇİN ERKEN SELEKSİYONA OLANAK SAĞLAYACAK BİR BELİRTEÇ TESPİTİ ÇALIŞMASI**

Şahin KAYA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine ORHAN

Doğal populasyonlardaki genetik çeşitlilikten yararlanarak dayanıklı çeşit ve genotiplerin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilen seleksiyon ıslahı, genetik kaynak zenginliği olan bölgelerde etkin biçimde kullanılan bir ıslah yöntemidir. Özellikle son yıllarda önem kazanmaya başlamış olan markör destekli seleksiyon (MAS=Marker Assisted Selection) çalışmalarının klasik bitki ıslahı yöntemlerinden olan seleksiyon çalışmalarına bir hız ve etkinlik kazandırdığı bilinmektedir. Bir ön çalışma olarak planlanan bu çalışmada, *Erwinia amylovora* etmeninin neden olduğu ateş yanıklığı hastalığına karşı dayanıklı olan elma çeşitlerini ve genotiplerini erkenden belirleyebilecek moleküler belirteçleri tespit etmek amaçlanmıştır.

Bunun için, Ateş Yanıklığı'na dayanıklılık ile ilgili olduğu tespit edilmiş olan RLP1 gen dizisinden yararlanılmıştır. Bu gen dizisinden dizayn edilen primer çiftleri dokuz elma çeşidinde taranmıştır. E1F/1R ve E2F/2R primer çiftleri ile 'Kaşel37' ve 'Galaxy Gala' elma çeşitlerinin 'Gala', 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' çeşitlerinden ayırt edilebileği ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan, E2F/3R primer çiftine ait jel görüntüsünde, 'Gala', 'Kaşel37' ve 'Galaxy Gala' elma çeşitlerinin 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' elma çeşitlerinden ayırt edilebileceğine yönelik bir bilgi elde edilmiştir. Sonuç olarak; çalışmada kullanılan E1F/1R, E2F/2R ve E2F/3R primer çiftlerinin *Erwinia amylovora* etmeninin neden olduğu ateş yanıklığı hastalığına dayanıklılık yada hassasiyet gösteren elma çeşitlerini ve genotiplerini ayırt etmede kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

2018, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Malus*, Ateş Yanıklığı, Moleküler Belirteç

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A MOLECULAR MARKER IDENTIFICATION STUDY TO ALLOW EARLY SELECTION TO IDENTIFY APPLE VARIETIES AND GENOTYPES RESISTANT TO *Erwinia amylovora*

Şahin KAYA

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Department of Herbal Biotechnology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine ORHAN

The selection breeding in the form of determination of resistant varieties and genotypes by utilizing the genetic variability in the natural populations is a breeding method that is used effectively in areas with genetic resource richness. Marker Assisted Selection (MAS) studies, which have gained importance especially in recent years, have given speed and efficiency to the selection studies which are among the classical plant breeding methods. In this study which is planned as a preliminary study, it was aimed to identify molecular markers that could identify early on for apple varieties and genotypes that were resistant to the fire blight disease caused by *Erwinia amylovora*.

For this, the RLP1 gene sequence which has been found to be related to fire blight, has been utilized. The primer pairs designed from this gene sequence were screened in nine apple varieties. With E1F/1R and E2F/2R primer pairs, 'Kaşel37' and 'Galaxy Gala' apple varieties can be distinguished from 'Gala', 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' varieties. On the other hand, in the gel image of the E2F/3R primer pair, it has been learned that the varieties of 'Gala', 'Kaşel37' and 'Galaxy Gala' apples can be distinguished from 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' apple varieties. As a result; the E1F/1R, E2F/2R and E2F/3R primer pairs used in the study, may be used to discriminate apple varieties and genotypes that exhibit resistance/susceptibility to fire fever.

2018, 49 pages

Anahtar Kelimeler: *Malus*, Fire Blight, Molecular Marker

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasından yazılmasına kadar geçen süreç içerisinde desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile devamlı yönlendiren, eğitimim boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Emine ORHAN’a teşekkür eder, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamda kullandığım elma örneklerini temin etmiş olduğum Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü elma koleksiyon bahçesi tesisinde önemli katkıları olan Prof. Dr. Rafet ASLANTAŞ’a teşekkür ederim. Elma örneklerini koleksiyon bahçesinden temin etmemde yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Gürsel ÖZKAN’a teşekkür ederim. Tez çalışmamda DNA izolasyon metodu konusunda bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Murat AYDIN’a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları sırasında bana her zaman yardımcı olan ve desteklerini gördüğüm Doktora öğrencisi değerli arkadaşlarım Esmâ YİĞİDER ve Mohammed ALDAEEF ile Yüksek Lisans öğrencisi değerli arkadaşlarım Furkan UZUNDUMLU, Sümeyra UÇAR ve Sedat KARACA’ya teşekkür ederim. Her zaman yanımda olup manevi desteğini esirgemeyen Ebru SOLAK’a teşekkür ederim.

Tüm eğitim dönemimde benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyip her koşulda yanımda olan Annem, Babam ve Kardeşlerim’e gönülden sonsuz teşekkür ederim.

Şahin KAYA

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Bitki materyali	15
3.1.2. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler:	23
3.1.3. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler:	26
3.1.4. Çalışmada kullanılan bazı alet ve cihazlar	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Primer dizaynı ve sentezi	29
3.2.2. DNA izolasyonu	30
3.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	31
3.2.4. PCR ve elektroforez işlemleri	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	40
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bp	Base pair
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür deoksiribonükleik asit
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	etilendiamintetra asetik asit
g	Gram
GAA	Glasiyel Asetik asit
HCl	Hidroklorik asit
kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	Uluslararası biyoteknoloji bilgi merkezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	Power of hydrogen
PVP	Polivinilpirolidon
RNase	Ribonükleaz
rpm	Dakikada devir sayısı
SB	Sodyum Borat
TBE	Tris- borat- EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
UV	Ultraviyole
V	Volt
v/v	Hacim/Hacim

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Erwinia amylovora</i> 'nın elektron mikroskop görüntüsü.....	1
Şekil 1.2. Ateş yanıklığı etmeninin elma sürgünlerindeki belirtileri.....	2
Şekil 1.3. Ateş yanıklığı etmeninin elma çiçeklerindeki belirtileri	2
Şekil 3.1. Gala elma çeşidinden bir görüntü	17
Şekil 3.2. Ak sakı elma çeşidinden bir görüntü	18
Şekil 3.3. Mondial Gala elma çeşidinden bir görüntü	18
Şekil 3.4. Kaşel 37 elma çeşidinden bir görüntü	19
Şekil 3.5. Vista Bella elma çeşidinden bir görüntü.....	20
Şekil 3.6. Starkrimson elma çeşidinden bir görüntü	20
Şekil 3.7. Golden Delicious elma çeşidinden bir görüntü	21
Şekil 3.8. Royal Gala elma çeşidinden bir görüntü	22
Şekil 3.9. Galaxy Gala elma çeşidinden bir görüntü	22
Şekil 3.10. 100 bp'lik DNA ladder	27
Şekil 3.11. PCR işleminin yapıldığı thermocycle cihazı ve elektroforez sistemi.....	33
Şekil 4.1. E1F/1R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü	34
Şekil 4.2. E2F/2R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 4.3. E2F/3R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 4.4. E1F/2R, E1F/3R, E1F/4R ve E1F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü....	36
Şekil 4.5. E2F/1R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4.6. E2F/4R ve E2F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.7. E3F/3R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.8. E3F/1R, E3F/2R, E3F/4R, E3F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.9. E4F/4R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 4.10. E4F/1R, E4F/2R, E4F/3R, E4F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan elma çeşitleri ve Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılıkla ilgili bazı bilgiler	16
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin baz dizileri, baz sayıları ve $T_m(^{\circ}C)$ değerleri (F: Forward primer, R: Reverse primer)	29
Çizelge 3.3. Çalışma örneklerinin DNA konsantrasyon miktarları ve 260/280 değerleri	32

1. GİRİŞ

Elma, *Rosales* takımının *Roseaceae* familyasının *Pomoideae* alt familyasından *Malus* cinsi’de yer almaktadır ve ılıman iklim meyve türlerindendir (Hancock *et al.* 2008).

Ateş yanıklığı, armut, elma ve diğer *Rosaceae* familyası’na ait bitkileri etkileyen önemli hastalıklar arasında yer almaktadır (Zwet and Beer 1995). Ateş yanıklığı hastalık etmeni olan *Erwinia amylovora*; *Enterobacteriaceae* familyası, *Erwinia* cinsi içinde yer alan kısa çubuk şeklinde, gram negatif, fakültatif anaerob ve peritrik kamçılı bakteriler olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.1). In vitro ortamda optimum 21-28 °C arasında gelişebilen bakterilerin optimum gelişme pH’sı 6,0-7,5 ve termal ölüm noktası 45-50 °C’dir. *Erwinia amylovora*, meyve, sürgün ve ağaç kabuğu gibi çeşitli bitki dokularında damlacıklar halinde “Ooze” diye isimlendirilen bakteriyel akıntı ve “Strand” adı verilen bakteriyel iplikçikler oluşturmaktadır. Ooze içindeki bakteriler genellikle virulent olmakta ve 2 yıl yada daha uzun süre patojenitelerini sürdürebilmektedir. Sert yapıda olan ve zamanla kırılabilen iplikciklerin %20’sini bakteriyel hücre oluşturmaktadır (Zwet and Keil 1979).



Şekil 1.1. *Erwinia amylovora*’nın elektron mikroskop görüntüsü (Johnson 2000)

Erwinia amylovora, bitkide, sürgün, çiçek tomurcukları, gövde, kökler ve ana dallarda enfeksiyona neden olarak ağaçların az bir sürede ölümüne sebep olmaktadır (Pejchinovski 1996) (Şekil 1.2 ve Şekil 1.3). Ateş yanıklığı hastalığı, meyve

fidanlıklarında çok önemli zararlar yaptığı gibi, bazen de ticari amaçla ekilen meyve bahçelerini etkileyebilmektedir (Hale *et al.* 1996).



Şekil 1.2. Ateş yanıklığı etmeninin elma sürgünlerindeki belirtileri (Johnson 2000)



Şekil 1.3. Ateş yanıklığı etmeninin elma çiçeklerindeki belirtileri (Leonberger and Gauthier 2017)

Ateş yanıklığı hastalığı nedeniyle elma, ayva ve armut bahçelerinde bazı yıllarda yüksek ekonomik kayıplara neden olmuştur. 1998 yılında Ateş yanıklığı nedeniyle Yeni

Zellanda’da 10 Milyon Dolar maddi kaybın olduğu ve İtalya’da yaklaşık olarak 500.000 meyve ağacının söküldüğü bildirilmiştir (Vanneste 2000). Güneybatı Michigan’da Ateş yanıklığı’ndan dolayı 220.000’den fazla elma ağacı kaybı olduğu ve yaklaşık 240 hektardan fazla alanın kaybına neden olmuştur, ekonomik açıdan bu bölgede 42 Milyon Dolar kayba neden olmuştur, ABD’nin bütününde ise 100 Milyon Dolar olduğu bildirilmiştir (Norelli *et al.* 2003). Melbourn Avustralya 1997 yılındaki salgın ile 2,2 Milyon Dolar’lık zararın olduğu bildirilmiş, fidan endüstrisi ve yumuşak çekirdekli meyveler için ise ekonomik kaybın yaklaşık 20 Milyon Dolar olduğu tahmin edilmiştir (Rodoni *et al.* 2006). Macaristan’da 1996 yılında çoğunluğu ayva ve armut olmak üzere 60.000 ağacın sonu olmuştur (Nemeth 1999). Yıllık elma ve armut üretimi 4-5 bin ton olan Norveç’te, 1986 ile 2004 yılları arasında Ateş yanıklığının’ndan dolayı 3.5 Milyon Dolar kaybın meydana geldiği bildirilmiştir (Sletten and Rafoss 2006).

İlk olarak 1780 yılında, Ateş yanıklığı New York, Hudson vadisinde belirlenmiş ve dünyadaki diğer bölgelere buradan taşınmıştır. 1993 yılına kadar 31 ülkede Ateş yanıklığı hastalığı bildirilmiştir (Zwet 1992). *Erwinia amylovora* ’nın sebep olduğu Ateş yanıklığı, *Rosaceae* familyasının 40 türünde görülmüş olduğu bildirilir. *Malus*, *Pyrus*, *Cotoneaster*, *Crateageus*, *Pyracantha*, *Cydonia*, *Sorbus* ve *Stranvaesia* gibi 8 türde önemli derecede zararlar oluşturmaktadır. Meyvelerde meydana getirdiği tahriplerle önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Zwet and Beer 1995). 1975 yılında Layne and Quamme, Ateş yanıklığı hastalığının kontrolünün yüksek ücretler gerektirmesi, insan ve çevre sağlığına zararlı olmasından dolayı, mücadele uygulamalarının giderek azaldığından; kesin çözümün bulunmaması yanında, organik yetiştiriciliğin de gündeme gelmesiyle, dayanıklı anaç, ara anaçlar ve çeşitlerin kullanımının, hastalığı kontrol altında tutulmasında önem kazandığından bahsetmişlerdir. Bu noktadan hareketle, Ateş yanıklığına dirençli ıslahın üzerinde ciddi olarak durulması gerektiğine önem verilmiştir.

Oktem ve Benlioğlu (1988) tarafından bildirildiğine göre Türkiye’de Ateş yanıklığı ilk olarak 1985 yılında Sultandağı/Afyon’da bir armut bahçesinde tespit edilmiştir. 1986 ve 1987 yıllarında şiddetli enfeksiyonun olması sonucunda armut ağaçları ciddi anlamda zarar gördüğü bildirilmiştir (Momol *et al.* 1992). Bu nedenden dolayı, Türkiye’de bir an

önce Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı çeşitlerin tespit edilmesi bir gereksinim haline gelmiştir (Öztürk vd 2011).

Ateş yanıklığı hastalığı mücadelesi için günümüzde bir çok mücadele yöntemi denenmiş olmasına rağmen şimdiye kadar kalıcı ve etkili bir mücadele yöntemi geliştirilememiştir. Kimyasal mücadelede kullanılan antibiyotik ve bakırlar koruyucu özellikte olmaktadır. Kullanılan bakırın özellikle çiçek fizyolojisi ve gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. (Basım 1999). Antibiyotik kullanımının sırasında kimi dönemlerde Ateş Yanıklığıyla mücadelede başarı sağlansa bile ve insan sağlığını olumsuz etkilediği bilinmektedir (Moller *et al.* 1981). Baştaş ve Saygılı (2008) yaptığı çalışmada yine aynı şekilde, Dünyanın pek çok ülkesinde meyve üretimindeki verim ve kaliteyi olumsuz yönde etkileyen Ateş yanıklığı hastalığının mücadelesinde, en etkili yöntemlerden birinin kimyasal mücadele olarak kabul edildiğini ve kimyasal mücadelede kullanılan bakırlı bileşiklerin bazı meyvelerde paslanmaya sebep olmasına rağmen, diğer uygulamalardan daha az maliyete sahip olduğu için dormant ve çiçeklenme dönemlerinde yaygın olarak kullanıldığını ve ayrıca hastalığın kontrolünde kullanılan diğer bir yöntemin ise, 1950’lerde keşfedilen ve uygulanmaya başlanan antibiyotikler olduğundan bahsetmiştir.

