

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2014-YL-063

**SÜRGÜN UCU VE TERMOTERAPİ YÖNTEMLERİ İLE
İNCİR MOZAIK HASTALIK ETMENLERİNDEN
ARINDIRILMIŞ VE TEK BASAMAKLI RT-PCR İLE
TESTLENMİŞ, SARILOP VE BURSA SİYAHİ İNCİR
ÜRETİM MATERYALİNİN ELDE EDİLMESİ**

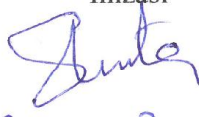


Gülçin SÜMER

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gülçin SÜMER tarafından hazırlanan “Sürgün Ucu ve Termoterapi Yöntemleri ile İncir Mozaik Hastalık Etmenlerinden Arındırılmış ve Tek Basamaklı RT-PCR İle Testlenmiş, Sarılop ve Bursa Siyahı İncir Üretim Materyalinin Elde Edilmesi” başlıklı tez, 24.10.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. Nejla YARDIMCI	SDÜ	
Üye : Doç. Dr. Ömer ERİNCİK	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

24/10/2014

Gülçin SÜMER

ÖZET

SÜRGÜN UCU VE TERMOTERAPİ YÖNTEMLERİ İLE İNCİR MOZAİK HASTALIK ETMENLERİNDEN ARINDIRILMIŞ VE TEK BASAMAKLI RT-PCR İLE TESTLENMİŞ, SARILOP VE BURSA SİYAHİ İNCİR ÜRETİM MATERYALİNİN ELDE EDİLMESİ

Gülçin SÜMER

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2014, 52 sayfa

İncir (*Ficus carica* L.) ülkemiz ve Aydın yöresi için ekonomik önemi yüksek meyve türlerinden birisidir. Ticari açıdan önem taşıyan kurutmalık çeşit Sarılop ve sofralık çeşit Bursa Siyahı'nın fidan üretiminde son yıllarda önemli bir artış gözlenmektedir. İncir üretimi yapılan hemen her yerde, özellikle subtropik ve ılıman iklime sahip Akdeniz ülkelerinde İncir Mozaik Hastalığının yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. Hastalıkla bulaşık bitkilerin genç yapraklarında dağınık sarı yeşil lekeler görülmesi tipik belirtiler arasındadır. Şiddetli mozaik belirtileri görüldüğünde zamansız meyve ve yaprak dökülmeleri ekonomik kayıplara neden olmaktadır. İncir Mozaik Hastalığına neden olan etmenler, üretim materyalleri ile sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir. Bu nedenle İncir Mozaik Hastalığından korunmada en etkili yollardan birisi viral etmenlerinden temiz üretim materyali elde edilmesidir. Birçok bitki türünün klonal üretiminde, meristem ve sürgün ucu kültürlerinin kullanılması ile virüsten ari bitkilerin elde edilmesi, İncir Mozaik Hastalık etmeninden ari incir fidan üretimine yönelik çalışmaların yapılmasına da olanak sağlamıştır. Ancak, İncir Mozaik Hastalığına neden olan viral etmenlerin belirlenmesi ve sekans analizlerinin yapılması son yıllarda mümkün olduğu için, virüslerden temiz incir üretim materyalinin elde edildiği çalışmalarda viral etmenlerden arındırıldıklarını gösteren moleküler testler uygulanamamıştır. Bu nedenle İncir viral etmenlerinden sürgün ucu ve termoterapi yöntemleri ile arındırılmış ve temiz olduğu Tek Basamaklı RT-PCR ile test edilerek belirlenmiş Sarılop ve Bursa Siyahı incir üretim materyalinin elde edilmesi bu çalışmanın

amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla, incir viral etmenleri, İncir Mozaik Virüsü (FMV, Fig Mosayic Virüs), İncir Yaprak Leke İlişkili Virüs-1 (FLMaV-1, Fig Leaf Mottle Associated Virus-1),İncir Yaprak Leke İlişkili Virüs-2 (FLMaV-2, Fig Leaf Mottle Associated Virus-2),İncir Mozaik İlişkili Virüs-1 (FMaV-1, Fig Mosaic Associated Virus-1), İncir Mozaik İlişkili Virüs-2 (FMaV-2, Fig Mosaic Associated Virus-2), İncir Kriptik Virüs (FCV, Fig Cryptic Virus), İncir Latent Virüs-1 (FLV-1, Fig Latent Virus-1), Arkansas İncir Closterovirüs -1 (AFCV-1, Arkansas Fig Closterovirus-1),İncir Badna Virüs-1 (FBV-1, Fig Badna Virus-1)' in primerleri kullanılarak yapılan Tek Basamaklı RT-PCR ile FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1' ile bulaşık olduğu saptanan Sarılop ve Bursa Siyahı incir anaçlarından kültüre alınan sürgün uçlarına termoterapi uygulanmıştır. Elde edilen bitki eksplantların anaçlarında saptanan viral (FMV, FMaV-1,FMaV-2, FBV-1) etmenlerden arındırılmış olup olmadığı Tek Basamaklı RT-PCR ile test edilmiştir. Bu test sonucu FBV-1 saptanan iki explant örnek hariç FBV-1 ile birlikte diğer etmenlerin elemine edilmiş olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: '*Ficus carica* L.' 'Sarılop', 'Bursa Siyahı', Sürgün Ucu, Termoterapi, İncir Mozaik Hastalığı Etmenleri, Tek Basamaklı RT-PCR

ABSTRACT**ELEMINATION OF FIG MOSAIC DISEASE AGENTS BY THE
METHODS OF SHOOT TIP AND THERMOTHERAPY AND
TESTING OF SARILOP AND BURSA SIYAHİ FIG PRODUCTION
MATERIAL BY ONE STEP RT-PCR**

Gülçin SÜMER

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2014, 52 pages

Fig (*Ficus carica* L.) is one of the fruit species that is economically important for our contry and Aydın region. A significant increase is observed fort he production of seedlings of serving Bursa Siyahı type and dried Sarılop which is an important commercial kind in recent years. It has been widely reported that the fig mosaic disease is existing especially in subtropical and temperate climate. Mediterranean countries and everywhere that fig production is made. The typical symptom of the disease involved plants are scattered yellow and gren spots on the young leaves. Fruit and leaf losses cause the economic losses when severe mosaic symptoms are observed. Fig Mosaic Disease can be transported to the healthy plants with the production materials. Therefore, one of the most effective ways of protection from the Fig Mosaic Disease is the obtain of the production materials which are purified viral agents. In the clonal production of many plant species the obtainment of the virus free plants with the use of meristem and shoot tip culture provide opportunities to the practise of productin of purified fig seedlings from the fig mosaic disease agent. However, the viral factors which cause the determination of the viral factors which cause fig mosaic disease and possibility of making sequence analysis the moleculer tests which shows purification of the viral elements that are produced from purified fig production materials couldn't be applied. The obtain of the Sarılop and Bursa Siyahıvirüs free fig propagation material of with thermotherapy and shoottip and which are tested with the One Step RT-PCR is the aim of this study. For this purpose thermoteraphy is applied to the tip of the culture of the rootstocks of the transmitted Sarılop and Bursa Siyahı fig with the One Step RT-PCR with FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1 using the primers of the fig viral agents , Fig Mosaic Virus (FMV), Fig Mosaic associated

Virus-1 (FMaV-1), Fig Mosaic associated Virus-2(FMaV-2), Fig Banda Virus-1 (FBV-1), Fig Leaf Mottle associated Virus-1 (FLMaV-1), Fig Leaf Mottle associated Virus-2 (FLMaV-2), Fig Cryptic Virus (FCV), Fig Latent Virus-1 (FLV-1), Arkansas Fig Closterovirus-1 (AFCV-1). The obtain of the plant explants of rootstocks are tested with the One Step RT- PCR whether they are free from the viral agents (FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1). With the result of this test except two identified FBV sample explants, the other elements with FBV-1 the elimination of other agents have been identified.