Ateş yanıklığının mücadelesinde alternatiflerden biri olan streptomisin, doğal aşılama ile araştırma koşullarında test edilmiş, elma ve armutta Ateş yanıklığı hastalığının kontrolü için umut verici bulunmuştur. Bakırın mancozeb ile kombinasyonu ticari bahçesi olan üreticiler için bir alternatif olmuş, düşük inokulum veya düşük sıcaklıklar altında bakır streptomisin kadar etkili olmuştur. Fakat, hastalık gidişatının daha iyi denetlenebilmesi amacı ile günlük sıcaklık ve yağmur ile nemlilik gibi meteorolojik veriler ve bitki fenolojisi dikkate alınarak uygulanan tahmin ve erken uyarı modellerinden biri olan MARYBLYT modelinin öngördüğü infeksiyon koşulları ortaya çıkarsa, streptomisinin diğer alternatiflerden daha fazla koruma sağladığı görülmüştür. Streptomisin elma ve armutlarda ki Ateş yanıklığını önlemek için iyi bir kimyasal olduğu fakat hastalığın baskın olduğu koşullarda etkisinin sınırlı kaldığı saptanmıştır (Breth *et al.* 1998).

Araştırmalar sonucu streptomisin antibiyotiğinin insan ve evre sağlığı açısından olumsuz etkileri, meyvede toksik kalıntılardan endişelenilmesi ve antibiyotiğe dayanıklı bakteriyel izolatların oluşumu sebebiyle uygulamalar sınırlandırılmıştır. Hastalığa karşı kullanılan bakırlı preparatların ve antibiyotiklerin, etmende dayanıklılık oluşumuna ve aynı zamanda bitkide fitotoksisiteye sebep olmaları, etkili kimyasalların belirlenmesi için çalışmaların devam etmesine neden olmaktadır (Baştaş ve Saygılı 2008).

Ateş yanıklığı hastalığı için kimyasal mücadelenin pahalı ve insan sağlığına ciddi zararları olmasından dolayı, hastalıkla mücadele giderek kısıtlanmaktadır. Bitki hastalıkları için tercih edilen, bilinçsiz ve yoğun pestisit kullanımı bir çok sorunu da oluşurmaktadır. Pestisit kalıntılarının evre ve insan sağlığını kötü yönde etkileyerek, evre kirliliğine ve doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı, kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek yeni metodlar üzerinde çalışmalara ağırlık verildiği bildirilmiştir. Bu hastalıkla mücadele için biyolojik yöntemler ciddi bir sekilde kullanılmaktadır. Özellikle organik yetiştiriciliğin de önem kazanmasıyla hastalıklara dayanıklılıkla ilgili bitki ıslahı çalışmaları da önem kazanmıştır. Dayanıklı anaç, ara anaç ve çeşit kullanılması, Ateş yanıklığı hastalığını kontrol altına alınmasında önem kazanmaktadır.

Ülkemizde ve dünya ülkelerinde yararlı böceklerle yapılan biyolojik savaş konusunda önemli araştırma ve çalışmalar yapılmaktadır. Kaynakların bildirdiğine göre; ABD’de bal arıları meyvelerde önemli bir hastalık olan Ateş yanıklığı’na karşı kullanılmaktadır. Bu konuda řu bilgiler verilmektedir: Dişi böceğin tablası (stigma) zerinde koloni halinde gelişen ve Ateş yanıklığı’na neden olan *Erwinia amylovora*, bal arılarının taşıdığı faydalı bakteriler tarafından burada etkisiz hale getirilmekte ve ağaçta zarar yapmaları önlenmektedir (Gökçe ve Usta 2013).

Ateş yanıklığı hastalığının yayılmasını önlemede ve mücadelesinde en etkili ve en önemli yöntemlerden birisi de karantinadır. Dünyanın pek çok ülkesinde hastalık için karantina tedbirleri uygulanmakta olup, kurallara titizlikle uyulduğunda olumlu sonuçlar

alınmaktadır. Ateş yanıklığı görülen ülkelerden, *Rosaceae* familyası bitkilerindeki, tüm meyve, tohum, sürgün ve diğer bitki kısımlarının ithalini engellemek en etkili karantina düzenlenmesidir. Avrupa Bitki Koruma Teşkilatı (EPPO) Avrupa ülkeleri için, uymalarını önerdiği A2 karantina listesindeki bakteriyel hastalıklar içinde *Erwinia amylovora* bulunmaktadır. Ayrıca ülkemizde 6968 sayılı Ziraî Mücadele ve Ziraî Karantina yönetmeliğinde girişi yasak bakteriyel hastalıklar içerisinde etmen yer almaktadır (Zwet and Keil 1979; Maden ve Toros 1991).

Elma ıslahının amacı, önem dereceleri ülkelerin kendi durumlarına göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak, hastalıklara dayanım (külleme, karaleke, ateş yanıklığı, vb.) öncelikli amaç olarak karşımıza çıkarken diğer ıslah programlarının ortak çalışma temaları olarak soğuklara dayanım, ağaç formu, düşük soğuklama ihtiyacı, hasat fizyolojisi gibi durumların dikkat çektiği bildirilmiştir. Anaç seçimi ve seleksiyon, üzerinde durulması gereken diğer konulardır. Dünya genelinde anaç seçiminde dikkate alınan en önemli özellikler yeme kalitesi ve hastalıklara dayanım olmuştur. Seleksiyon ülkelere göre değişse de, genellikle Külleme ve Karalekeye çok hassas çeşitler ilk olarak elenmektedir. Sonrasında, albeni, renk, ağaç formu, tat, depolanabilme, soğuklama isteği, verimlilik veya soğuklara dayanım gibi kriterler değerlendirilmektedir. Elma ıslah programlarında ‘Gala’, ‘Red Delicious’, ve ‘Fuji’ gibi çeşitler dikkate alınmakta iken, özellikle Kuzey Avrupa’da ‘Breaburn’ ve ‘Elstar’ gibi daha fazla asitli çeşitler tercih edilmektedir. Elma ıslahında, halen yaygın olarak melezleme yöntemi kullanılmaktadır. Fakat son dönemlerde, gerekli sürenin olabildiğince kısaltılması amacıyla moleküler yöntemler üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Özellikle hastalıklara dayanım ve meyve kalitesi ile alakalı moleküler markörler, erken seleksiyona olanak sağlayabileceği için büyük önem kazanmaktadır (Atay vd 2010).

Diğer taraftan, *Erwinia amylovora*’ya dayanıklılık ıslahı konusunda çalışmalar üzerinde durulsa da dirençli çeşit eldesinde yeterince başarı elde edilememiş ve meydana gelen çeşitlerden birçoğu da hassas çeşitlerin yerini alacak gibi görünmemektedir. Buna rağmen, ıslah çalışmalarında, yeni yeni seleksiyonlar, hassas çeşitlerle yarışabilecek,

meyve kalitesi iyi ve yeterince dayanıklılığa sahip çeşitler belirlense de uzun bir ıslah süreci almasından dolayı istenilen sonuçlar elde edilememiştir.

Klasik ıslah yöntemleri çalışmaları ile yapılacak olan bir bitki ıslahı çalışması, bitki türüne göre değişmekle birlikte 6-12 yıl gibi uzun bir süreç gerektirmektedir. Bu hastalık etmenini erkenden teşhis edebilecek ve elma ıslahı çalışmalarında kısa sürede sonuç alınabilecek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma ile son yıllarda önem kazanan markör destekli seleksiyon çalışmalarında yardımcı olabilecek belirteçlerin (markörlerin) tasarlanması hedeflenmektedir. Böylece seleksiyon ıslahı çalışmalarına hız kazandırılmış olacak ve kısa sürede amaçlanan özellikte çeşit/ genotip tespiti mümkün olabilecektir.

Ateş yanıklığı hastalığıyla mücadelede, doğal populasyondaki genetik çeşitlilik kullanılarak hastalığa dirençli tip ve çeşitlerin belirlenmesi şeklinde yapılan seleksiyon ıslahı çalışmalarında, genetik zenginliği olan bölgelerde etkili ve sürekli şekilde kullanılan ıslah yöntemidir. Özellikle son yıllarda önem kazanmaya başlamış olan markör destekli seleksiyon (MAS=Marker Assisted Selection) çalışmalarının klasik bitki ıslahı yöntemlerinden olan seleksiyon çalışmalarına bir hız kazandırdığı bilinmektedir. Yaptığımız bu tez konusun da bir markör destekli seleksiyona olanak sağlayacak bir çalışma olup, Ateş yanıklığı hastalığı etmenine dayanıklı/ hassas olan elma çeşitlerini belirleyebilmektir.

Bir ön çalışma olarak gerçekleştirilen bu çalışmada amaç; *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu Ateş yanıklığı hastalığına karşı dayanıklı olan elma çeşitleri ve genotiplerini erkenden belirleyebilecek moleküler belirteçleri tespit etmek olmuştur.

2. KAYNAK ÖZETİ

Erwinia amylovora bakterisinin sebep olduğu Ateş yanıklığı hastalığı dünya genelinde elma ve armut bahçelerinde çok ciddi bir tehdit olarak bilinmektedir. Elma türlerinde ve çeşitlerinde uzun zamandan beri özellikle Ateş yanıklığı etmeni ile ilişkili olarak dünya genelinde çok sayıda karakterizasyon, tespit ve hastalığa dayanıklılıkla ilgili bitki ıslah programları yürütülmüştür.

Aldwinckle ve Preczewski (1976), hiçbir ticari elma ve armut çeşidinin Ateş yanıklığı'na tamamiyle dayanıklı olmadığını fakat çeşitler arasında hassasiyetleri arasında farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. Anaçların farklılığı, gübreleme, ağacın yaşı, toprak tipi ve bahçenin topografyası çeşit hassasiyetinin farklılığını engelleyen faktörler arasındadır ve aynı bölgede veya aynı iklim şartları altında yetiştirilen bitkilerin hassasiyetlerinde farklılıklar oluşturmaktadır.

Erwinia amylovora'nın sebep olduğu Ateş yanıklığı hastalığı, elma, armut, yenidünya ve ayva, gibi yumuşak çekirdekli meyve türlerinin bulunduğu *Rosaceae* familyasının 37 cinsine ait 129 türde belirti gösterdiği ve bu cinslerin içinde en şiddetli yanıklık belirtisi gösterenlerin ve ekonomik olarak önemli ölçüde zarar görenlerin başta *Malus* ve *Pyrus* olmak üzere *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Sorbus*, *Cydonia*, *Stranvaesia* ve *Pyracantha* cinsleri olduğu bildirilmiştir (Zwet and Keil 1979).

QTL haritalama çalışmaları ile birçok yabani *Malus* türü (*M. sublobata*, *M. robusta*, *M. atrosanguinea*, *M. fusca* ve *M. prunifolia*) Ateş Yanıklığı etmenine dayanıklı olarak tanımlanmıştır. (Aldwinckle and Beer 1979).

Kleinhempel vd (1984) yaptıkları bir çalışmada *Golden Delicious* çeşidinin Ateş yanıklığına yüksek derecede hassas olduğu ifade edilmiştir. Benzer şekilde, Fucikovsky (1987) Meksika'da *Golden Delicious* elma çeşidinde Ateş yanıklığının baskın olduğunu kaydetmiştir.

Adana ilinde ‘Golden’, ‘Starking’ ve ‘Amasya’ elma çeşitlerinin yoğunlukta olduğu bahçelerde Ateş yanıklığı hastalığı tespit edilmemiştir. Adana Pozantı ilçesi Ziraat Fakültesi çiftliklerinde deneme amacıyla yapılan tel askılara alınmış üretim yapılan üç çeşit bodur tip elmanın (Golden Sel-B, Erwin Spür, Lut's Golden) bulunduğu bahçede Ateş yanıklığı hastalığı tespit edilmiştir. Ateş yanıklığı hastalığı Hatay ve Gaziantep’te ‘Golden’ ve ‘Starking’ elma çeşitlerinde tespit edilmezken, sadece karışık olarak dikildiği bilinen Kahramanmaraş’ın Afşin ilçesinde bu elma çeşitlerinin 2 bahçede bu hastalık gözlenmiştir. Bu bahçelerde yapılan incelemede önceki yıldan kalmış kurumuş enfekteli çiçek buketleri bulunan dalların varlığı tespit edilmiştir (Tokgönül 1991).

1992-1993 yıllarında Van ve yöresinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının Ateş yanıklığı hastalığına genel olarak hassasiyetinin belirlendiği bir çalışma yapılmıştır. Yörede Ateş yanıklığına hassasiyet ayvalarda % 85, armutlarda % 60, elmalarda ise % 25 oranında kaydedilmiştir (Öden and Alp 1994).

Warner (1992) ‘Gala’ çeşidinin *Erwinia amylovora* etmeninin neden olduğu Ateş yanıklığı hastalığına oldukça hassas bir çeşit olduğunu bildirmiştir.

Avrupa’da yetiştirilen ‘Cox’, ‘Braeburn’, ‘Gala’, ‘Gloster’, ‘Idared’, ‘James Grieve’, ‘Jonaglod’, ‘Jonathan’ ve ‘McIntosh’ elma çeşitlerinin Ateş yanıklığına çok hassas oldukları bildirilmiştir (Zwet 1996).

Janick vd (1996) tarafından bakteriyel Ateş yanıklığı’na karşı bağışıklık sisteminin bazı *Malus* türlerinde bulunduğu ifade edilmiştir (Hancock *et al.* 2008).

Ateş yanıklığına dayanıklılığın karmaşık bir olay olduğunu ve çok gen ile idare edilen poligenik bir özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (Bell *et al.* 1996).

Elmada kantitatif lokus özellik (QTL) çalışmaları ile büyüme ve fidanların gelişimi incelenmiştir (Conner *et al.* 1998). Kantitatif karakter bölgelerinin bulunması hastalıklara

dayanım ve ekonomik açıdan önemli özelliklerin ıslahının yapılabilmesi açısından önem arz etmektedir.

‘Nova Easygro’ ve ‘Florina’ gibi bazı *Malus domestica* çeşitlerinde umut verici düzeyde Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklılık gözlenmiştir (Keck *et al.* 1997; Fischer and Fischer 1999).

İlk transgenik elma çeşidinin (James *et al.* 1989) bildirilmesinin ardından 20 den fazla elma çeşidine başarılı şekilde gen aktarımı yapılmıştır. Aktarılan özellikler arasında Karalekeye dayanıklılık (pinB, HcrVf2), Ateş yanıklığına dayanıklılık (AMPs, attacin E, MB39), köklenme kabiliyetinin artırılması (rolA, rolB, rolC), zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması, herbisite dayanıklılık, kendine verimlilik ve kaliteye yönelik çalışmalar (PPO, ACO) bulunmaktadır (James *et al.* 1989; James *et al.* 1993; Dandekar *et al.* 2004; Maximove *et al.* 1998).

Amasya ve Tokat illerini kapsayan bir çalışmada *Erwinia amylovora* etmeninin neden olduğu Ateş yanıklığı hastalığına yönelik ‘Golden Delicious’, ‘Starking’, ‘Misket’, ‘Alyanak’ ve ‘Stark Earliest’ çeşitleri karşılaştırmıştır. Çalışmaya göre ‘Golden Delicious’ ve ‘Starking’ çeşitleri diğer çeşitlere göre *Erwinia amylovora*’ya daha dayanıklı bulunmuş olup bunları ‘Misket’ çeşidinin izlediğini belirtmiştir (Mirik 2000).

Ünlü (2002) yapmış olduğu bir çalışmada, 100’ün üzerinde örnek toplamış ve bunlardan sadece 75 tanesinde *Erwinia amylovora*’nın varlığını tespit etmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmada Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden topladıkları elma, armut, ayva, ateş diken bitkilerinde *Erwinia amylovora* bakterisini tespit etmiştir.

Webster ve Wertheim (2003) tarafından *Agrobacterium* veya *Erwinia*’nın neden olduğu virüs ve bakteriyel hastalıklardan arındırılmış, sağlıklı ve aşı uyumu iyi olan ideal anaçların özellikleri belirlenmiştir. Anaç ıslahında; spesifik hastalıklara, zararlılara, köklerde ur oluşumuna, kök çürüklüğüne, elma Pamuklu biti ve Ateş yanıklığına dayanıklılık ön plana çıkan hedefler arasında yer almıştır.

Norelli vd (2003) elmada Ateş yanıklığı'na dayanıklılığı artırmak için yapılan yeni çalışmalardan bahsetmektedir. Çoklu sayıda hastalıklara dayanıklı hat elde edilmesine rağmen, ticari olarak düşük kalitede ürün veren çeşitlerin de ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Son yıllarda QTL haritalama yaklaşımı Ateş yanıklığına dayanıklılıkla ilgili olarak elmalarda (Calenge *et al.* 2004, Calenge *et al.* 2005) ve armutlarda (Dondini *et al.* 2004) kullanılır olmuştur. Liebhard vd (2003) Ateş yanıklığı etmenine dayanıklı kantitatif karakter lokuslarını (QTLs) belirlemek amacıyla 'Fiesta'x'Discovery' elma melezlerinden faydalanmışlardır.

Yapılan birçok çalışma sonucu ile henüz elma türlerinde bu hastalığa dayanıklılıkla ilişkili monogenik tespitler yokken kantitatif karakter lokuslarının (QTLs) tespit edildiği bildirilmiştir (Korban *et al.* 1988; Brisset *et al.* 2002; Dondini *et al.* 2004; Khan *et al.* 2006; Hancock *et al.* 2008)

Sansavini vd (2004) elma ıslah çalışmaları yapan 15 ülkede 25 kurum ile görüşerek çalışmalar yapmışlar ve ortak amaçlarının iyi meyve kalitesi, Ateş yanıklığı, Külleme ve Karaleke gibi hastalıklara dayanıklılık olduğunu belirtmişlerdir.

Elmalarda *Erwinia amylovora*, *Alternaria mali*, *Phyllosticta solitaria*, *Nectria galligena*, *Venturia inaequalis*, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, *Phytophthora cactorum*, *Podosphaera leucotricha*, *Eriosoma lanigerum*, *Dysaphis plantaginea* ve *D. devector* gibi çok sayıda hastalık zararlıya karşı genetik dayanıklılık bilgilerinin tespit edildiği bildirilmiştir (Hancock *et al.* 2008).

Khan vd (2006)'nin bildirdiğine göre; elma çeşitleri, Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılık/hassasiyet bakımından nispeten geniş bir aralığa sahiptir. Bu hastalığı kontrol eden çok sayıda genin varlığından yani kantitatif karakter lokuslarından (QTL'ler) emin olunan çalışmalar ortaya çıkmıştır. Yabani elma türleri ile bazı elma çeşitleri moleküler ıslah çalışmalarının kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan bir çalışmada 'Fiesta'x'Discovery' elma çeşitlerinin melezlerinde (F1'ler) *Erwinia*

amylovora’nın bir ırkı kullanılarak (Ea610) inokulasyon çalışmaları yapılmış ve bu hastalığa dayanıklılıkla ilişkili QTL’ler tespit edilmiştir.

Kotan vd (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye’nin Doğu Anadolu Bölgesi’nden yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen bakterinin tanılanması ve patojenitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Sherlock mikrobiyal tanılama sistemi kullanılarak toplamda 36 cinste 76 türe ait 324 bakteri izolatu tanılanmıştır. En yoğun olarak *E. amylovora* (% 16.9) izolatları bulunmuştur. 12 farklı türden alınan 82 izolat potansiyel patojen olarak değerlendirilmiştir. Çünkü bu izolatların tütünde hipersensitif reaksiyon testi pozitif olup, *Golden Delicious* elmasının yapraklarında enfeksiyona neden olmuşlardır.

Atasağun (2009)’un araştırmasına göre 101 tane elma örneğinden 38 adet izolat ve % 37,6 bulaşıklık, 43 adet armut örneğinden 17 adet izolat ve % 39,5 bulaşıklık, 21 tane ayva örneğinden 10 adet izolat ve % 42,6 bulaşıklık, 3 adet ateş dikenini örneğinden 2 adet izolat ve % 66,6 bulaşıklık, 4 tane dağ muşmulası örneğinden 4 adet izolat ve % 100 bulaşıklık, 5 tane alıç örneğinden 4 tane izolat ve % 80 bulaşıklık ve 33 tane süs elması örneğinden 9 tane izolat ve % 22,2 oranında *E. amylovora* ile bulaşıklık tespit edilmiştir.

Yılmaz ve Aysan (2009) yılında yayınlanan makalelerinde “ülkemizdeki yerel elma çeşitlerinin Ateş yanıklığı etmenine çok duyarlı olmadığını ifade ederek, yerel elma çeşitlerinin çiçek açma zamanının *Erwinia amylovora* epidemisine denk gelmemesi nedeniyle bu hastalığın elmalarda büyük zararlar oluşturmadığını; ancak, ülkeye giren yeni elma çeşitlerinde ve anaçlarda Ateş yanıklığı hastalığı belirtilerine son yıllarda rastlandığını” ifade etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, 2007 yılı ilkbahar aylarında tam bodur M9 anacı üzerinde aşılantmış ‘Gala’ çeşidi elma yapraklarında, sürgünlerinde, dallarında ve anaçta Ateş yanıklığı belirtilerine rastlandığını bildirmişlerdir.

Yeni elma çeşitleri geliştirmeye yönelik çalışmalar çok eski tarihlerden beri başlatılmıştır. Cicero, M.Ö. 50 yılında elma tohumlarından yeni tatlı elma çeşitleri geliştirmeye

çalışmış, Roma’da yaşayan İspanyol asıllı J.M. Columella M.S. 50 yılında her bir tohumun yeni bir çeşit adayı olduğunu ve hepsinin birbirinden farklı genetik yapıya sahip olduğunu bildirmiştir. Thomas Andrew Knight İngiltere’de 1790 yılında yeni elma çeşitleri geliştirmek için kontrollü melezleme çalışmaları yapmıştır (Lynd 2008).

Günümüzde tüketici tarafından en fazla tercih edilen çeşitler ‘Starkrimson Delicious’, ‘Starkspur Golden Delicious’, ‘Starking Delicious’, ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Stark Earlyeast’, ‘Beacon’, ‘Black Stayman Improved 201’, ‘Mutsu’, ‘Jonathan’, ‘Prima’, ‘Jerseymac’, ‘Vista Bella’, ‘Gala’, ‘Red Chief’, ‘Primiera’, ‘Elstar’, ‘Breaburn’, ‘Fuji’, ‘Red Delicious’ ve ‘Jonagold’ olduğu bildirilmiştir (Aslantaş 2014).

Çok sayıda ülkede elmalarda hastalıklara dayanıklılıkla ilgili ıslah programları ele alınmış olup Ateş yanıklığına dayanıklı yeni elma çeşit ıslahı üzerinde de çalışmalar yürütülmüştür. Örneğin; elma ıslah çalışmaları Almanya’da, 1928 yılında Müncheberg’de başlamıştır. Dresden’de 1971’den bu yana geniş çapta bir elma ıslah programı yürütülmekte olduğu bildirilmektedir. Yüksek meyve kalitesinin yüksek verimle kombinasyonunu, çalışmada amaçlamışlardır. Çalışmada Küllemeye ve Karalekeye çok hassas olan bütün tipler ilk etapta elenmektedir. ‘Pinova’, ‘Piros’, ‘Pilot’ ve diğer Pi-serisi elma çeşitleri bu program çıkışıdır. Programın ikinci aşaması olarak 1932 yılında bir dayanıklılık ıslahı projesi başlatılmıştır. Bu kısımda Kırmızı örümcek, Ateş yanıklığı, Külleme, Bakteriyal kanser, İlkbahar ve Kış donlarına dayanıklılık çalışmalarını içerdiği bildirilmiştir. Bu çeşitlerde Re-serisi çeşitler (‘Rewena’, ‘Remo’, ‘Reanda’ ve ‘Rebella’ vb.) olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen bütün tipler ilk 3 yılda Mildiyö, Ateş yanıklığı ve Karalekeye karşı test edilmekte ve çok hassas olanlar elemine edilmektedir. Her yıl 8000 melez bitki elde edilmekte ve bazı agronomik özellikler ile dayanıklılığa göre yapılan eleme işleminden sonra 1000-1500 melez bitki kalmaktadır. Şimdiye kadar 20’den fazla elma çeşidi geliştirildiği belirtilmiştir (Fischer and Fischer 2002, 2008). Örneğin; 1990’ların başında Budapeşte’de, elma ıslah programı başlatılmıştır. Yüksek meyve kalitesine sahip, verimli Ateş yanıklığı, Karaleke ve Küllemeye dayanıklı yeni çeşitler geliştirmeyi amaçlamışlardır (Toth *et al.* 2006). Mesela; 1948 yılında Arges’de (Fruit Research Institute of Pomology) yeni bir program

başlatılmıştır. Son zamanlarda başlıca hedefin Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı çeşitleri geliştirmek olmuştur (Ballard 2002).

Elmada Karaleke ve Ateş yanıklığı hastalıklarına dayanıklılık ve geç çiçeklenme karakterleri bakımından önemli bir gen merkezi olan Doğu Karadeniz Bölgesi'nin sahil kuşağına ait 75 yerel elma genotipinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elmanın mikro çoğaltımında başarıyla kullanılabilecek bir protokol geliştirilmiştir. Bu protokole göre; 1) başlangıç aşamasında kahverengileşme ve enfeksiyon sorunlarına karşı eksplantların, soğuklamasını tamamlamış 1 yaşlı dallardan kontrollü koşullarda sürdürülen sürgünlerin uçlarından alınması ve dezenfeksiyonun %0,1'lik civa klorür solüsyonu ile 2,5 dakika süreyle yapılması; 2) besin ortamı olarak 1,0 mg/l BA, 0,3 mg/l GA3, 2 ml/l dozunda PPM (Plant Preservative Mixture), 30 g/l sakaroz ve 7 g/l agar katılmış MS besin ortamının kullanılması, ilk kültürlerle 4,0 g/l aktif kömür ilave edilmesi; 3) mikro çeliklerin 3,0 mg/l IAA, 1,0 g/l PVA (polivinil alkol) ve 25 mg/l kazein hidrolizat katılmış makro element düzeyi ½ kuvvetindeki MS ortamı üzerinde ve ilk 1 hafta karanlık uygulaması ile köklendirilmesi; 4) in vitro bitkiciklerin sıcaklık ve nem kontrollü serada plastik tüneller altında 3 haftalık süreçte dış koşullara alıştırılması önerilmektedir. Çalışmada, özellikle 67 nolu elma genotipinin, Ateş yanıklığı ve Karaleke hastalıklarına dayanıklı olmasının yanında yüksek mikro çoğaltım performansı ile da değerli bir klonal anaç genotipi olabileceği belirlenmiştir (Dumanoğlu vd 2016).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan elma çeşitlerine ait yaprak örnekleri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü koleksiyon bahçesinden temin edilmiştir. İlkbaharda tomurcuklardan ilk çıkan yeni yapraklar alınmış, buz içeren kutular içinde laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılncaya kadar derin dondurucu dolapta (-80 °C) muhafaza edilmiştir.