Key Words: Fig, *Ficus carica*, fig mosaic disease , thermotherapy, One Step RT-PCR, plant tissue culture.

ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (ZRF-13027 numaralı proje) desteklenen araştırmamız, ülkemizde ve dünyada incir üretimi açısından çok önemli paya sahip Bursa Siyahı ve Sarılop incir çeşitlerinde sürgün ucu kültürü-termoterapi yöntemlerini kullanarak virüsten temiz Sarılop ve Bursa siyahı incir üretim materyalleri elde etmeye yönelik olarak hazırlanmıştır.

Çalışmamda bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ' e ,

Tezimin doku kültürü aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Gonca G. DALKILÇ ve Arş. Gör. Damla TURAN' a

Total nükleik asit ekstraksiyonu ve PCR aşamalarında bana destek olan Prof. Dr. Murat SİPAHİOĞULU'na, Dr. Mustafa USTA' ya, Uzm. Biyolog Mehmet ÖZTÜRK'e,

İncir materyali temini için Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü çalışanlarına,

Termoterapi işlemi için bana yardımcı olan Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü çalışanlarına,

Bana tezim boyunca destek olan başta ANNEM olmak üzere, iş verenim Murat ÇAKIR' a, Zir. Müh. Melis TÖNGÜŞLÜ'ye, Araş. Gör. Seviye DEMİR'e, Sayın Hocam Doç. Dr. Recep KOTAN' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Doku Kültürü ve Yüzeysel Sterilizasyon.....	21
3.2.2. Termoterapi	24
3.2.3.Köklendirme	25
3.2.4. Aklimatizasyon	25
3.2.5.Total Nükleik Asit İzolasyonu	25
3.2.6. Tek Basamaklı RT-PCR.....	26
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforez ve Görüntüleme.....	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	31
4.1.Doku Kültürü Çalışmaları	31
4.1.1. Termoterapi Çalışmaları.....	35
4.1.2. Köklendirme Çalışmaları	35
4.2.Tek Basamaklı RT-PCR.....	35
4.2.1. Anaç Bitkilerde İncir Mozaik Etmenlerinin Belirlenmesi	32
4.2.2. Sürgün Ucu ve Termoterapi Uygulanan Bitkiciklerde, Anaçlarında Belirlenen İncir Mozaik Etmenlerinin Belirlenmesi	38
5. SONUÇ	45

KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	52

SİMGELER DİZİNİ

AFCV-1	:Arkansas Fig Closterovirus-1
AFCV-2	:Arkansas Fig Closterovirus-2
BAP	:Benzylaminopurin
FBV-1	:Fig Badna Virus-1
FCV	:Fig Cryptic Virus
FLMaV-1	:Fig Leaf Mottle associated Virus-1
FLMaV-2	:Fig Leaf Mottle associated Virus-2
FLV-1	:Fig Latent Virus-1
FMaV-1	:Fig Mosaic associated Virus-1
FMaV-1	:Fig Mosaic associated Virus-1
FMaV-2	:Fig Mosaic associated virus-2
FMMaV	:Fig Mild Mottle associated Virus
FMV	:Fig mosaic virus
GA	:Giberellic Acid
IBA	:Indole-3-Butyric Acid
M	:Molar
mg	:Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MP	:Pontikis ve Melas
MS	:Murashige and Skoog
WPM	:Woody Plant Medium
μ L	:Mikrolitre
μ M	:Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. İncir Mozaik Hastalığının incir yaprağında oluşturduğu belirtiler; a) İncir yapraklarında dağınık sarı yeşilden açık sarıya kadar değişen lekeler b) Leke kenarlarında görülen nekrozlar 9
- Şekil 3.1 İncir sürgün ucu yüzeysel sterilizasyonu ve MS ortamına aktarım aşamaları a)Sürgün ucu alma b)Sürgün uçlarının kaba pisliklerinden arındırılması c)Sürgün uçlarının etil alkolde bekletilmesi d) Sürgün uçlarının durulanması e) Yüzeysel sterilizasyondan sonra 2-3 yaprak taslağı içeren apikal meristemler f) Sürgün uçlarının MS (Murashige ve Skoog) besin ortamına aktarılması 23
- Şekil 3.2. Kallus oluşumu gözlenen bitkilerde termoterapi işlemi..... 25
- Şekil 3.3. Tek Basamaklı RT-PCR işleminde negatif kontrol olarak kullanılacak tohumdan yetiştirilmiş incir çöğürleri 27
- Şekil 4.1. Sürgün ucu kültürü ile incir bitkicliği elde edilmesi a) Kallus oluşumu gözlemlenmeyen Bursa siyahı b) Kallus oluşumu gözlemlenen Sarılop..... 31
- Şekil 4.2. Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar sonucu ölen incir bitkicikleri a)Bakteriyel enfeksiyon b)Fungal enfeksiyon 32
- Şekil 4.3. Altı haftalık termoterapi sonucunda strese girerek kuruyan incir bitkicikleri..... 33
- Şekil 4.4. Tepe tomurcuğu oluşan Bursa Siyahı incir bitkileri 33
- Şekil 4.5. İncir sürgünlerinin alındığı anaç bitki örneklerinde FMV, FCV, FLMaV-2, FLV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü 37
- Şekil 4.6. İncir sürgünlerinin alındığı anaç bitkilerdeki FLMaV-1, FMaV-1, FMaV-2, AFCV-1, FBV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü 38
- Şekil 4.7. Doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilmiş incir bitkilerinin FLMaV-1, FMaV-2, FBV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü..... 40
- Şekil 4.8. Doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilmiş incir bitkilerinin FMV primeri ile yapılmış RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca incir üreticisi ülkelerin son yıllarda sahip oldukları yaş incir üretim miktarları	2
Çizelge 1.2. 2007-2013 Dünya kuru incir üreten ülkelerin, son yıllarda ürettikleri kuru incir üretim miktarları (Ton)	4
Çizelge 1.3. Türkiye'nin bölgelere göre incir üretimi ve ağaç sayısı.....	6
Çizelge 1.4. Türkiye'nin illere göre incir üretimi ve ağaç sayısı	7
Çizelge 1.5. Dünya'da ve Türkiye'de İncir Mozaik Hastalığı etmenlerinin belirlendiği çalışmalar	10
Çizelge 2.1. RT-PCR da kullanılacak primerlere ait diziler, koşullar, elde edilecek ürünün moleküler ağırlıkları	15
Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962)temel besin ortamı içeriği	24
Çizelge 3.2. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit RT-PCR koşulları	28
Çizelge 4.1. Anaç bitki yaprak örnekleri ve bu anaçlardan doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilen bitkiciklere uygulanan Tek Basamaklı RT-PCR sonuçları.....	42

1.GİRİŞ

İncir Anadolu'da insanlık tarihi kadar eski devrelere dayanan kültür meyveleri içinde, en eski gelişme tarihine sahip meyvelerden biridir. İncirin anavatanı Türkiye olup, buradan Suriye, Filistin ve daha sonra da Ortadoğu üzerinden Çin ve Hindistan'a yayılmıştır. İncirin özel dölleme ve kendine özgü kurutma şartları isteyen bir meyve olması nedeni ile dünya üzerinde yetiştiği bölgeleri sınırlı kılmaktadır. İncir, her ne kadar subtropik bir meyve olsa da geniş ekolojik uyum kabiliyeti nedeniyle yurdumuzun tüm sahil kuşağında ticari olarak yetiştirilmekte olup, incir üretiminde Büyük ve Küçük Menderes havzalarında belirgin bir yoğunlaşma görülmektedir. İnsan sağlığı açısından, yüksek kalori değeri, içerdiği mineral maddeler ve besin maddeleri ile özel bir yere sahip olan kuru incirin 100 gramında 217 (kcal)'lik enerji, 138 mg. kalsiyum, 163 mg. fosfor, 4,2 mg. demir, 91,5 mg. magnezyum, 0,073 mg. B1 ve 0,072 mg. B2 vitamini bulunmaktadır (Anonim, 2003).