Çalışmada, ‘Gala’, ‘Ak Sakı’, ‘Mondial Gala’, ‘Kaşel-37’, ‘Vista Bella’, ‘Starkrimson’, ‘Golden Delicious’, ‘Royal Gala’, ‘Galaxy Gala’ olmak üzere kullanılan dokuz elma çeşidi kullanılmış olup bu elma çeşitlerinin Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklılıkla ilgili bazı literatür bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca, bu elma çeşitlerinin bazı genel özellikleri bu çizelge sonrasında sıralanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan elma çeşitleri ve Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılıkla ilgili bazı bilgiler

Sıra No	Çeşit	Dayanıklı/Hassas
1	Gala	Çok hassas (Zwet 1996) Çok hassas (Warner 1992) Orta dayanıklı (Vanneste 2000) Çok hassas (Hampson and Kemp 2003) Hassas (Yılmaz ve Aysan 2009) Hassas (Kellerhals <i>et al.</i> 2014) Hassas (Kost <i>et al.</i> 2015) Çok hassas/Hassas (Koski and Jacobi 2018) Çok hassas (Beckerman, 2018)
2	Aksakı	Orta dayanıklı (Demir and Gündoğdu 1993)
3	Mondial Gala	Orta dayanıklı (Akgül vd 2005; Özçağırın vd 2004)
4	Kaşel 37	Orta dayanıklı (Demir and Gündoğdu 1993)
5	Vista Bella	Dayanıklı (Sehic <i>et al.</i> 2009)
6	Starkrimson	Orta dayanıklı (Demir and Gündoğdu 1993) Hassas (Koski and Jacobi 2018)
7	Golden Delicious	Çok hassas (Kleinhampel <i>et al.</i> 1984) Çok hassas (Fucikovsky 1987) Orta dayanıklı (Demir and Gündoğdu 1993) Orta dayanıklı (Mirik 2000) Hassas (Koski and Jacobi 2018) Hassas (Beckerman, 2018) Dayanıklı (Sehic <i>et al.</i> 2009)
8	Royal Gala	Hassas (Koski and Jacobi 2018)
9	Galaxy Gala	Orta dayanıklı (Akgül vd 2005; Özçağırın vd 2004) Hassas (Norelli <i>et al.</i> 2003; Turchek 2004) Hassas (Kost <i>et al.</i> 2015)

1-Gala: Bu çeşit, Yeni Zelanda’da tahminen 1934 yılında ‘Kidd’s Orange Red’ x ‘Golden Delicious’ melezlemesiyle elde edilmiş ve 1962 yılında bu ismi almıştır. Gala grubu çeşitleri arasında ‘Tenroy (Royal Gala)’, ‘Imperial Gala (Mondial Gala, MitchGala)’, ‘Regal Gala’, ‘Scarlet Gala’, ‘Fulford Gala’, ‘Brookkfield Gala’, ‘Buckeye Gala’, ‘Pacific Gala’, ‘Gale Gala’, ‘Delaf Gala’, ‘Regal Prince (Gala Must)’ ve ‘Waliser (Crimson Gala)’ çeşitleri yer almaktadır. ‘Galaxy Gala’ Yeni Zelanda’da 7 yaşında bir ‘Tenroy (Royal Gala)’ ağacının doğal mutasyonu olarak 1985 yılında ıslah edilmiştir (Kiddle 2006).

Ağacı kuvvetli ve dik-yayvan gelişir. ‘Golden Delicious’ çeşidine benzer fakat dal açıları daha dardır. Karalekeye (özellikle meyvesi), Ateş yanıklığına yüksek derecede hassas, Küllemeye kısmen hassas bir çeşittir (Hampson and Kemp 2003).



Şekil 3.1. Gala elma çeşidinden bir görüntü (Anonymous 2018)

2-Ak Sakı: Erzincan civarında yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan ve yöre halkı tarafından zevkle tüketilen bir çeşittir. Yörede Ak ve Kara ‘Sakı’ ekotipleri iyi bilinmektedir. 3 Mayıs 1990 tarihinde ‘Ak sakı’ ismi ile tescillendirilmiştir (Öztürk vd 2013). Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü bünyesinde 1999 yılında Sakı elma tipinin klon seleksiyonu yoluyla ıslahı projesi başlatılmış olup 1999-2001 yılları arasında yapılan çalışmalar sonucunda 7 Sakı elma tipi ümitvar olarak seçilmiştir. Halen projenin II. aşaması devam etmekte olup farklı anaçlar üzerinde tipler değerlendirilmektedir (Atay vd 2010).



Şekil 3.2. Ak sakı elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

3-Mondial Gala: Akgül vd (2005) ve Özçağırın vd (2004)'e göre; Yeni Zelanda'da 'Orange Red' x 'Golden Delicious' melezi olarak bulunmuştur. Ağacı kuvvetli ve yayvan gelişir. Sürekli yüksek miktarda ürün elde edilir. Seyreltme ile meyve kalitesi artar. Meyvesi sarı zemin üzerine yoğun kırmızı-turuncu renktedir. Meyve kabuğu 'Royal Gala' çeşidinden daha açık, 'Galaxy Gala' çeşidinden daha koyu renktedir. Meyve eti rengi sarımsı, meyvesi tatlı ve aromalıdır. Ortalama meyve ağırlığı 152 g, ortalama meyve eni 66 mm, ortalama meyve boyu 60 mm'dir. Bugüne kadar tüm üretim bölgelerinde en iyi mutasyon olarak kabul edilmektedir. Çeşit Ateş yanıklığı ve Karalekeye orta derecede dayanıklıdır. Tam çiçeklenmeden derime kadar geçen süre 110-120 gündür. Hasat tarihi ağustos ayının 4. haftasıdır. 'Golden Delicious' çeşidinden 22 gün önce hasat edilmektedir. Derimde gecikilirse bütün 'Gala' çeşitlerinde olduğu gibi sap çukurunda çatlamlar görülebilir. Diploid bir çeşittir. Kendine verimli olup, iyi bir tozlayıcıdır. Ayrıca 'Idared', 'Fuji', 'Breaburn', 'Granny Smith' ve 'Elstar' çeşitleri tarafından tozlanır (Ceylan 2008).



Şekil 3.3. Mondial Gala elma çeşidinden bir görüntü (Ceylan 2008)

4-Kaşel 37: Eltez ve Kaşka (1985) Amasya elmasıyla ilgili olarak, ilk kez, Niğde yöresinde yaptıkları seleksiyon çalışmasıyla her yıl meyve veren ve Kaşel elması olarak adlandırılan, özellikleri birbirinden farklı 52 tip elde etmişlerdir (Atay vd 2010).

Amasya çeşidinin özellikleri ise şunlardır; Ağacı kuvvetli ve yarı dik gelişir. Verimli bir çeşit olmakla birlikte şiddetli periyodisite göstermektedir (Özongun vd 2004; Kaplan *et al.* 2003; Özkan ve Celep 1995). Tozlayıcı olarak ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’ ve ‘Starking Delicious’ çeşitleri önerilebilir. Meyveleri küçük-orta irilikte, küresel konik şekillidir. Meyve kabuk rengi yeşilimsi beyaz zemin üzerine soluk kırmızı, üzerine çizgilidir. Meyve eti beyaz renkte, orta sertlikte, sulu ve çok tatlıdır. Tam çiçeklenme ile hasat arasındaki süre 155-165 gündür. Modifiye atmosfer koşullarında depolama süresi 7-8 aydır (Özkan ve Celep 1995). Klon seleksiyonu sonunda belirlenmiş olan çok sayıda çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; ‘Kaşel 36’, ‘Kaşel-37’, ‘Kaşel 4’ ve ‘Kaşel 43’dir (Eltez ve Kaşka, 1985)



Şekil 3.4. Kaşel 37 elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

5-Vista Bella: ABD orjinli, ağacı kuvvetli olup, yarı dik ve hatta yayvan şekilde gelişir. Meyvesi orta irilikte olup; yük çok selatin yassı-konik şekle sahiptir. Kabuk rengi sarı-yeşil zemin rengi üzerine sıvama kırmızıdır. Meyve eti sert, bol sulu ve mayhoş bir tada sahip olup, kalitesi iyidir. Hasatı Haziran sonu Temmuz başında yapılabilir. Tozlayıcıları,

‘Idared’, ‘Jerseymac’, ‘Prima’ ve ‘Priam’dır. Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde tavsiye edilen yazlık bir çeşittir (Öz vd 1998).



Şekil 3.5. Vista Bella elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

6-Starkrimson: ABD orjinli olup ‘Starking Delicious’un bir tomurcuk mutasyonu olarak 1952’de bulunmuştur. Sinonimi ‘Bisbee Delicious’. Ağacı orta kuvvette olup, yarı-dik, dik gelişir, çok verimlidir. Meyvesi iri, sıvama koyu kırmızı morumsu renkte, düzgün şekilli, çok iyi kalitededir. Hasatı eylül ortalarına doğru yapılmaktadır. Tozlayıcıları ‘Golden Delicious’, ‘Starkspur Golden Delicious’, ‘Stark Earliest’tir. Bir ana ve çok sayıda yan dalı bulunan, noel çamına benzeyen bir terbiye ister. Dikim aralığı tohum anacı kullanıldığında toprağın kuvvetine göre 5x3 m, 6x3 m veya en çok 5x4 m olabilir. Verimli toprak, kuvvetli anaç, dikkatli meyve seyreltmesi, daha çok gübre ve su, kuvvetli budama ister. Meyveleri soğuk depoda Nisan ayına kadar saklanabilir. Elma yetiştirilen bütün bölgelere tavsiye edilir (Öz vd 1998).



Şekil 3.6. Starkrimson elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

7-Golden Delicious: ABD orjinli olup, 1890'da bulunmuştur. Sinonimi 'Azany Delicious', 'Delicious Aurin', 'Prevuzhonda', 'Stark Golden Delicious', 'Yellow Delicious', 'Zlatna', 'Zolotoe Prevoshodnoe'dir. Ağacı dik, yarı-dik ve orta kuvvette gelişir, çok verimlidir. Meyvesi iri, altın sarısı renkte, silindirik-konik şekilli ve çok iyi kalitededir. Hasatı Eylül'ün ikinci haftası yapılmaktadır. Tozlayıcıları; 'Starking Delicious', 'Starkrimson Delicious', 'Jonathan' ve 'Winesap'tır. Bütün bölgelere tavsiye edilir. Dikkatli meyve seyretilmesi yapılırsa her yıl düzenli ve bol ürün verir. Mart ayına kadar soğuk depoda saklanabilir (Öz vd 1998).



Şekil 3.7. Golden Delicious elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

8-Royal Gala: 'Golden Delicious' ve 'Kidds Orange Red'in melezlemesiyle yeni Zellanda'da elde edilmiş bir çeşittir. Kabuk rengi kırmızı, meyve eti serttir. Meyveleri irileştirmek için seyretilme yapılmaktadır. Karaleke, Ateş yanıklığı, Mildiyö ve Pasa karşı hassastır. Meyve büyüklüğü küçükten orta büyüklüğe kadardır. Et rengi beyaz-krem rengidir. Tadı mükemmeldir. Eylül ayının ilk haftasında veya Ağustos sonunda hasat edilir. Tozlayıcı olarak 'Golden Delicious' kullanılabilir (Anonim 2014).



Şekil 3.8. Royal Gala elma çeşidinden bir görüntü (Karşı ve Aslantaş 2016)

9-Galaxy Gala: ‘Galaxy Gala’ yedi yaşında bir Tenroy (‘Royal Gala’) ağacının doğal mutasyonu olarak 1985 yılında ıslah edilmiştir (Kiddle 2006). Akgül vd (2005) ve Özçağırın vd (2004)’e göre; Yeni Zelanda’da ‘Kidd’s Orange Red’ x ‘Golden Delicious’ melezi olarak bulunmuştur. Ağacı kuvvetli büyüyen çok verimli bir çeşittir. Erken meyveye yatar. Meyvesi kırmızı-turuncu renkli ve üzeri çizgilidir. Meyveleri erken renklenmeye başlar. Meyve eti rengi sarımsı, meyvesi sulu, gevrek, tatlı ve aromalıdır. Ortalama meyve ağırlığı 150 g’ dır. Ateş yanıklığı ve Karalekeye orta derecede dayanıklıdır. Derimde gecikilirse bütün ‘Gala’ çeşitlerinde olduğu gibi sap çukurunda çatlama görülebilir. Tam çiçeklenmeden derime kadar geçen süre 110-120 gündür. Hasat tarihi Ağustos ayının 4. haftasıdır. Tozlayıcıları ‘Fuji’, ‘Breaburn’, ‘Granny Smith’, ‘Jersey Mac’ ve ‘Golden Delicious’ çeşitleridir (Ceylan 2008).



Şekil 3.9. Galaxy Gala elma çeşidinden bir görüntü (Ceylan 2008)

3.1.2. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler:**1M Tris-HCL(1000ml):**

121,1 g Tris-base

700 ml dH₂O

42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 m)

700 ml su içerisinde 121,1 gr Tris-base karıştırılmıştır. Üzerine 42 ml konsantre HCl eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

0,5 M EDTA (Ph: 8,0) (1000ML):

136,1 g EDTA

20 g NaOH

800 ml dH₂O

800 ml su içerisinde 136,1 g EDTA eritilip üzerine 20 g NaOH eklenerek pH: 8,0 olarak ayarlanmıştır. Filtreden geçirilmiş ve otoklavlanmıştır.

5 M NaCl(500ml):

146,1 g NaCl

450 ml dH₂O

146,1 g NaCl 450 ml suda eritilmiştir. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır (otoklavlanmamıştır).

10XTE Buffer (1000 ml):

100 ml 1 M Tris-HCl pH: 8,0

20 ml 0,5 M EDTA

880 ml dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır.

1XTE Buffer (1000 ml):

10X TE Bufferdan 100 ml alınıp 900 ml saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. (DNA 1X TE'de çözülmüştür.)

3M Sodyum Asetat (pH:5,2) (100ml)

40,8 g Sodyum Asetat (NaOAc.3H₂O) 80 ml ultra saf suda iyice eritilir ve pH:5,2 oluncaya kadar Glasiyel Asetik asit (GAA) eklenmiş ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

10M Amonyum Asetat:

77 g Amonyum Asetat

800 ml dH₂O

77 g Amonyum Asetat 800 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür. dH₂O kullanarak hacmi 1 litreye tamamlanarak stok hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

DNA ekstraksiyon tampon (50 örnek için):

1 g toz CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromür)

0,5 g (%0,1) Sodyum bisüfit (NaHS_3 ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ karışımı) (Sigma, 243973)

5 ml Tris-HCl (1M)

14 ml NaCl (5M)

2 ml EDTA(0,5M)

0,1 ml (%0,2) β - merkapttoetanol(v/v)

0,2 g PVP (Polivinilpirolidon)

Kloroform: izoamil alkol:

24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Fluka, 25666).

2-propanol (isopropanol):

Hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, 19516).

Proteinaz K:

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, P2308).

Ribonükleaz (RNaz):

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, R6513).

%70'lik Etil Alkol:

70 ml saf etil alkol'ün hacmi dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler:**Etidyum Bromür Çözeltisi:**

500 ml 0,5X TBE tampon içerisinde 300 µl etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi:

0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

10X TBE tamponu:

108 g Tris- base

55 g Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

700 ml dH₂O

700 ml dH₂O içerisinde 108 g Tris-base, 55 g Borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA çözülmüştür. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

0,5X TBE tamponu:

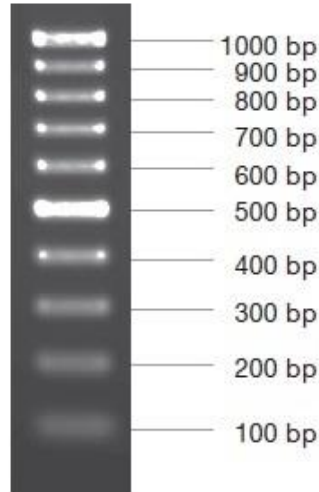
10X TBE tampon seyreltilerek (50 ml 10X TBE + 950 ml saf su) 0,5X TBE tampon hazırlanmıştır.

Primerlerin hazırlanması:

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

DNA Marker:

Çalışmada, 100 bp'lik DNA ladder (VC 100 bp Vivantis, NL1403) kullanılmıştır.



Şekil 3.10. 100 bp'lik DNA ladder (VC 100 bp Vivantis, NL1403)

3.1.4. Çalışmada kullanılan bazı alet ve cihazlar

İnkübatör (Mettler, GERMANY)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH metre (Ohaus Starter3000, USA)

Derin dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, USA)

Hassas terazi (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su banyosu (Mettler WNB14, GERMANY)

Mikrodalga fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf su cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific multiskan go, USA)

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Elektroforez tankı (Biometra, GERMANY)

Elektroforez akım sağlayıcı (Biometra standart power pack P25, GERMANY)

Jel görüntüleme sistemi (Ultra lum inc, USA)

PCR cihazı (Thermo Cyclor Block, GERMANY)

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer dizaynı ve sentezi

Gardiner *et al.* (2012)'ın Ateş Yanıklığı etmeni olan *Erwinia amylovora*'ya dayanıklılık genini belirlemiş olduğu çalışma esas alınmıştır. Bu çalışmada NCBI gen bankasından belirlenmiş olan RLP1 geni (Accession No: JN798166) dizisi, primer dizaynında kullanılmıştır. Dizayn edilen primerlerin sentez işlemi yaptırılmış ve bu primerler DNA örneklerinde PCR amplifikasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada, 4 adet forward ve 5 adet reverse olmak üzere toplam 9 primer kullanılmış olup bu primerlerle toplam 20 primer kombinasyonu denenmiştir. Çizelge 3.2.'de, bu primerlerin 5'→3' yönde baz dizileri ile baz sayıları ve Tm (°C) değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin baz dizileri, baz sayıları ve Tm(°C) değerleri (F: Forward primer, R: Reverse primer)

Primer adı	Primer dizisi (5'→3')	Baz sayısı	Tm (°C)
E1F	TCCGAATCCTTGACCTCATC	20	60,01
E1R	AGGTGGTTGTGGCTCAAATC	20	59,97
E2F	ACCGCCCAGTTTAATTGTATC	21	60,00
E2R	TTGTGGCTCAAATCTAAGTGC	21	60,00
E3F	TTCCTTGAACCAGCTTTTCG	19	58,98
E3R	AAGACGACGCTTCAAGGTG	19	59,02
E4F	ACTTTATCACCGGTACCATC	20	54,00
E4R	TTGTGGCTCAAATCTAAGTG	20	53,97
E5R	TTGTTGCAATCGAGATTTAG	20	53,92

3.2.2. DNA izolasyonu

Çalışma için temin edilen elma çeşitlerinin yaprak örnekleri öncelikle kriyojenik tanklarla getirilen sıvı azotla porselen havanlarda pudra kıvamında ezilmiştir.

Li and Quiros (2001)'dan modifiye edilen DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi yapılmıştır;

- a. DNA ekstraksiyon tamponu çalışma anında hazırlanmış olup önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir. Bitki materyaline ilave edilmeden önce ekstraksiyon tamponuna %0.2(v/v) oranında β - merkapttoetanol ve 0,2 g PVP ilave edilmiştir.
- b. Daha sonra sıvı azotta parçalanıp 2 ml'lik tüplere alınan 0,3 g bitki materyali üzerine 1000 μ l DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda her 10 dk'da bir alt üst edilip karıştırılarak 60 dk beklenmiştir.
- c. Su banyosu aşamasından sonra 10 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır ve bu süre sonunda her örneğe 750 μ l fenol kloroform izoamil alkol eklenip tüm örnekler 15 dk yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- d. 14000 G ve 24°C'de 20 dk santrifüjlenip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- e. Alınan oranda kloroform izoamil eklenmiştir.
- f. 14000 G ve +4°C'de 20 dk santrifüjlenip üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- g. Üst faza 2,5 µl RNaz ve 8 µl proteinaz K eklenmiş ve 45 dk 37°C'de bekletilmiştir.
- h. DNA'yı çöktürmek için her tüpe 100 µl amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat (3M), ve hacmin iki buçuk katı kadar -20°C'de muhafaza edilen izopropanol eklenir. Yavaşça alt üst edilir ve bu esnada DNA'lar görülür.
- i. 14000 G ve +4°C'de 20 dk santrifüjlenip üst faz atılır. Tekrar 1 dk santrifüj yapılarak kağıtta ters çevrilip kurutulmuştur.
- j. 37°C'de 15 dk kurutulur ve üzerine 100 µl 1X TE eklenmiştir.
- k. 24 saat +4 °C'de dinlendirdikten sonra kullnılncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

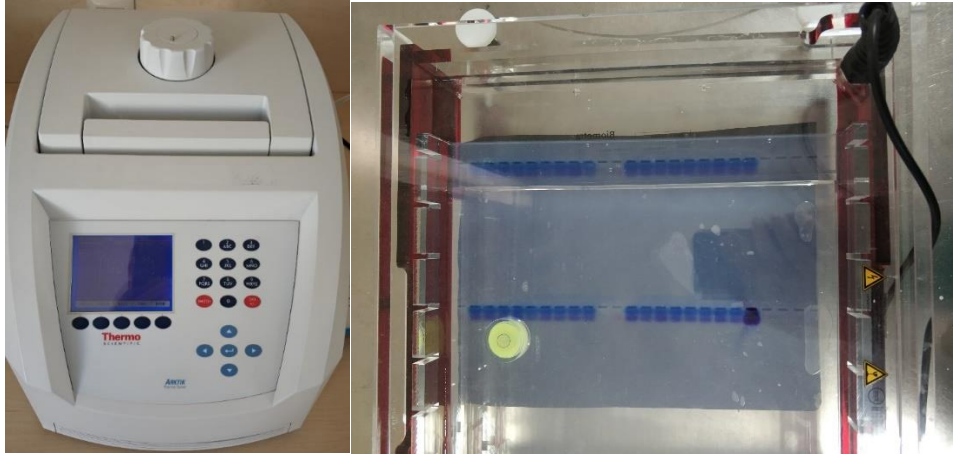
İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi optik dansite (OD) ile kontrol edilmiştir. Bunun için, 260 (OD₂₆₀) ve 280 (OD₂₈₀) optik dansitede ki Nanodrop spektrofotometre okumaları kaydedilmiştir. Elde edilen değerler ve bunların birbirine oranları kullanılarak, DNA miktar ve saflıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Konsantrasyonları belirlenen DNA'lar agaroz jel görüntüsünde parlama yapma ihtimalini azaltmak için uygun matematiksel işlemler kullanılarak DNA'lar eşitlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma örneklerinin DNA konsantrasyon miktarları ve 260/280 değerleri

Sıra No	Çeşit	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280 oranı
1	Gala	2373	1,28
2	Aksakı	2344	1,15
3	Mondial Gala	1105	1,44
4	Kaşel 37	511	1,27
5	Vista Bella	2207	1,40
6	Starkrimson	1720	1,86
7	Golden Delicious	2705	1,09
8	Royal Gala	1525	1,64
9	Galaxy Gala	554	1,04

3.2.4. PCR ve elektroforez işlemleri

PCR işlemi, toplam reaksiyon hacmi 22 μl olacak şekilde; 12,5 μl dH₂O, 1 μl genomik DNA, 0,5 μl dNTP, 2 μl 1x PCR buffer, 2,5 μl MgCl₂ ve 0,5 μl Taq polimeraz ve her primerden (forward ve reverse) 1 μl alınarak PCR içeriği hazırlanmıştır. PCR döngüsü olarak thermocycle cihazında; 94°C’de 5 dakika, 45 döngü olacak şekilde 94°C’de 1 dakika + 45-60°C’de 1 dakika + 72°C’de 1 dakika işlem sonrasında en son olarak 72°C’de 5 dakika işlem yapacak olan program kullanılmıştır.

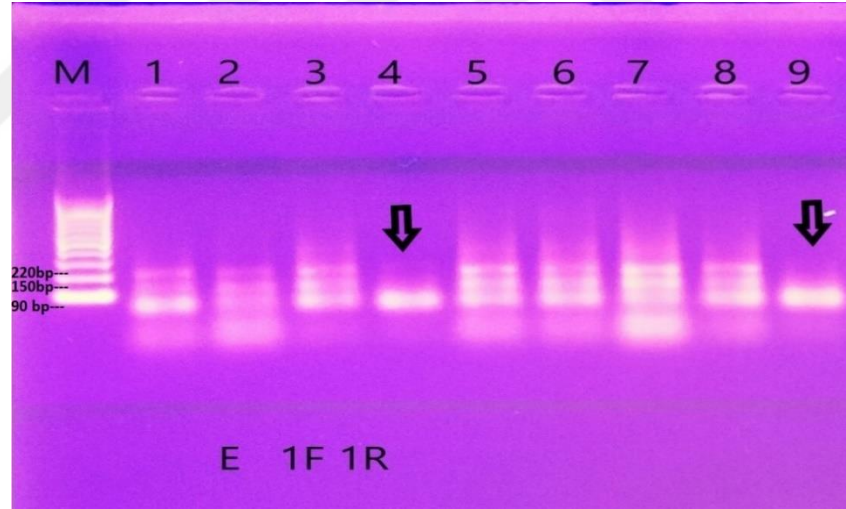


Şekil 3.11. PCR işleminin yapıldığı thermocycle cihazı ve elektroforez sistemi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel kullanılarak elektroforezi’de yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bunun için; %1’lik konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılarak %1’lik SB (sodyum borat) tamponu içerisinde mikrodalga fırında bir jel hazırlanmıştır. İçerisine 0,5 mg/ml olacak miktarda Ethidium bromid eklenmiştir. Elektroforez tankında jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (bromfenol mavisi + PCR ürünü) yüklenmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna elektroforez işlemi sonucunda oluşacak bantların doğru şekilde yorumlanmasını sağlayacak olan 100 bp’lık DNA markörü yüklenmiştir. 70 Volt değerinde elektrik akımı verilerek yaklaşık olarak 2,5 saat süre ile DNA’lar elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez tankından çıkarılan jel, görüntüleme cihazında UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.

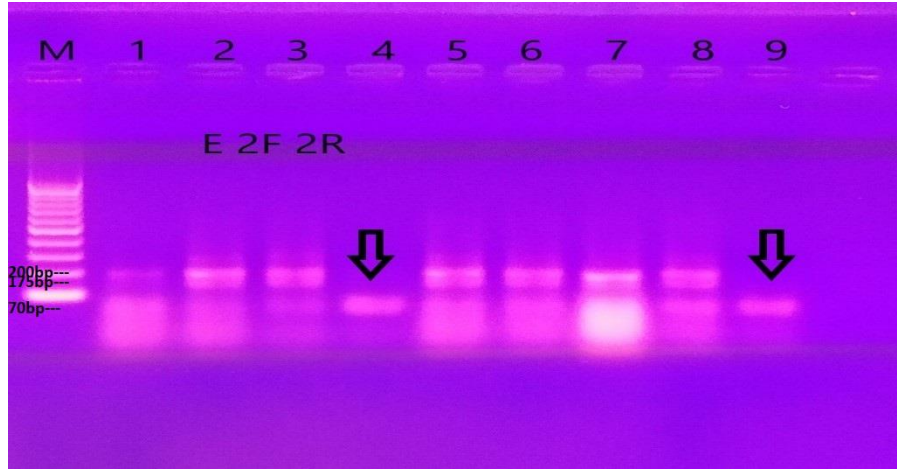
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Dokuz elma çeşidinde *Erwinia amylowora* etmenine karşı dayanıklılık ve hassasiyetle ilgili olarak bilgi vermesi amaçlanan toplam 9 primerin karşılıklı olarak kullanılması sonucunda elde edilen 20 primer çifti görüntüsü aşağıda verilmiştir. E1F/1R, E2F/2R ve E2F/3R primer çiftlerine ait elde edilen agaroz jel görüntülerinde belirgin bir şekilde farklı bant görüntüleri elde edilmiştir. Şekil 4.1’de E1F/1R primer çifti jel görüntüsünde ‘Kaşel37’ ve ‘Galaxy Gala’ elma çeşitlerinde yaklaşık 90bp’lik tek bir bant elde edilirken ‘Gala’, ‘Aksakı’, ‘Mondial Gala’, ‘Vista Bella’, ‘Starkrimson’, ‘Golden Delicious’, ‘Royal Gala’ çeşitlerine ait ise yaklaşık 90bp, 150bp ve 220bp boyutlarında olmak üzere üçer bant görüntüsü elde edilmiştir.



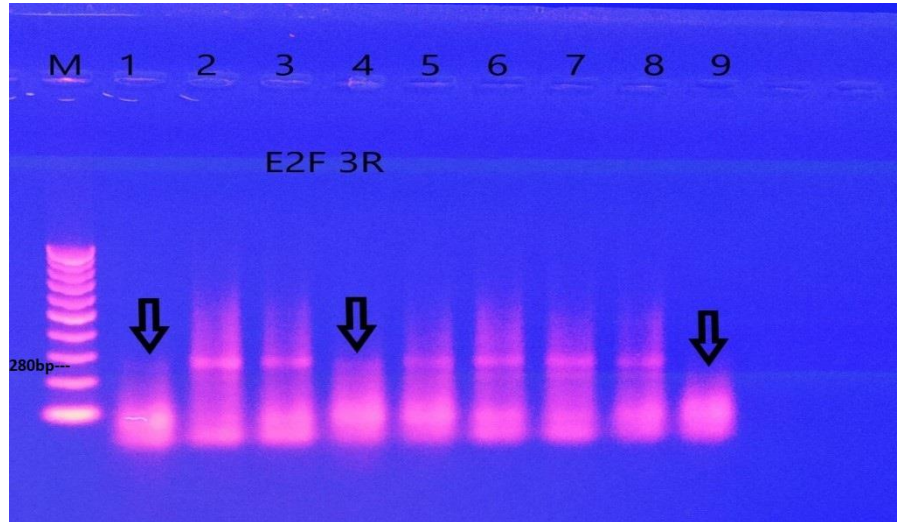
Şekil 4.1. E1F/1R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

E2F/2R primer çifti jel görüntüsünde ‘Kaşel37’ ve ‘Galaxy Gala’ elma çeşitlerinde yaklaşık 70bp’lik tek bir bant elde edilmiştir. ‘Gala’ ve ‘Golden Delicious’ elma çeşitlerinde yaklaşık 70bp ve 175bp’nde olmak üzere iki bant görülürken diğer elma çeşitlerinde (Aksakı, Mondial Gala, Vista Bella, Starkrimson, Royal Gala) ise yaklaşık 70bp, 175bp ve 200bp boyutlarında olmak üzere üçer bant görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.2).