İncirin meyveleri sofralık ve kurutmalık olarak tüketildiği gibi tatlı, reçel, bisküvi sanayinde de kullanılmakta ayrıca düşük kaliteli incirler ise etil alkol ve pekmez yapımında değerlendirilmektedir. Etil alkol elde edilmesi sırasında ortaya çıkan incir çekirdekleri boya, kozmetik ve ilaç sanayisinde, küspesi ise besi yemi yapımında kullanılmaktadır. Yüzlerce çiftçi ailesinin geçiminde önemli bir yeri olan incir üretimi, ülkemizde hemen her bölgede yapılabilmesine karşın yüksek kalitedeki incirler, iklim koşulları, meyve olgunlaşma ve kurutma mevsimindeki sıcaklık, nem ve rüzgar durumu gibi ekolojik istekleri nedeniyle, Ege Bölgesinde Büyük ve Küçük Menderes havzalarında yetiştirilmektedir.2013yılı T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kuru İncir Raporunda belirtilen verilere göre 2011 yılı itibarı ile dünya incir üretimi1.064.414 tondur (Anonim, 2013a).

Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü (FAO) verilerinin son beş yıllık ortalama değerlerine göre Türkiye, 240.000 ton üretim ile dünya yaş incir üretiminin yaklaşık % 22'sini karşılayarak ilk sırada yer almaktadır. Türkiye'yi Mısır, Cezayir, İran, Fas, Suriye, ABD ve İspanya takip etmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca incir üreticisi ülkelerin son yıllarda sahip oldukları yaş incir üretim miktarları (Anonim, 2013a)

ÜLKELER	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Türkiye	285.000	290.151	270.830	244.351	254.830	260.578
Mısır	170.000	170.000	170.000	268.682	184.972	165.483
Cezayir	69.799	91.927	70.000	83.801	123.760	150.000
İran	87.522	87.520	88.000	76.414	75.414	75.927
Fas	82.600	77.000	77.000	70.000	74.301	74.371
Suriye	49.800	49.800	51.000	53.724	40.966	42.944
ABD	46.176	46.176	38.500	39.689	37.113	35.072
Tunus	25.000	25.000	22.000	24400	30260	28993
İspanya	35.295	37.000	38.000	28.000	26.000	26.000
TOPLAM (dünya)	1.057.290	1.068.505	1.062.473	1.145.508	1.081.482	1.091.813

Yıllara göre değişmekle birlikte, yaklaşık 105.000 ton civarında olan dünya kuru incir üretiminin yarısına yakın bir bölümü ülkemiz tarafından karşılanmaktadır (Çizelge 1.2.). Son 5 yıllık veriler incelendiğinde; 2011/2012 yılında 107.153 ton olan dünya kuru incir üretimi içerisinde %52' lik payla birinci sırada yer alan ülkemizden sonra, %21,5'lik payla İran ikinci, %10,2'lik payla da Amerika Birleşik Devletleri üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2013b).

Çizelge 1.2. 2007-2013 Dünya kuru incir üreten ülkelerin, son yıllarda ürettikleri kuru incir üretim miktarları (Ton) (Anonim, 2013b)

Ülkeler	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013
Türkiye	48.012	50.604	56.590	58.662	55.653	56.935
İran	25.000	22.000	23.000	22.500	23.000	22.000
ABD	13.100	11.000	12.000	10.000	11.000	9.250
Yunanistan	10.000	8.000	9.000	7.500	8.000	7.600
İspanya	5.000	4.500	5.000	5.000	5.000	6.000
İtalya	4.000	4.000	4.000	3.500	4.500	3.900
TOPLAM	105.112	100.104	109.590	107.162	107.153	105.685

Dünyada kuru incir üretiminde önemli ülkeler başta Türkiye olmak üzere Yunanistan, Amerika Birleşik Devletleri ve İtalya'dır. Dünya üretimin % 54.3'ü ülkemizde, % 13,9'u Yunanistan'da, % 13,9'u Amerika Birleşik Devletlerinde ve %7,8'i de İtalya da gerçekleştirilmiştir. Bu değerlerle ülkemiz dünya kuru incir üretiminin yarısından fazlasını yaparak bir tekel oluşturmuş durumdadır(Anonim, 2013 b).

Türkiye incir üretimi bölgelere göre değerlendirildiğinde, Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK)' nun 2011 yılı verilerine göre, Ege Bölgesi meyve veren ve vermeyen yaşta olmak üzere toplam 8.225.417 ağaç sayısı, 195.235 ton üretim ile toplam üretimin % 75'ini tek başına karşılamaktadır. Bu bölgeyi 22.074 ve 17.496 ton ile sırasıyla, Akdeniz ve Doğu Marmara bölgeleri takip etmektedir (Turan, 2013) (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.3. Türkiye'nin bölgelere göre incir üretimi ve ağaç sayısı (Turan, 2013).

Bölgeler	Meyve Veren Ağaç Sayısı (Adet)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (Adet)	Toplam Ağaç Sayısı	Verim ortalaması (kg/ağaç)	Üretim (ton)	Oranı (%)
Ege	7.535.915	689.502	8.234.417	26	195.235	74.94
Akdeniz	603.132	75.598	678.730	37	22.074	8.47
Doğu Marmara	346.769	67.561	414.330	50	17.496	6.72
Güneydoğu Anadolu	272.295	28.380	334.263	29	7.863	3.02
Batı Marmara	178.124	28.380	206.504	34	5.986	2.30
Batı Karadeniz	192.212	29.061	221.273	29	5.669	2.18
Doğu Karadeniz	206.609	17.053	223.662	23	4.679	1.80
Ortadoğu Anadolu	30.204	3.710	33.914	24	719	0.28
Batı Anadolu	16.340	1.060	17.400	38	620	0.24
İstanbul	6.150	900	7.050	20	124	0.05
Kuzeydoğu Anadolu	3.310	530	3.840	13	43	0.02
TOPLAM	9.391.060	984.323	10.375.383	28	260.508	100

Ülkemizde önemli incir üreticisi iller incelendiğinde ise Ege Bölgesi'nde yer alan Aydın ili 168.351 ton ile toplam incir üretiminin % 65'ni karşılarken, bunu 22.534 ton ile İzmir ili izlemektedir (Turan, 2013) (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. Türkiye'nin illere göre incir üretimi ve ağaç sayısı (Turan, 2013).