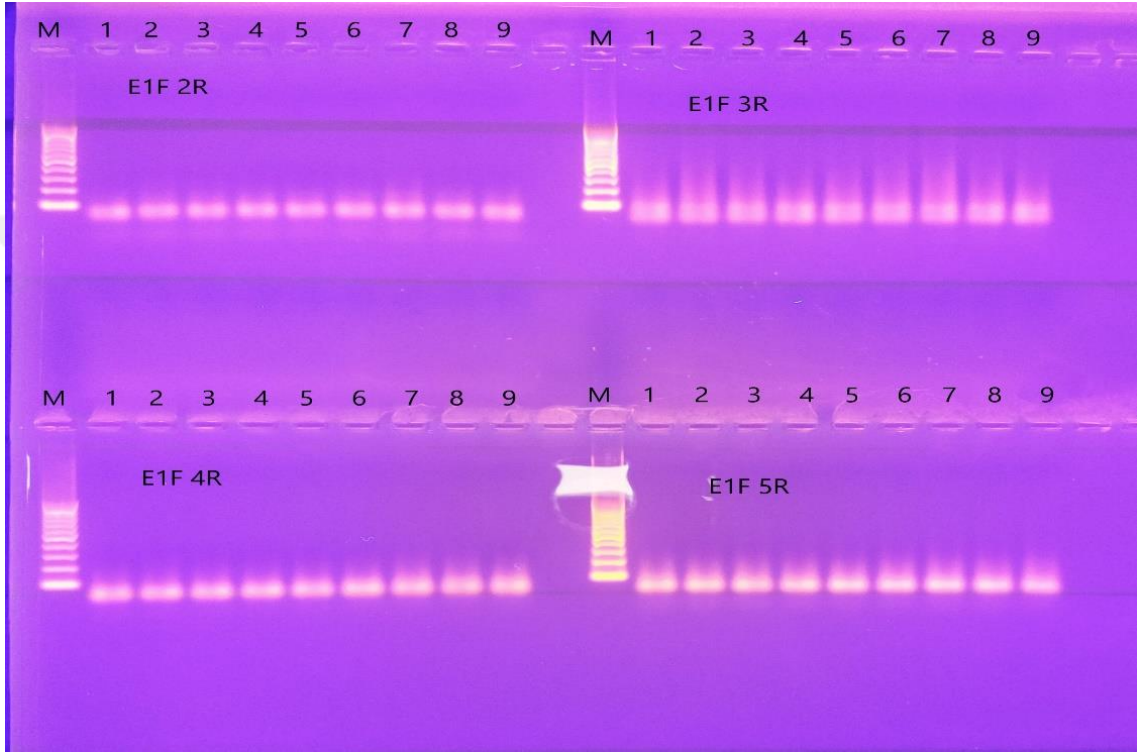
Şekil 4.2. E2F/2R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

E2F/3R primer çiftine ait jel görüntüsünde ise, ‘Aksakı’, ‘Mondial Gala’, ‘Kaşel37’, ‘Vista Bella’, ‘Starkrimson’, ‘Golden Delicious’, ‘Royal Gala’ elma çeşitlerinde yaklaşık olarak 280bp boyutunda belirgin bir bant elde edilirken ‘Gala’ ve ‘Galaxy Gala’ elma çeşitlerinde daha farklı bir görüntü elde edilmiştir (Şekil 4.3).



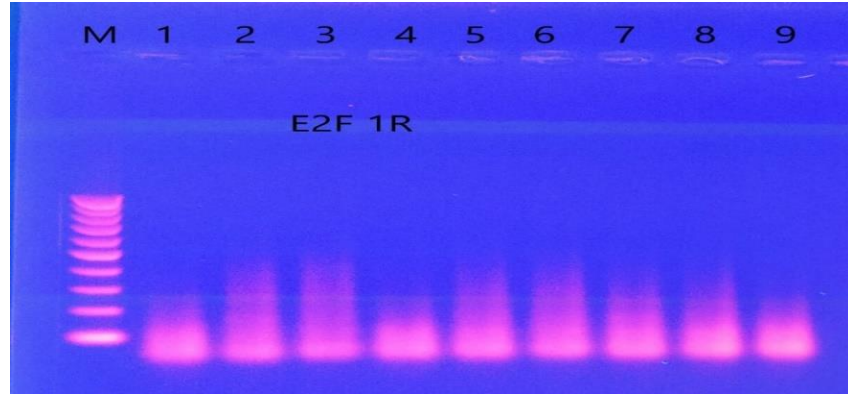
Şekil 4.3. E2F/3R primer çiftinin agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

E1F/2R, E1F/3R, E1F/4R ve E1F/5R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.4’de verilmiş olup çalışmada kullanılan 9 adet elma çeşidi arasında Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı yada hassas olduklarına yönelik herhangi bir farklılık arz edecek bant görüntüsü elde edilememiştir.



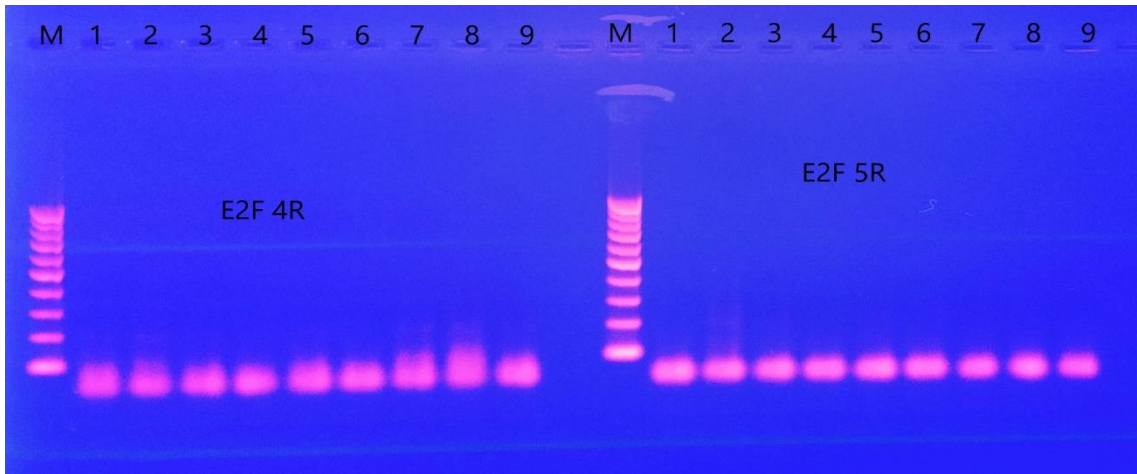
Şekil 4.4. E1F/2R, E1F/3R, E1F/4R ve E1F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

E2F/1R primer çiftinden elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5’de verilmiş olup çalışmada kullanılan 9 adet elma çeşidi arasında Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı yada hassas olduklarına yönelik herhangi bir farklılık arz edecek bant görüntüsü elde edilememiştir.

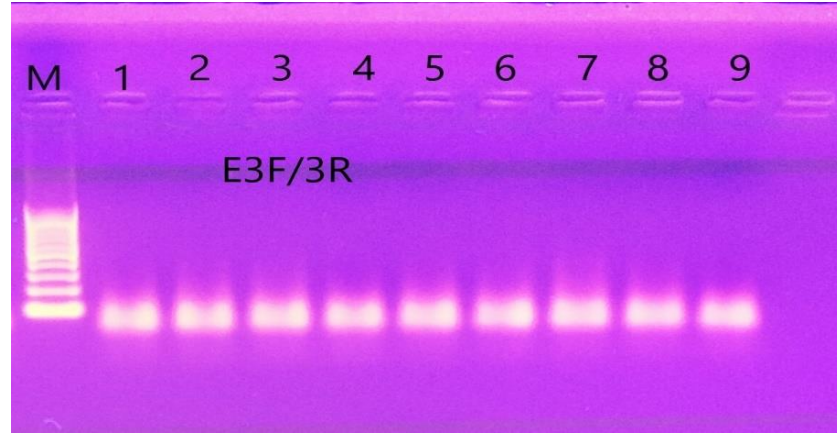


Şekil 4.5. E2F/1R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3- Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

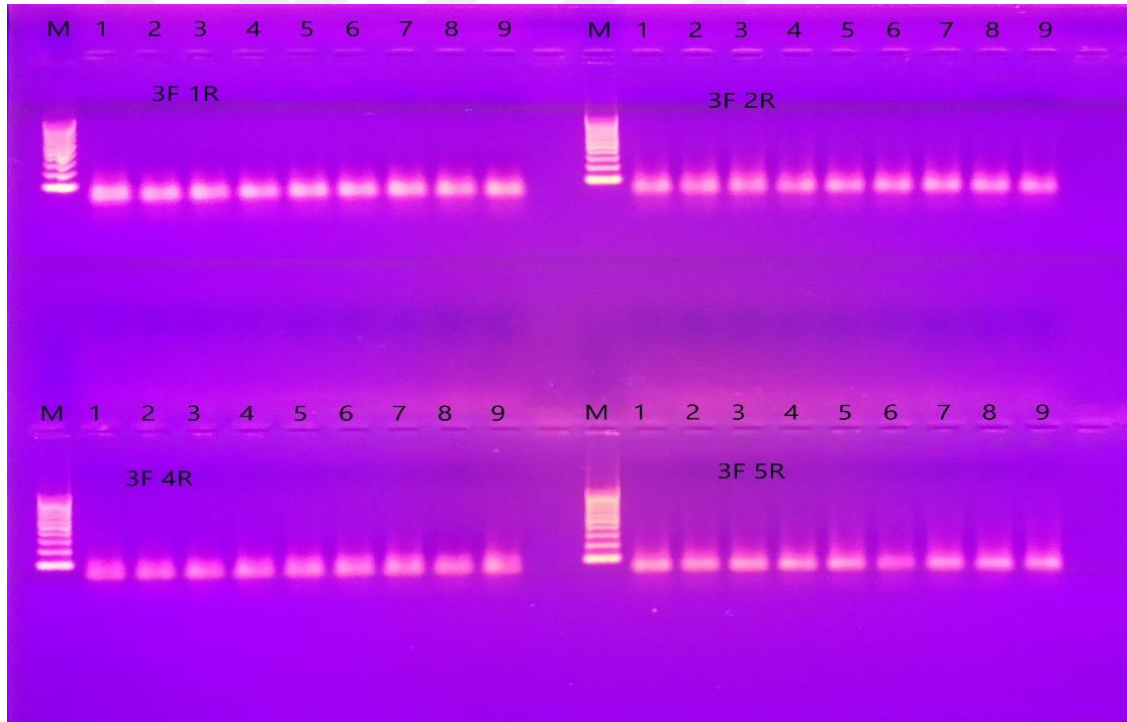
E2F/4R ve E2F/5R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.6'de; E3F/3R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.7'de; E3F/1R, E3F/2R, E3F/4R, E3F/5R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.8'de; E4F/4R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.9'da; ve E4F/1R, E4F/2R, E4F/3R, E4F/5R primer çifti kombinasyonlarından elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiş olup çalışmada kullanılan 9 adet elma çeşidi arasında Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı yada hassas olduklarına dair herhangi bir farklılık arz edecek görüntü tespiti mümkün olmamıştır.



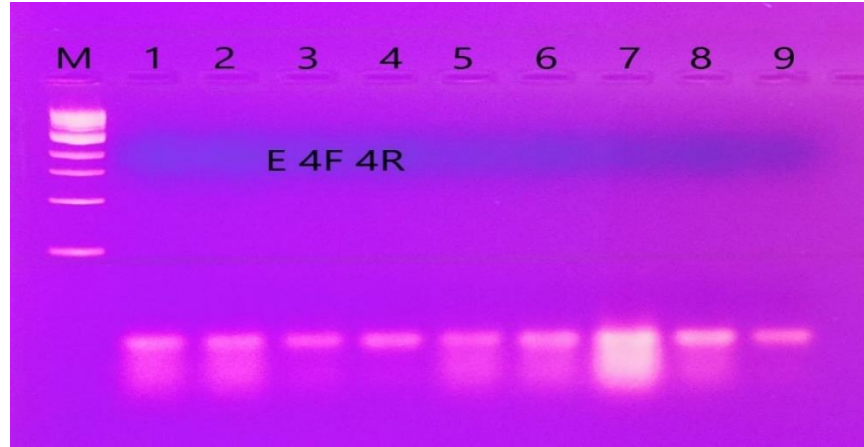
Şekil 4.6. E2F/4R ve E2F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)



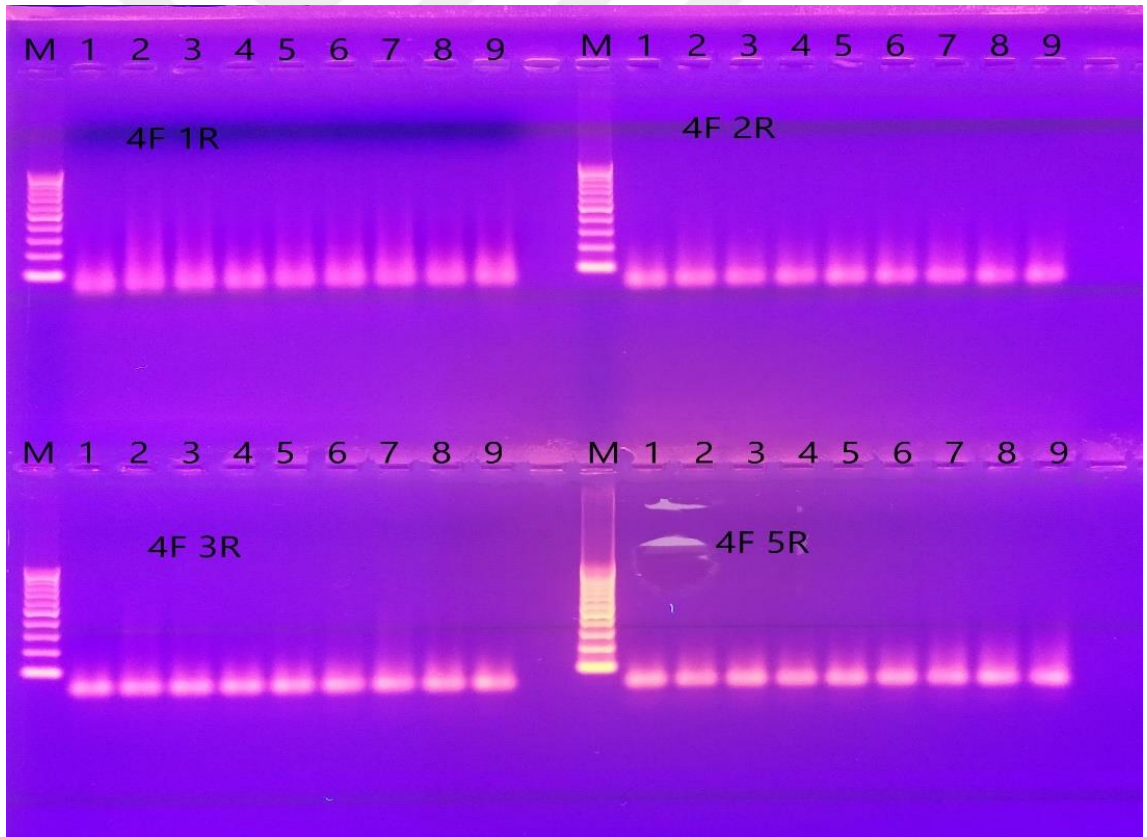
Şekil 4.7. E3F/3R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3- Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)



Şekil 4.8. E3F/1R, E3F/2R, E3F/4R, E3F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)



Şekil 4.9. E4F/4R primer çiftine ait agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3- Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)



Şekil 4.10. E4F/1R, E4F/2R, E4F/3R, E4F/5R primer çiftleri agaroz jel görüntüsü (M: marker, 1-Gala, 2- Aksakı, 3-Mondial Gala, 4- Kaşel37, 5-Vista Bella, 6-Starkrimson, 7-Golden Delicious, 8-Royal Gala, 9-Galaxy Gala)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meyvecilikte ıslah çalışmalarının uzun zamana yayılması ve yüksek maliyet gerektirmesi, Türkiye’de olduğu gibi bazı ülkelerde melezleme ve mutasyon ıslahının geri plana atılmasına neden olmuştur. Türkiye’de elma ile ilgili ıslah çalışmaları genel olarak seleksiyon ıslahı şeklinde yürütülmüştür. Ayrıca, yapılan çalışmalar kapsamlı bir program dahilinde yürütülmediği için süreklilik arz etmemiş, sadece tiplerin özellikleri belirlenmiş ve daha ileriye gidilememiştir. Elma yetiştiriciliğinde çeşit seçimi en önemli adımlardan birini oluşturmaktadır. Bu çalışmalar sonucu elde edilmiş çeşit adaylarının birçoğu değerlendirilememiştir. Ancak, Türkiye dışında pek çok ülke meyve yetiştiriciliğinde melezleme ıslahına gereken önemi vererek kendi ekolojilerine uygun çok sayıda çeşit ve anaç geliştirmişlerdir (Kaçal vd 2009; Atay vd 2010).

Diğer taraftan, elma türü gibi çok yıllık meyve türlerinde genetik yapılarının muhafaza edilebilmesi için vejetatif olarak çoğaltım tercih edilmektedir. Elma türünde ıslah çalışmaları oldukça zordur. Uzun bir gençlik kısırlığı periyodu, geniş bir bahçe alanı gerektirmesi ve bu alanlardaki yıllık bakım masraflarının fazlalığı çalışmaları zorlaştırmaktadır.

Son yıllarda, bitki ıslahı çalışmalarında daha kısa sürede sonuçlar elde etmek amacıyla DNA esaslı moleküler yöntemler daha fazla kullanılır olmuştur. Meyve kalitesi ve verim ile ilgili karakterlerle ilgili olarak ve hastalıklara dayanıklılıkla ilgili moleküler markörlerin kullanımı, erken seleksiyona olanak sağlama potansiyelindedir. Meyve türlerinde uygulanmakta olan bütün ıslah programlarında en çok üzerinde durulan konu hastalıklara dayanıklılıkla ilgili olmuştur.

Gerçekleştirilen bu çalışma, bir ön çalışma niteliğinde planlanmış olup, *Erwinia amylovora* etmenine karşı dayanıklı olan elma çeşitlerini ve genotiplerini erkenden belirleyebilecek moleküler belirteçleri tespit edebilmek için Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılık ile ilgili bulunan bir gen dizisinden (RLP1 geni) yararlanılmıştır. Bu gen

dizisinden primerler tasarlanmış ve bu primerler dokuz elma çeşidinde ('Gala', 'Ak Sakı', 'Mondial Gala', 'Kaşel37', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala', 'Galaxy Gala') taranmıştır. Çalışmada kullanılan 4 adet forward ve 5 adet reverse primerin karşılıklı olarak toplam 20 kombinasyonu değerlendirilmiştir. Sonuçta, 3 primer çiftine ait agaroz jel görüntüsünden Ateş yanıklığına dayanıklılık yada hassasiyet ile ilgili kullanılabilecek bilgiler elde edilmiştir.

E1F/1R primer çifti ile 'Kaşel37' ve 'Galaxy Gala' elma çeşitlerinin 'Gala', 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' çeşitlerinden ayırt edilebileği ortaya çıkmıştır.

Benzer şekilde, E2F/2R primer çifti yine 'Kaşel37' ve 'Galaxy Gala' elma çeşitlerinin belirgin şekilde diğer çeşitlerden farklı bant gösterimi elde edilmiştir. Ayrıca, bu primer çifti kullanımında 'Gala' ve 'Golden Delicious' elma çeşitlerinde çok azbir farklılıkla; 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson' ve 'Royal Gala' elma çeşitlerinde ayırt edilebilecek nitelikte bant verdiği gözlenmiştir.

Diğer taraftan, E2F/3R primer çiftine ait jel görüntüsünde ise, 'Aksakı', 'Mondial Gala', 'Vista Bella', 'Starkrimson', 'Golden Delicious', 'Royal Gala' elma çeşitlerinin yine belirgin şekilde Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılık yada hassasiyet ile ilgili bilgi eldesinde kullanılacak farklı bir bant yansımasıyla diğer elma çeşitlerinden ('Gala', 'Kaşel37' ve 'Galaxy Gala') ayrıldığı gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan elma çeşitlerine ait Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılıkla ilgili bilgilerin bulunduğu Çizelge 3.1 de, çoğunlukla klasik ıslah ve fenotipik değerlendirme sonuçlarına göre bir literatür değerlendirmesi yer almaktadır. Diğer taraftan, yıldan yıla değişen iklim şartları değişikliklerinde bile ateş yanıklığı etmenine dayanıklılık ve hassasiyet derecesinin değişiklik gösterdiğinden bahsedilmektedir (Koski and Jacobi 2018).

Bu çizelgedeki bilgilere göre, ‘Gala’ elma çeşidi çok hassas ve hassas olarak ve ‘Kaşel37’ ile ‘Galaxy Gala’ elma çeşitleri ise orta dayanıklılıkta ifade edilmiştir (Zwet 1996; Warner 1992; Hampson and Kemp 2003; Yılmaz ve Aysan 2009; Kost *et al.* 2015; Beckerman, 2018; Koski and Jacobi 2018). 2014 yılında Kellerhals vd tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Ateş yanıklığına dayanıklılık geni içerdiği ifade edilen ‘Malus x robusta’ yabani elma formundan hassas bir çeşit olarak ifade edilen ‘Gala’ elma çeşidine gen aktarımından bahsedilmektedir. 2015 yılında yapılmış olan bir gen aktarımıyla ilgili çalışmada, Norelli *et al.* (2003) ve (Turchek 2004) tarafından ‘Galaxy Gala’ çeşidi için Ateş yanıklığına hassas bir çeşit olduğu ifade edilmektedir (Kost *et al.* 2015). ‘Gala’ çeşidi ile ‘Royal Gala’ çeşidi, ‘Kidd’s Orange Red’ x ‘Golden Delicious’ melezlemesiyle elde edilmiş olan elma çeşitleri olup; ‘Galaxy Gala’ çeşidi ise ‘Gala’ grubu elma çeşitlerinden olan ‘Royal Gala’ elma ağacının doğal mutasyonu olarak ıslah edilen bir elma çeşididir (Kiddle 2006).

Sehic *et al.* (2009) tarafından yapılan bir moleküler değerlendirmede, AE10-375 ve GE-8019 SCAR primerlerinin (Khan *et al.* 2007) kullanılmasıyla ‘Vista Bella’ çeşidi ateş yanıklığına dayanıklı olarak ifade edilirken; ‘Golden Delicious’ çeşidi ise sadece AE10-375 isimli SCAR primeri (Khan *et al.* 2007) ile ateş yanıklığına dayanıklı olarak bildirilmiştir.

DNA esaslı moleküler belirteçlerin, morfolojik ve fenotipik değerlendirmelere göre daha doğru bilgi vermesi üzerine bir yorum yapılacak olursa; çalışmada kullanılan E1F/1R, E2F/2R ve E2F/3R primer çiftlerine ait elde edilen agaroz jel görüntülerinde yer alan ‘Vista Bella’, ‘Golden Delicious’ çeşitlerine ait bant bilgisine benzer olan ‘Ak sakı’, ‘Mondial Gala’, ‘Starkrimson’ ve ‘Royal Gala’ çeşitlerine ait bant ile aynı olması dolayısıyla bu elma çeşitlerinin Ateş yanıklığına dayanıklılık gen dizisini içerdiği bilgisinden bahsedilebilir.

Bu bilgilere göre bir değerlendirme yapılacak olursa; E1F/1R ve E2F/2R primer çiftleri agaroz jel görüntülerine göre muhtemelen ‘Kaşel37’ ve ‘Galaxy Gala’ elma çeşitleri hassas ve diğer elma çeşitleri dayanıklılıkla ilgili bir izlenim vermektedir. Diğer taraftan,

E2F/3R primer çiftine ait agaroz jel görüntüne göre; ‘Ak Sakı’, ‘Mondial Gala’, ‘Vista Bella’, ‘Starkrimson’, ‘Golden Delicious’, ‘Royal Gala’ elma çeşitlerinin Ateş yanıklığı etmenine dayanıklılık ile ilgili ve ‘Gala’, ‘Kaşel37’ ve ‘Galaxy Gala’ elma çeşitlerinin ise bu hastalık etmenine hassas olduklarına yönelik bir yorum çıkmaktadır.

Ateş yanıklığı hastalığının çok hassas ve hassas olarak farklı kaynaklarda ifade edilen ‘Gala’ çeşidinin E2F/3R primer çiftine ait bant görüntüsünün E1F/1R ve E2F/2R primer çiftleri agaroz jel görüntülerine göre farklılık arz etmesi durumu ise muhtemelen farklı allel görüntüsü ile ilgili olabilir ve bunun daha detaylı bir araştırma ile netleştirilmesi gerektiği bilgisi elde edilmiştir.

Sonuç olarak; çalışmada kullanılan E1F/1R, E2F/2R ve E2F/3R primer çiftlerinin *Erwinia amylovora* etmeninin neden olduğu Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı yada hassas olan elma çeşitlerini ve genotiplerini ayırt etmede kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Bu çalışma sonrasında, Ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı ve hassas olan elma çeşitleri ile genotiplerinin erkenden tespit edilebilmesine yönelik olarak ve beraberinde diğer yumuşak çekirdekli meyve türlerinden yine bu hastalık etmeni tarafından oldukça etkilenen armut ve ayva gibi ekonomik önemi olan meyve türlerinin de dahil edileceği bir çalışma planlanmaktadır. Bu hastalığa dayanıklılıkla ilgisi kanıtlanmış gen bölgelerinin kullanımıyla erken seleksiyona olanak tanıyacak DNA esaslı moleküler belirteçlerin meyve ıslahı çalışmalarına büyük kolaylıklar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgül, H., Dolunay, E.M., Özongun, Ş., Özyiğit, S., Atasay, A., Demirtaş, İ., Pektaş, M., Öztürk, G., Karamürsel, Ö.F., Sesli, Y., Göktaş, A., Gür, İ., Sarısu, H.C. ve Karaarslan, Z., 2005. Meyve Çeşit Kataloğu. Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Isparta.
- Aldwinckle, H.S. and Preczewski, J.L., 1976. 'Reaction of terminal shoots of apple cultivars to invasion by *Erwinia amylovora*, Phytopathology, 66, 1439-1444.
- Aldwinckle, H.S. and Beer, S.V., 1979. Fire blight and its control. Hortic. Rev, 1, 425-476.
- Anonim, 2014. Elma yetiştiriciliği. Isparta tarım, <https://isparta.tarim.gov.tr/Belgeler/Faydal%C4%B1%20Bilgiler/%E2%80%8BBitkisel%20Yeti%C5%9Ftiricilik/Meyve%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi/elm a%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf#search=elma%20yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi> (31.05.2018).
- Anonymous, 2018. Gala apple identification. <http://www.applename.com/varieties/gala> (02.06.2018).
- Aslantaş, R., 2014. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyve Türleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ders Notu, Erzurum
- Atasağun, R., 2009. Rosaceae familyasındaki farklı bitki türlerinden elde edilen *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.* 'nin biyokimyasal ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleriyle tanınması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Atay, N., Atay, E. ve Koyuncu, F., 2010. Dünya Elma Islah Programlarına Genel Bir Bakış (Derleme). Bahçe, 39(1), 31-44.
- Ballard, J., 2002. Apple Breeding Worldwide (Condensed PNWFTA) Report. www.hort.purdue.edu/newcrop/maia/newsletter/2002newsletter.pdf (Şubat,2009).
- Basım, H., 1999. *Erwinia amylovora* İzolatlarının Streptomisin ve Bakır'a Dayanıklılıkları ve Plazmid Profilleri. Su Ürünleri Ziraat Fakùltesi Dergisi, 12 (17), 22-30.
- Baştaş, K.K. ve Saygılı, H., 2008. Ateş Yanıklığı Hastalığı, Fire Blight, *Erwinia amylovora*. Bitki Bakteri Hastalıkları Kitabı, Editörler: Saygılı H., Şahin, F. ve Aysan, Y., 61-68.
- Beckerman, J., 2018. Fruit Diseases: Disease Susceptibility of Common Apple Cultivars, BP-132W. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/BP/BP-132-W.pdf>
- Bell, R.L., Quamme, H.A., Layne, R.E.C. and Skirvin, R.M., 1996. Fruit Breeding, Pears, Volume 1, 481.
- Breth, D.I., Bentley, A., Momol, M. T. and Aldwinckle, H.S., 1998. Alternative control measures for blossom blight in commercial apple and pear orchards. ISHS Acta Horticulturae 489: VIII International Workshop on Fire Blight.
- Brisset, M.N., Faize, M., Heintz, C., Cesbron, S., Chartier, R., Tharaud, M. and Paulin, P.J., 2002. Induced resistance to *Erwinia amylovora* in apple and pear. Acta Hort, 590, 335-338.