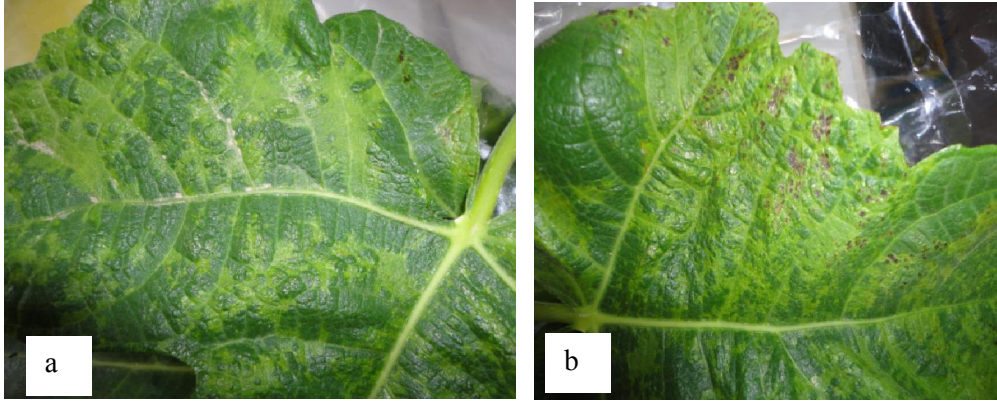
İller	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam	Ortalama verim (kg/ağaç)	Üretim (ton)	Oran (%)
Aydın	5.983.745	613.461	6.597.206	28	168.351	64.62
İzmir	1.378.060	57.945	1.436.005	16	22.534	8.65
Bursa	281.310	64.780	346.090	56	15.886	6.10
Mersin	114.810	40.450	155.260	61	6.971	2.68
Hatay	217.510	2.385	219.895	29	6.336	2.43
Antalya	124.290	12.265	136.555	35	4.332	1.66
Balıkesir	117.757	15.845	133.602	36	4.268	1.64
Gaziantep	82.795	25.345	108.140	46	3.799	1.46
Samsun	70.635	13.255	83.890	39	2.728	1.05
Adana	66.953	13.432	80.385	32	2.117	0.81

2013 yılında Ege Bölgesinde üretilen 190.885 ton incirin 168.351 tonu Aydın ve ilçelerinde yetiştirilmiştir (Turan, 2013).

İncir yetiştiriciliği yapılan her yerde bitki koruma açısından birçok problemlerle karşılaşmaktadır. Bunlardan biri de İncir Mozaik Hastalığıdır. İncir Mozaik Hastalığı incir yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde görülen, ağaçlarda zayıflık, verim ve kalite düşüklüğüne neden olan bir hastalıktır. Özalp ve Heper (1972) İncir Mozaik Hastalığı'nın verim düşüklüğü, meyve dökümü ve kalite bozukluğu nedeni ile % 49'lara varan verim azalışına neden olduğunu belirlemişlerdir.

İncir Mozaik Hastalığının tipik belirtisi incir ağaçlarının sürgünlerindeki genç yapraklarda dağınık sarı yeşilden açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekeler veya bantlar şeklinde (Şekil 1.1a) olup genelde bu lekelerin kenarı pas,görünümünde kırmızı-kahverenginde olmaktadır. Nadirde olsa bu lekeler ilerleyen zamanda nekroza dönüşür (Şekil 1.1b) (Alfieri, 1967). Bununla birlikte yaprakların normalden daha küçük ve asimetrik olduğu, olgunlaşmamış meyve üzerinde sarı ve renksiz lekelerin görüldüğü ve bu lekelerin meyve olgunlaşmasıyla kaybolduğu belirtilmektedir (Açıkgöz ve Döken, 2001).

Simptomların şiddetli olduğu durumlarda meyve kalitesini düşürdüğü hatta zamansız meyve ve yaprak dökümüne yol açıp ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (Alfieri, 1967; Salomon vd., 2005). Ancak, Şevik ve Akyazı (2011) bu hastalığın hemen hemen tüm incir bahçelerinde görüldüğünü ve bitkideki verim kayıplarının ise henüz hesaplanamamış olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 1.1. İncir Mozaik Hastalığının incir yaprağında oluşturduğu belirtiler; a) İncir yapraklarında dağınık sarı yeşilden açık sarıya kadar değişen lekeler b) Leke kenarlarında görülen nekrozlar

İncir Mozaik Hastalığı viral etmenlerinin taşınmasında önemli ölçüde Eriyophidae familyasına ait *Aceria ficus* ve *Lepidosaphes ficus* akarları etkili olmakla birlikte, bu hastalık mekanik olarak aşı ve çelik ile de taşınabilmektedir. İncir Mozaik Hastalığını oluşturan viral etmenler tohumla taşınmamaktadır (Özalp ve Heper, 1972).

İncir Mozaik Hastalığına neden olan etmen veya etmenlerin ne olabileceği üzerine çalışmalar yapılmış ve bu hastalığın nedeninin virüs olabileceği bildirilmiştir (Bradford vd., 1970 ; Plavsic ve Milicic, 1980 ; Appiano vd., 1990; Açığöz ve Döken, 2001). Daha sonra İncir Mozaik Hastalığına yönelik yapılan moleküler çalışmalarda bu hastalığa birden fazla virüsün neden olduğu tespit edilmiştir (Elbeaino vd.,2006; Elbeaino vd., 2007; Elbeaino ve vd., 2009; Elbeaino vd., 2010; Çağlayan vd., 2010; Tzanetakis vd., 2010; Elbeaino vd., 2011; Edremit ve Açığöz, 2011; Elçi vd., 2012).

2006-2012 yılları arasında, İncir Mozaik Hastalığına neden olduğu belirlenen on bir adet viral etmenin genom analizleri yapıp primerleri saptanmıştır (Çizelge 1.5.). Belirlenen bu etmenlerden 10 adedinin varlığı ülkemizde tespit edilmiştir.

Çizelge 1.5. Dünya’da ve Türkiye’de İncir Mozaik Hastalığı etmenlerinin belirlendiği çalışmalar

Virüsün Kısaltılmış Adı	Virüsün adı	Kaynak
FLMaV-1*	Fig leaf mottle associated virüs-1	Elbeaino vd.,2006 Çağlayan vd., 2010 Edremit ve Açıkgöz,2011 Elçi vd., 2012 Çağlar vd., 2010
FLMaV-2*	Fig leaf mottle associated virüs-2	Elbeaino vd., 2007 Çağlayan vd., 2010 Edremit ve Açıkgöz, 2011 Elçi vd., 2012 Çağlar vd., 2010
FMaV-1*	Fig mosaic associated virüs-1	Walia vd., 2009 Edremit ve Açıkgöz, 2011
FMaV-2*	Fig mosaic associated virüs-2	Walia vd., 2009 Çağlayan vd., 2010
FMV*	Fig mosaic virüs	Elbeaino vd., 2009 Çağlayan vd.,2010 Edremit ve Açıkgöz, 2011 Çağlar vd.,2010 Elçi vd., 2012
FLV-1*	Fig latent virüs	Castellano vd.,2009 Elçi vd., 2012 Gattoni vd., 2009
AFCV-1	Arkansas fig closterovirüs-1	Tzanetakı vd., 2010 Elçi vd., 2012
AFCV-2	Arkansas fig closterovirüs-2	Tzanetakı vd., 2010 Elçi vd., 2012
FBV-1*	Fig badna virüs-1	Tzanetakı vd., 2010 Elçi vd., 2012
FMMaV*	Fig mild mottle associated virüs	Elbeaino vd., 2010 Elçi vd., 2012
FCV*	Fig cryptic virüs	Elbeaino vd.,2011 Elçi vd.,2012

*2012 yılı itibari ile Türkiye’de saptanan İncir Mozaik Hastalık etmenleri

Ülkemizde yaygın olan İncir Mozaik Hastalığı incir bahçelerinde ekonomik açıdan ciddi kayıplar oluşturmaktadır (Özalp ve Heper 1972). İncir virüs hastalıklarının neden olduğu ekonomik kayıpların en az düzeye indirilebilmesi için İncir Mozaik Hastalığı viral etmeninin vektörü olan *Aceria ficus* ile kimyasal yollarla mücadele düşünülebilir. Ancak bu mücadele yöntemi akarın bitki sürgünlerindeki gözlerde, yapraklarda ve olgunlaşmamış meyvelerin (syconium) ostiol pulcukları arasında bulunması (Akşit vd., 2003) nedeniyle ekonomik olmamaktadır. Yeni tesis edilecek bahçelerde viral inokulumun en alt seviyede tutulması ve virüs hastalık problemlerinden uzun süre korunabilmesi için İncir Mozaik Hastalığı'ndan temiz üretim materyalinin kullanılması önerilebilir. Yeni tesis bahçelerin sağlıklı incir üretim materyali ile oluşturulmasına özen gösterilmesi sonucunda, hastalıklı bitki popülasyonunun düşmesi ve vektör mücadelesi ile, uzun yıllar bahçelerin virüsten korunması sağlanabilecektir.