- Calenge, F., Drouet, D., Weg, W.E., Brisset, M.N., Paulin, J.P. and Durel, C.E., 2004. QTL analysis of the genetic architecture determining resistance to fire blight in an apple progeny. *Acta Hort*, 663, 141-146.
- Calenge, F., Drouet, D., Denance, C., Weg, W.E., Brisset, M.N., Paulin, J.P. and Durel, C.E., 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theor. Appl. Genet*, 111, 128-135.
- Ceylan, F.B., 2008. Bodur Ve Yari Bodur Anaçlar Üzerine Aşılı Bazı elma Çeşitlerinin Niğde Ekolojik Şartlarında Fenolojik Ve Pomolojik Özelliklerinin Tespiti. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi
- Conner, P.J., Brown, S.K. and Weeden, N.F. 1998. Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 1027-1035.
- Dandekar, A.M., Teo, G., Defilippi, B.G., Uratsu, S.L., Passey, A.J., Kader, A.A., Stow, J.R., Colgan, R.J. and James, D.J., 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Trans Res* 13, 373-384.
- Demir, G. and Gündoğdu, M., 1993. Fireblight of pome fruit in Turkey: Distribution of the disease, chemical control of blossom infections and susceptibility of some cultivars. *Acta Horticulturae*, 338.
- Dondini, L., Pierantoni, L., Gaiotti, F., Chiodini, R., Tartarini, S., Bazzi, C. and Sansavini, S., 2004. Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. *Mol. Breed*, 14, 407-418.
- Dumanoglu, H., Aygün, A., Erdoğan, V., Serdar, Ü., Kalkışım, Ö., Pakyürek, M.A. ve Maden, S., 2016. Doğu Karadeniz Bölgesi Sahil Kuşağındaki Elma Genetik Materyalinin Mikro Çoğaltım Potansiyelinin Belirlenmesi.
- Eltez, M. ve Kaşka, N., 1985. Niğde Yöresinde Her Yıl Meyve Veren Üstün Özellikte Kaşel-Amasya elma Türlerinin Seleksiyonu. *Doğa Bilim Dergisi*, 1-9.
- Fischer, M. and Fischer, C., 1999. Evaluation of *Malus* species and cultivars at the Fruit Genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genet. Resour. Crop Evol*, 46, 235-241.
- Fischer, M. and C. Fischer, 2002. The Dresden-Pillnitz Long-Term Apple Breeding Program and its Results. *The Compact Fruit Tree* 35(1), 21-25.
- Fischer, M. and C. Fischer, 2008. The Pillnitz Re-Series of Apple Cultivars-Do They Hold Promise?-80 Years of Professional German Fruit Breeding. *Erwerbs-Obstbau* 50, 63-67.
- Fucikovsky, L., 1987. Present Status and new occurrences of fire blight. *Neuvletter*, January.
- Gardiner, S.E., Norelli, J.L., Silva, N., Fazio, G., Peil, A., Malnoy, M., Horner, M., Bowatte, D., Carlisle, C., Wiedow, C., Wan, Y., Bassett, C.L., Baldo, A.M., Celton, J.M., Richter, K., Aldwinckle, H.S. and Bus, V.G.M., 2012. Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* 'Robusta 5' accessions. *BMC Genetics*, 13, 25.
- Gökçe, G., ve Usta, C., 2013. Biyolojik Kontrol, Organik Tarım ve Çevre Kirlenmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 63-67.
- Hale, C.N., Taylor, R.K., Clark, R.G. and Batchelor, T.A., 1996. Quarantine and market access, Fire Blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and

- Control, P. Sobiczewski, T. Deckers, and J. Pulawska (Eds.), Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, 84 p, Poland.
- Hampson, C.R. and Kemp, H., 2003. Characteristics of Important Commercial Apple Cultivars. In Apples Books, CABI Publishing, Cambridge, 61-89.
- Hancock, J.F., Luby, J.J., Brown, S.K. and Lobos, G.A., 2008. Apples (Chapter 1). <https://www.researchgate.net/publication/257826786>
- James, D.J., Passey, A.J., Barbara, D.J. and Bevan, M.W., 1989. Genetic transformation of apple [*Malus pumila* Mill.] using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep* 7, 658-661.
- James, D.J., Uratsu, S.L., Cheng, J., Negri, P., Viss, P. and Dandekar, A.M., 1993. Conditions that induce *Agrobacterium* Vir genes also enhance apple cell transformation. *Plant Cell Rep* 12, 559-563.
- Janick, J., Cummins, J.N., Brown, S.K. and Hemmat, M., 1996. Apples. In: Janick J, Moore J (eds.) *Fruit Breeding, Vol.I: Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons, 1-77, New York.
- Johnson, K.B., 2000. Fire blight of apple and pear. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0726-01 Updated 2015, <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx> (31.05.2018).
- Kaçal, E., Öztürk, G., Atay, N., Sarisu, C., Özongun, Ş., Atay, E., Emre, R.A., Yürekli, Ö. Karamürsel, Ö. F., 2009. Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü elma Islah Çalışmaları. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2 (1):57-60,
- Kaplan, N., Özcan, M. and Çelik, M., (2003). Clonal Selection in Apple (*Malus domestica* Borkh cv. Amasya) *Pakistan Journal of Botany* 35 (4): 571-578.
- Karşı, T. ve Arslantaş, R., 2016. Erzurum’da Yetiştirilen Bazı Elma (*Malus communis* L.) Çeşitlerinin Fenolojik, Pomolojik Ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2016 ISSN: 1300-9036. 47(1), 11-21.
- Keck, M., Chartier, R., Lecomte, P., Reich, H. and Paulin, J.P., 1997. First characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Australia and fire blight susceptibility of some apple genotypes from Central Europe. *Pflanzenkrank, Pflanzenschutz*, 104, 17-22.
- Kellerhals, M., Schutz, S., Baumgartner, I.O., Schaad, J., Kort, T., Broggini, G. and Patocchi, A., 2014. Breeding fire blight resistant apple varieties. *Agrarforschung Schweiz*. 5(10): 414-421
- Khan, M.A., Duffy, B., Gessler, C. and Patocchi, A., 2006. QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Molecular Breeding*, 17, 299-306.
- Khan, A.M., Durel, C.E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C. and Patocchi, A. (2007): Development of molecular markers linked to the ‘Fiesta’ linkage group 7 major QTL for fireblight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome*, 50: 568–577
- Kiddle, K.W., 2006. Apple (*Malus* Mill.): *Galaxy*. *Plant Varieties Journal*, 59, 1-2.
- Kleinhempel, H., Kegler, H., Fiçke, W. and Schaefer, H.J., 1984. Methods of testing apples for resistance to fireblight. *Açta Horticulturae* 151, 261-265.
- Korban, S.S., Ries, S.M., Klopmeier, M.J., Morrissey, J.F. and Hattermann, D.R., 1988. Genotypic response of scab-resistant apple cultivars/selections to two strains of

- Erwinia amylovora* and the inheritance of resistance to fire blight. *Ann. Appl. Biol.* 113, 101-105.
- Koski R.D. and Jacobi W.R., 2018. Fire Blight 2907. Colorado state University Extension.
<http://extension.colostate.edu/topic-areas/yard-garden/fire-blight-2-907/>
 (20.06.2018)
- Kost, T. D., Gessler, C., Jansch, M., Flachowsky, H., Patocchi, A., and Broggini, G. A. (2015). Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLOS ONE*. 10(12), article number: e0143980
- Kotan, R., Şahin, F. and Ala, A., 2006. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113 (1) Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer GmbH, 8-13.
- Layne, E.C. and Quamme, H.A., 1975. *Advances in Fruit Breeding*, ed: Janick. J. and Moore, J., 39-70.
- Leonberger, K. and Gauthier, N.W., 2017. Fire Blight Symptoms Now Visible. *Kentucky Pest News*, <https://kentuckypestnews.wordpress.com/2017/05/15/dont-get-burned-by-fire-blight-disease-management-begins-now/> (31.05.2018)
- Li, G. and Quiros, C.F., (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and applied genetics*, 103(2-3), 455-461.
- Liebhart, R., Koller, B., Gianfranceschi, L. and Gessler, C., 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh) genome. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1497-1508.
- Lynd, M., 2008. Great Moments in Apple History. www.hort.purdue.edu
- Maden, S. ve Toros, S., 1991. *Tarımsal Savaşım ve Yöntemleri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Maximova, S.N., Dandekar, A.M. and Gultinan, M.J., 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol Biol* 37, 549-559.
- Mirik, M., 2000. Amasya ve Tokat İllerinde Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Ateş Yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*) Hastalığının Yaygınlık Oranı, Duyarlı ve Dayanıklı Çeşitlerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Moller, W.J., Schroth, M.N. and Thomson, S.V., 1981. The scenario of fire blight and streptomycin resistance (*Erwinia amylovora*; California; USA), *Plant Diseases* 65, 563-68, USA.
- Momol, T.M., Yeğen, O., Basım, H. and Rudolph, K., 1992. Identification of *Erwinia amylovora* and the occurrence of fire blight of pear in Western Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Turkish Phyto.* 21(1), 41-47.
- Nemeth, J., 1999. Fireblight (*Erwinia amylovora*) of pome fruits in Hungary: national phytosanitary measures and management of the disease. *EPPO Bulletin* 29, 135-144.

- Norelli, J.L., Jones, A.L. and Aldwinckle, H.S., 2003. Fire blight management in the twenty first century: using new techniques that enhance host resistance in apple. *Plant Disease* 87, 756-765.
- Oktem, Y.E. ve Benlioğlu, K., 1988. Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Görülen Ateş Yanıklığı Hastalık Etmeni (*Erwinia amylovora* (Burr.)) üzerinde çalışmalar, Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 71, Antalya.
- Öden, S. and Alp, Ş., 1994. Investigations on the Fire Blight Infection in Pome Fruits Grown in Van and Around, 9. Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 531-533, Kuşadası-Aydın.
- Öz, F., Bulagay, A.N., Büyükyılmaz, M. Ve Burak, M., 1998. Elma çeşit kataloğu, Editör (Akçay, M.). Yayın Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeke, E. ve İsfendiyoğlu, M., 2004. Ilıman İklim Meyve Türleri (Yumuşak Çekirdekli Meyveler). Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 556, Bornova/İzmir.
- Özkan, Y. ve Celep, C. 1995. Tokat İlinde Yetiştirilen Yerel Elma Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma, GOÜ Z.F. Dergisi, 12(1), 8-14.
- Özongun, Ş., Dolunay, E.M., Öztürk, G., Karakuş, A., Kankaya, A. ve Küden, A., 2004. Elma Adaptasyon Denemesi I (Sonuç raporu), T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Eğirdir/Isparta.
- Öztürk, G., Basım, E., Basım, H., Emre, R.A., Karamürsel, Ö.F., Eren, İ., İşçi, M. ve Kaçal, E., 2011. Kontrollü melezleme yoluyla ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) hastalığına karşı dayanıklı yeni armut çeşitlerinin geliştirilmesi: İlk meyve gözlemleri. VI. Bahçe Bitkileri Kongresi, 04-08.
- Öztürk, B., Keskin, S., Yıldız, K., Kaya, Ö., Kılıç, K. ve Uçar, M., 2013. Erzincan koşullarında yetiştirilen 'Ak Sakı'elma çeşidinin depolama performansı üzerine hasat öncesi naftalen asetik asit ve aminoetoksivinilglisin uygulamalarının etkileri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2013(1).
- Pejchinovski, F.D., 1996. Fire blight in Republic of Macedonia (distribution and control), Fire Blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and Control, P. Sobiczewski, T. Deckers, and J. Pulawska (Eds.), Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, 84 p, Poland.
- Rodoni, B.C., Merriman, P.R., McKirdy, S.J. and Wittwer, G., 2006. Costs Associated with Fire Blight Incursion Management and Predicted Costs of Fututre Incursions. *Acta Horticulturae* 704, 55-61.
- Sansavini, S., Donati, F., Costa, F. and Tartarini, S., 2004. Advances in Apple Breeding For Enhanced Fruit Quality and Resistance to Biotic Stresses: New Varieties for The European Market. *J. Fruit Ornam. Plant Res. Special Ed.* 12, 13-52.
- Sehic J., Nybom H., Garkava Gustavsson L., Patocchi A., Kellerhals M., Duffy B., 2009. Fire blight (*Erwinia amylovora*) resistance in apple varieties associated with molecular markers. *International Journal of Horticultural Science*, 15 (1-2). https://www.researchgate.net/publication/280133447_Fire_blight_Erwinia_amylovora_resistance_in_apple_varieties_associated_with_molecular_markers (30.06.2018).
- Sletten A. and Rafoss, T., 2006. Fire blight in Norway - An assessment of the plant health risk for the plant disease fire blight in Norway. *Bioforsk Report* Vol. 2 No. 13

2007. Commissioned by the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM). See Appendix.
- Turchek W.W., 2004. Apple Diseases and their Management. In: Naqvi SAMH, editor. Diseases of Fruits and Vegetables. Springer. pp. 35–35.
- Tokgönül, S., 1991. Doğu Akdeniz Bölgesinde Elma, Ayva ve Yenidünyalarda Ateş Yanıklığı Hastalığı (*Erwinia amylovora* Burr Winslow *Et al.*) Üzerinde Çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni.
- Toth, M., Kasa, M., Göndör, M., Honty, K. and Hevesi, M., 2006. First Results of Fire Blight Resistance Screening in A Hungarian Apple Breeding Programme. *Acta Horticulturae* 704, 545-549.
- Ünlü, A., 2002. Türkiye'deki *Erwinia amylovora* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Bu İzolatların Patolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Antalya.
- Vanneste, J.L., 2000. What is Fire Blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to Control It pp 1-6. In: Fire Blight The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Edited by J.L. Vanneste. CABI Publishing UK 2000.
- Warner, J., 1992. Field susceptibility of 68 apple cultivars to cedar apple rust, quince rust and hawthorn rust. *Fruit Varieties Journal* 46, 6-10.
- Webster, A.D. and Wertheim, S.J., 2003. Apple rootstocks. In Ferree DC and Warrington IJ (ed.) *Apple: botany, production and uses*. CABI Publishing, Cambridge, 91-124.
- Yılmaz, M.A. ve Aysan, Y., 2009. *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığının elmalardan izolasyonu, belirtileri, yayılması ve mücadelesi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(1), 75-77.
- Zwet, T. and Keil, H.L., 1979. Fire Blight A Bacterial Disease Of Rosaceous Plants. *Agriculture Handbook USA Dept. of Agr*, Washington: 200, 510.
- Zwet, T., 1992. Worldwide Spread and Present Distribution of Fire Blight- An Update, *Acta Hort*, 338, 2931.
- Zwet, T. and Beer, S.V., 1995. Fire Blight–Its Nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management, US Department of Agriculture, *Agriculture Information Bulletin*, 91.
- Zwet, T., 1996. Present Worldwide distribution of fireblight. *Acta Horticulturae* 411.

ÖZGEÇMİŞ

Şahin KAYA, 06/06/1990 tarihinde Erzurum'un Tortum ilçesinde doğdu. İlköğretimini 2004 yılında Erzurum ili Tortum ilçesinde Şehit Hasan Karşı İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2007 yılında Erzurum ili Tortum ilçesinde Tortum Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 05/09/2008 tarihinde başladığı lisans eğitimini 15/06/2012 tarihinde Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.