Sürgün ucu-meristem kültürü ve termoterapi yöntemleri, sağlıklı incir üretim materyali elde edilmesinde kullanılabilir (Gella vd., 1997; Çömlekçiöğlü vd., 2007; Edremit, 2013). Bu yöntemle elde edilen sağlıklı üretim materyalinin virüs testlerinin yapılmış olması ise ayrı bir öneme sahiptir (Edremit, 2013). Sürgün ucu-meristem kültürü ve termoterapi uygulamaları ile sağlıklı, İncir Mozaik Hastalık etmeninden temiz incir üretim materyalinin elde edilmesi ve bu materyalin yeni incir bahçelerinin tesisinde kullanılması ulusal ekonomiye hizmet edecektir. Sağlıklı, virüsten temiz ve virüs testleri yapılmış olan incir üretim materyali dış satımda ülkemize bir ayrıcalık kazandıracaksa bunu sağlamak amacımız olmalıdır. Bunun ötesinde sağlıklı incir üretim materyali iç ve dış satımda kullanışlı ve getirisi olan bir materyaldir.

Bu çalışmada, şimdiye kadar belirlenen İncir Mozaik Virüs Hastalık etmeni olarak belirlenen on bir etmeden BLAST'da virüse özgü primeri bulunmayan AFCV-2 ve ülkemizde çok az örnekte rastlanan FMMaV (Elçi vd., 2012) hariç dokuz etmen ele alınmıştır.

Erbeyli İncir Araştırma Müdürlüğü Deneme Bahçesinden sürgün ucu eldesi için, mozaik belirtisi gösteren Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitleri arasından seçilen anaçlarda dokuz virüsün varlığının Tek Basamaklı RT-PCR ile belirlenmesi, anaçlardan alınan sürgünlerin, sürgün ucu kültürü ve termoterapi yöntemleri ile anaçlarında belirlenen viral etmenlerinden arındırılıp arındırılmadığının Tek

Basamaklı RT-PCR ile testlenmesi sonucunda temiz üretim materyali elde edilmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İncir Mozaik Hastalığı ilk kez Condit ve Horne (1933) tarafından 1933 yılında saptanmış ve hastalık etmeninin virüs veya virüs benzeri bir hastalık olabileceği bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar 1933'te Condit ve Horn, (1933) bu hastalığın taşınmasında aktif olarak *Aceria ficus* akarının rol oynadığını bildirmişlerdir. Bradfute vd. (1970) İncir Mozaik Hastalığı etmenin yuvarlak çift zarlı yapılar oluşturduğunu ve bir zarfla çevirili olduğunu 12 nm kalınlığında ve 90–200 nm çapında ve bitkide parankima hücre stoplazmasında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Plavsic ve Milicic, (1980) ve Appiano vd. (1990)'da bu hastalıkla bulaşık olan bitkilerin hücrelerinde oval cisimciklerin var olduğunu ultrastruktural çalışmalarla tespit etmiş ve bu hastalık etmeninin viral orijinli olabileceğini ifade etmişlerdir.

Ülkemizde ise İncir Mozaik Hastalığı ile ilgili ilk çalışma 1967'de Ege Bölgesinde yapılmış gerek incir bahçelerinin, gerekse fidanlıkların mozaik hastalığı ile bulaşık oldukları saptanmıştır (Blodgett ve Gömeç, 1967). Özalp ve Heper, (1972) Condit, Wescot ve Smithe atfen bu hastalığın hem verimi düşürdüğünü hem de kaliteyi bozduğu bilindiğinden incir bitkisinin geleceğini emniyet altına almak için araştırmalara başlamışlardır. Aynı araştırmacılar Ege Bölgesinde yaptıkları surveylerde İncir Mozaik Hastalığı'nın incir ağaçlarının %100 ünde bulunduğunu saptamışlar ve hastalığın taşınmasında *Aceria ficus* ve *Lepidosaphes ficus* 'un rol oynayabileceğinin idüşündüklerinden Ege Bölgesinde bu vektörlerin var olup olmadığını araştırmışlardır. Topladıkları akar numunelerinden sadece *Tetranychus urticae* teşhis etmişlerdir. Ancak incir yapraklarında başka akar türlerine de rastlamışlardır. Daha önce yapılmış olan teşhis sonuçlarına göre bu akarların *Bryobia practiosa* ve *Tetranychus telarius* olmasının mümkün olduğunu ve böylece incirlerde mevcut çeşitli akarların incir virüslerini nakletme ihtimallerinin ortaya çıktığını ifade etmişlerdir. Ayrıca bu hastalığın tohumla taşınmadığını da belirlemişlerdir. Buna ilave olarak çeliklere yaptıkları termoterapi ön denemeleri sonucunda virüs belirtilerinin görülmeye devam ettiğini bildirmişlerdir. Alfieri, (1967) İncir Mozaik Hastalığı'nın incir ağaçlarının sürgünlerindeki genç yapraklarda dağınık sarı yeşilden açık sarıya kadar değişen çeşitli büyüklükte lekeler veya bantlar oluşturduğunu genelde leke kenarının pas renginde veya kırmızı-kahverenginde olduğunu, nadirde olsa nekroz görüldüğünü ifade etmişlerdir. İncir Mozaik Hastalık etmeninin olgunlaşmamış meyve üzerinde sarı ve renksiz lekeler meydana getirdiği ve zamanla bu lekelerin meyve

olgunlaşmasıyla kaybolduğu belirtilmiştir (Salomon vd., 2005). Semptomların şiddetli olduğu durumlarda meyve kalitesini düşürdüğü hatta zamansız meyve ve yaprak dökümüne yol açıp ekonomik kayıplara yol açtığı ifade edilmiştir (Salomon vd., 2005).

2006 yılında Elbeanio vd.(2006)İncir Mozaik Hastalığını oluşturan etmenlerden biri olan incir yaprak leke ilişkili virus-1 (FLMaV-1) i RT-PCR ile tespit edip bu virusun Closteroviridae familyasına ait olduğunu saptamışlardır. 2009 yılında ise Elbeanio vd. (2009) FMV nün tanısını yapmışlardır.

Gattoni vd.(2009) İncir Mozaik Hastalığını oluşturan virüslerden FLV-1 in Flexviridae familyasına ait olduğunu saptamışlar ve2009 yılında ise Castellano vd. (2009) da FLV-1 virüsünün tohumla taşınmadığını bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışma ise Walia vd. (2009)'da 184 adet incir bitkisinden örnekler almışlar ve bunlara RT-PCR ve northern hibridizasyonu yöntemleri ile FMaV-1 ve FMaV-2 'nü belirlemiştir.

Elbeanio vd. (2010) FMMaV' nün varlığını tespit etmişlerdir. Tzanetakis vd.(2010) ise mozaik belirtisi gösteren ağaçlarda, İncir Mozaik virüsünün karakterizasyonuna yönelik yaptığı çalışmada daha önce varlığı belirlenmemiş FBV-1,AFCV-1 ve AFCV-2' yi saptamışlardır.

2011 yılında Elbeanio vd. Güney İtalya'daki semptomsuz incir ağaçlarında aldıkları bitki explantlarından elde ettikleri olağan dsRNA'ları incelediklerinde 2kbp'den küçük dsRNA'lara rastlamışlardır. Bu küçük dsRNA dizilerinin sekans analizi sonucu, etmenin yeni bir virüs olduğu ortaya konulmuş ve geçici olarak FCV adı verilmişlerdir. Bunu takiben FCV nin Partitviridae ailesinin ilk üyesi olduğunu tespit etmişler ve Partitviridae ailesinden olan FCV nin tohum ve polenle yayıldığını ama mekanik olarak, aşı ile taşınmadığını ve bitkilerde düşük konsantrasyonlarda görüldüğü için ekonomik etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir (Elbeanio vd.,2011).

Yapılan çalışmalar neticesinde, İncir Mozaik Hastalığına neden olduğu belirlenen on bir adet viral etmenin genom analizleri yapıp primerleri, RT-PCR koşulları ve elde edilecek ürünlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. RT-PCR da kullanılacak primerlere ait diziler, koşullar, elde edilecek ürünün moleküler ağırlıkları

Virüs	Primerler	PCR ürünü	PCR koşulları	Literatür
FMV	5'- CGGTAGCAAATGGAATGAAA- 3' 5'- AACACTGTTTTTGGCGATTGG- 3'	302b p	94°C/4dk 94°C/30 sn (35 döngü) 58°C/30 sn (35 döngü) 72°C/30 sn (35 döngü) 72°C/7dk	Elbeaino vd., 2009
FLMaV-1	N17s: 5'- CGTGGCTGATGCAAAGTTTA- 3' N17a: 5'- GTTAACGCATGCTTCCATGA- 3'	352 bp	94°C/3dk 94°C/35sn (33 döngü) 55°C/30sn (33 döngü) 72°C/35sn (33 döngü)72°C/5dk	Elbeaino vd., 2006
FLMaV-2	F3s: 5'- GAACAGTGCCTATCAGTTTGA TTTG -3' F3a: 5'- TCCCACCTCCTGCGAAGCTAG AGAA-3'	360 bp	94°C/4dk 94°C/30sn (35 döngü) 58°C/30sn (35 döngü) 72°C/40sn (35 döngü)72°C/7dk	Elbeaino vd., 2006
FMaV-1	5'- CACGAGCAAGACAAAGAGAA -3' 5'- CACACTTACACATCTTACATC ATCT-3'	298 bp	52°C/30 dk 94°C/30 sn (35 döngü) 54°C/45sn (35 döngü) 72°C/1dk (35 döngü)72°C/7dk	Walia ve vd., 2009
FMaV-2	5'- GGGTACATATGCGTCATTCTT G-3' 5'- CGTTTGTCTTGGATCACAGCA A-3'	468 bp	52°C/30 dk 94°C/30 sn (35 döngü) 54°C/45sn (35 döngü)72°C/1dk (35 döngü) 72°C/7dk	Walia ve vd., 2009
FCV	RNA-1 5'- TCGGATTGTCTTTGGAGAGG-	353 bp	94°C/4dk 94°C/30 sn (35 döngü)	Elbeaino vd.,2011

	<p>3' 5'- CGCATCCACAGTATCCCATT- 3'</p> <p>RNA-2 5'- TTGGCCGACTACTCAAGGTCA -3 5'- TGCGAGGTAGCATGTGTAGC- 3'</p>	375 bp	58°C/30 sn (35 döngü) 72°C/30 sn (35 döngü)72°C/7dk	
FLV-1	<p>5'- CCATCTTCACCACACAAATGT C-3'</p> <p>5'- CAATCTTCTTTGGCCTCCATA AC-3'</p>	389 bp	94°C/4dk 94°C/30 sn (35 döngü) 58°C/30 sn (35 döngü) 72°C/30 sn (35 döngü)72°C/7dk	Castellano vd., 2009
AFCV-1	<p>5'- CTGTATCTGTACATTACCTCTTC GGG-3'</p> <p>5'-ATGCTTCCTCGGCTGC-3'</p>	375 bp	94°C/2dak94°C/ 10sn (40döngü)55°C/9 0sn (40 döngü)72°C/10 sn (40 döngü)72°C/10 dk	Tzanetaki s vd., 2010
AFCV-2	<p>5'GTTTCGGAATTAGTTAATAGA TACGGTC-3'</p> <p>5'- ACCCGCTAGAGTAATCAGTCA AAGTT-3'</p> <p>BLAST'da virüse özgü primeri bulunamamıştır</p>	1671 bp	94°C/2dak94°C/ 10sn (40döngü)55°C/9 0sn (40 döngü)72°C/10 sn (40 döngü)72°C/10 dk	Tzanetaki s vd., 2010
FBV-1	<p>5'- ACCAGACGGAGGGAAGAAAT- 3'</p> <p>5'- TCCTTGCCATCGGTTATCTC-3'</p>	474 bp	94°C/2dak94°C/ 10sn (40döngü) 55°C/90sn (40 döngü)72°C/10s n (40 döngü)72°C/10 dk	Tzanetaki s vd., 2010
FMMaV	<p>5'- AAGGGGAATCTTACAAGGGT CG-3'</p> <p>5'TATTACGCGCTTGAGGATTG C-3'</p>	311 bp	Dop-PCR	Elbeaino vd.,2010

*2006-2011 yılından itibaren İncir Mozaik Hastalığını oluşturan viral etmenler

Ülkemizdeki incir ağaçlarında Çağlayan vd. (2010) 2010 yılında Hatay’da mozaik simptomsu gösteren incir bitkilerinden aldığı explantlarda FMV’ nün var olduğunu RT-PCR ile saptamışlardır. Çağlar vd. (2010)’nin Adana, Hatay, Urfa ve Mersin illerindeki incir ağaçlarından 132 adet örnek almışlar ve bu örnekleri, RT-PCR ile FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMV primerleri kullanarak testlemişlerdir. Çalışma sonucunda 6 örneğin FLMaV-2, 10 örneğin de FMV ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

2012’de Elçi vd. (2012) Şanlıurfa, Aydın, İzmir, Hatay, Bursa illerinden mozaik simptomsu gösteren ve göstermeyen incir ağaçlarından aldıkları örneklerde FLMaV-1, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV-1, FBV-1 ve FCV etmenlerinin varlığını RT-PCR ile belirlemiş ve FBV-1 (%82), ve FMV (%79) nin diğer virüslerden oransal olarak fazla olduğunu bulmuşlardır. Test edilen 100 adet incir ağacının %83’nün en az bir virüs ile bulaşık olduğunu ve birçok örnekte de karışım enfeksiyonlarının bulunduğunu saptamışlardır.

Edremit (2013) ise Aydın ilinin Germencik, Nazilli, Bozdoğan, İncirliova ilçelerinden ve bu ilçelere ait köylerden aldığı mozaik simptomsu gösteren incir yaprakları toplamıştır. Bu simptomsu gösteren yaprakları RT-PCR ile FLMaV-1, FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 primerleri kullanarak etmenlerinin tespiti için testlemiş ve sonuç olarak 82 örnekten 38 tanesinde yalnızca FMV, 18 tanesinde yalnızca FMaV-1, 26 tanesinde hem FMV hem de FMaV-1 etmenleri saptanmıştır. 26 Sarılop ve 12 Bursa siyahı incir örneği sadece FMV, 8 Sarılop ve 10 Bursa siyahı incir örneği sadece FMaV-1, 14 Sarılop ve 12 Bursa siyahı incir yaprak örneği hem FMV hemde FMaV-1 etmenleriyle enfekteli olduğunu saptamıştır.

İlk kez Yunanistan’da mozaik belirtisi gösteren incir yapraklarında belirlenen (Tzanetakis vd., 2010) çift sarmal DNA virüsü olan FBV-1’nin Minafra vd. (2012) Yeni Zelanda da mozaik belirtisi gösteren incir ağaçlarında var olduğunu ve bu virüsün incir genomuna entegre olabileceğini ifade etmiştir. Ayrıca bunun ispatı için çalışmaların yapılması gereğini vurgulamıştır. FBV-1’nin Amerika Birleşik Devletleri’nde geniş bir dağılım gösterdiği ve tarımsal açıdan önemli bir virüs olduğu Laney vd. (2012) tarafından belirlenmiştir. İncir piçlerinde ve meristem doku kültürü ile elde edilen bitkiciklerde belirlenen FBV-1’in incir genomuna entegre olduğunu ve bu nedenle elemine edilmesinin neredeyse imkansız olduğunu

ifade etmişlerdir (Laney vd., 2012). Aynı çalışmada Laney vd. (2012) bitki hücrelerine entegre olmayan formda (episomal)ve/veya entegre formlarda olduğunu belirttiği FBV-1'nin bitki hücrelerine entegre olmayan formunun kemoterapi ve termoterapi ile ortadan kaldırılabilmek olasılığının çoğu zaman var olduğunu bildirmişlerdir.

İncir virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar bu bitkinin hemen hemen tamamının incir virüsleri ile enfekteli olduğunu bildirmekte ve virüsler ile bulaşık incir bitkilerinde verim kayıpları olduğunu ifade etmektedirler. Yaygın olarak dünyada ve ülkemizde bulunan FMV'nün yayılmasında *Aceria ficus* önemli bir rol oynamaktadır. Bu akar ile kimyasal yolla mücadele mümkün olmakta, fakat ekonomik olmamaktadır. Çelik ve aşı ile vegetatif olarak çoğaltılan bir bitki olması incirin viral etmenlerinin de doğada hızla yayılmasına neden olmaktadır. Anaç ve üretim materyalinin virüsten temiz olması bu viral etmenlerin yayılmasını önleyecek önemli adımlardan birisidir. Bu nedenle yeni kurulacak kapama bahçelerde sürgün ucu kültürü ve termoterapi işlemleri uygulanarak elde edilen virüsten arı incir fidanlarının kullanılması hastalık etmenleriyle mücadelede ilk basamak olarak tercih edilmelidir.

Doku kültürü ve termoterapi ile virüssüz bitki elde etmeye yönelik yapılan çalışmalar sonucunda başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir. Nitekim Gella vd. (1997) mozaik simptomsu gösteren Urudana, Napoliten, Tiberio ve Villalba incir bitkilerinden aldığı sürgün uçlarını MP (Pontikis ve Melas, 1986) ortamına aktarmış ve bu bitki explantlarını 4-6 hafta boyunca 37 °C'de 16 saat aydınlık (5000 lüx), 34 °C'de 8 saat karanlık termoterapi şartlarında bekletmiş ve on beş gün sonra bitkiciklerde koyu yeşil renkte tomurcuk, yaprak ve sürgün gelişimi gözlemlemiştir. Ayrıca bu çalışmada termoterapi şartlarının dört farklı incir çeşidinin gelişmesi üzerine herhangi olumsuz bir etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir. Termoterapi sonrasında köklendikleri incir bitkilerini sera ortamına almış ve burada 1 yıl boyunca gelişmelerini takip etmişler ve gelişen incir bitkilerinde mozaik simptomsu gözlememişlerdir.

Fragarus vd.(2004) ise Güney Amerika' da mozaik simptomsu gösteren bitkilerden aldığı explantları, içinde bitki büyüme düzenleyicisi içeren WPM (Woody Plant Medium) ortamına almış ve yeni oluşan bitkiciklerde mozaik simptomsu gözlemlememişlerdir.

Çömlekçioğlu vd. (2007)'de Alkuden ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde iki farklı termoterapi işlemi uygulamıştır. İlki, mozaik simptomu gösteren Alkuden ve Bursa Siyahı incir bitkilerinden aldığı sürgün uçlarını 50°C' de 12 dakika boyunca suda bekletmişler ve hemen sonra bu sürgün uçlarını çeşme suyunun altında 4 dakika yıkamışlardır. Bu işlemden sonra sürgün uçlarından meristemleri izole ederek MS ortamına aktarmışlardır. Uyguladıkları ikinci termoterapi ise, Alkuden ve Bursa Siyahı incir bitkilerinin sürgün uçlarını 38 °C'de, %70 nemde 45 gün boyunca tutarak olmuştur.45 gün sonra sürgün uçlarından meristemleri izole ederek farklı büyüme hormonu konsantrasyonlarına sahip MS ortamına aktarmışlardır. Her iki termoterapi sonucunda bitkilerin viral etmenlerle bulaşık olup olmadığını dsRNA analizi yaparak testlemişler ve sonuçta virüssüz bikiler elde etmişlerdir.

Edremit vd. (2012) nin yapmış olduğu çalışmada dört virüs(FMV, FLMaV-1, FLMaV-2 ve FMaV-1) etmeni ile bulaşık olup olmadığı test edilen ve sadece FMV ve FMaV-1 ile enfeketeli olduğu RT-PCR ile belirlenen incir bitkilerinden (*Ficus carica* L.)'aldığı 0.5- 1.0 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını, 0.5 mg indol-3-butirik asit(IBA) ve 0.5 mg/L benzi ladenin (BA), ile zenginleştirilmiş Woody Plant Medium (WPM; Lloyd ve McCown, 1981) ortamında kültüre almışlar ve gelişen incir sürgünlerine termoterapi uygulamışlardır. Termoterapi sonucu elde edilen incir bitkileri anaçlarında var olduğu belirlenen virüslerin varlığı yönünden RT-PCR ile ilk kez test edilmiş ve 'Sarılıp' ve 'Bursa siyahı' incir materyallerinin bu virüslerden arındırılmış olduğunu saptamışlardır. Gerek termoterapi sonrası gerek ise sadece in vitro incir sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine de farklı konsantrasyonlarda, farklı besin ortamlarında denemeler yapılmış ve elde edilen bitkiciklerin köklenme miktarları ve dış ortama aktarım (aklimatizasyon) işlemleri üzerinde durulmuştur. Ülkemizde ve dünyada Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında ise, Pontikis ve Melas, (1986) Kalamon incir çeşidine ait sürgün uçlarının 89 mg/l phloroglucinol ilave edilmiş MS ortamında en iyi geliştikleri saptanmıştır. Bu sürgünler, 1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirildikten sonra vermikulitli ortama aktarılmışlardır.

Barbosa vd. (1992)'nin Roxo de Valinthos incirinin meristem kültürü yolu ile üretiminde çoğalma ve köklenme için en uygun MS ortamının olduğunu saptayarak, elde edilen köklü bitkilerin araziye aktarılmadan önce, toprak-kum-vermikulit karışımı içeren torbalarda 4-6 hafta süre ile alıştırma seralarında tutulmaları gerektiğini belirtmişlerdir. İncir sürgünlerinin köklenme durumları

Lopez vd.(1998) tarafından 0,2 ve 2,0 ppm IBA, 89 g/l phloroglucinol (PG) içeren 4 farklı MS ortamı denenmiş ve en yüksek köklenmenin PG bulunmayan 0,2 ppm IBA içeren ortamda gerçekleştiğini saptamışlardır. (Lopez vd., 1998). Demiralay, (1997) yılında Çukurova yöresinden İncir Mozaik Hastalığı ile enfekteli Bursa Siyahı incir çeşitlerinden aldığı sürgün uçlarını, meristem kültürü ile üretmiş ve virüsten arı bitkiler elde edilmiştir. Büyüme sezonunda meristemler, izole edilmiş ve 0,5 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃, 89 mg/l PG ve 2 g/l aktif karbon (AC) bulunan Linsmair ve Skoog (1965) ortamında kültüre almıştır. Daha sonra büyüyen uçlar, çoğalma ortamına aktarılmış ve sürgünlerin, 0,1 ve 0,2 mg/l IBA içeren köklendirme ortamlarına transferlerinden sonra, %75 oranında sağlıklı bitkiler elde edilmiştir (Demiralay, 1997). Edremit, (2012) ise Termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı WPM ve 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş ½ doz MS (Murashige ve Skoog,1962) besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarılmış ve köklenme gözlemlenmiştir.

Sağlıklı incir üretim materyali elde etmek için için yapılan çalışmalarda (Gella vd., 1997; Fragarus vd., 2004; Çömlekçioğlu vd., 2007) sürgün ucu kültürü tekniği ve termoterapi işlemleri sonucunda elde edilen bitkiler ya gözlemlenir ya da dsRNA'nın varlığı ile test edilmiştir. Edremit ve ark., (2011)'nin sürgün ucu ve termoterapi sonucunda elde ettiği incir fidanları, ilk kez dört viral etmen için RT-PCR ile testlenmiştir.

Bu çalışmada ise, Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Deneme Bahçesindeki İncir Mozaik Hastalığı belirtileri gösteren anaçlar arasından sürgün ucu temini için seçilen bitkilerin hangi viral etmenlerle enfekteli olduğu Tek Basamaklı RT-PCR yöntemi ile 9 incir viral etmeninin (FMV, FLMaV-1, FLMaV-2, FMaV-1, FMaV-2, FCV, FLV-1, AFCV-1, FBV-1) primerleri kullanılarak yapılmıştır. Sürgün uçlarının termoterapi işlemini takiben elde edilen bitkiciklerin anaçlarında belirlenen viral etmenlerinden arındırılıp arındırılmadığı Tek Basamaklı RT-PCR ile test edilmiştir.

Tek Basamaklı RT-PCR Fayeş vd. (2011) tarafından sadece FLMaV-1 ve FLMaV-2 etmenlerinin tanısında kullanılmıştır. Bu çalışmada ise Tek Basamaklı RT-PCR diğer yedi (FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1, AFCV-1, FCV, FLV-1) viral etmen için ilk kez uygulanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Nisan 2012-Temmuz 2014 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarı, Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı ve Adnan Menderes Üniversitesi Tar-Biyomer Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Termoterapi uygulaması için Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Doku Kültürü Laboratuvarı kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak, Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Koleksiyon Bahçesi'nde bulunan ve mozaik simptomsu gösteren 10 yaşında 'Sarılöp' ve Bursa Siyahı' incir çeşidi ağaçlarından alınan tepe tomurcukları kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Kış (Aralık-2012) ve ilkbahar (Nisan- 2013) aylarında olmak üzere 2 kez tekrarlanan denemenin her birinde, tek bir ağaçtan 5' er adet olmak üzere 12 adet Sarılöp incir çeşidinden 60, tek bir ağaçtan 5'er adet olmak üzere 12 adet Bursa Siyahı' ndan 60 adet toplam 120 adet tepe tomurcuğu alınmıştır.

Anaç, explant ve elde edilen bitkiciklerde virüs varlığını ve eliminasyonu takip edebilmek için, explant ve bitkiciklerin numaralandırılması anaç bitkilere verilen numaranın alt numaraları şeklinde olmuştur.

3.2.1. Doku Kültürü ve Yüzey Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak bitkileri elde etmek amacıyla 10 yaşlı 'Sarılöp' ve 'Bursa Siyahı' incir çeşitleri ağaçlarından tepe tomurcuğu içeren 2-3 cm uzunluğundaki sürgün uçları alınmış(Şekil 3.1.a) ve akan çeşme suyu altında(Şekil 3.1.b) 20 dakika yıkanmaya bırakılmıştır. Daha sonra yüzey sterilizasyonu için önce %70'lik etil alkolde 1 dakika tutulan tomurcuklar, 1-2 damla Tween 80 içeren %40'lık ticari sodyum hipoklorid solüsyonunda 20 dakika kadar

bekletilmiş(şekil3.1. c) ve 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır (şekil 3.1.d) (Hepaksoy ve Aksoy, 2006).

Yüzey sterilizasyonundan sonra 2-3 yaprak taslağı içeren apikal meristemler (şekil 3.1.e) (3-5 mm uzunluğundaki tepe tomurcukları) izole edilerek içerisinde 0.5 mg/L giberellik asit (GA), 0.5 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) ve 0.5 mg/L Benzil adenin (BA), 7 g agar, 30 g sakaroz içeren ve pH : 5.8 olan besi yeri konulmuş kavanozlara aktarılmıştır(şekil 3.1.f) (Murashige ve Skoog, 1962). Bitki eksplantları büyüme gösterdikçe aktarım işlemleri aynı besi ortamı içeren kavanozlara yapılmıştır. Besin ortamına alınan bitkiler 26°C' de 2500-3500 lüx ışık şiddetinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta 4 hafta bırakılarak kallus oluşumu gözlenmiştir (Hepaksoy ve Aksoy, 2006).çalışmada kullanılan MS (Murashige ve Skoog) ortamı içeriği izelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 İncir sürgün ucu yüzeysel sterilizasyonu ve MS ortamına aktarım aşamaları a)Sürgün ucu alma b)Sürgün uçlarının kaba pisliklerinden arındırılması c)Sürgün uçlarının etil alkolde bekletilmesi d) Sürgün uçlarının durulanması e) Yüzeysel sterilizasyondan sonra 2-3 yaprak taslağı içeren apikal meristemler f) Sürgün uçlarının MS (Murashige ve Skoog) besin ortamına aktarılması.

Çizelge 3.1. MS (Murashige ve Skoog, 1962)temel besin ortamı içeriği

Bileşikler	Final Solüsyon (mg/L)	1L Solüsyon İçin Gereken (ml)
NH ₄ NO ₃	1650	50
KNO ₃	1900	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
KH ₂ PO ₄	170	
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	50
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	
H ₃ BO ₃	6.2	1
KI	0.83	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	
NaFeEDTA	37,5	10
Mezo-inositol	100	50
Glycine	2.0	10
Thiamine HCl	1.0	1
Pyridoxine HCl	1.0	1
Nicotinic Asit	1.0	1
Sakkaroz	30000	
Agar	7000	

3.2.2. Termoterapi

Termoterapi işlemi Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirilmiş olup kallus oluşumu gözlenen bitkiler bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına alınmış ve Aralık ayı sürgün uçları 6 hafta boyunca , Nisan ayı sürgün uçları ise 4 hafta boyunca 37 °C’de 16 saat aydınlık (5000 lüx), 34 °C’de 8 saat karanlık olacak şekilde bitki büyütme kabine konularak termoterapi uygulaması yapılmıştır(Şekil 3.2.)(Gella vd., 1997). Termoterapi sonrasında bitkicikler, bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamına aktarılmış 26 °C’ de 4000 lüx ışıktaki 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyotta tutulmuştur.



Şekil 3.2. Kallus oluşumu gözlenen bitkilerde termoterapi işlemi

3.2.3. Köklendirme

Termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı WPM ve 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş ½ doz MS (Murashige ve Skoog,1962) besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarılmıştır (Edremit vd., 2012; Edremit, 2013).

3.2.4. Aklimatizasyon

Virüssüz bitkicikler (1:1) torf:perlit karışımı içeren polietilen strafor köpük bardaklara alınmış ve 2-3 hafta dış ortama alıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Kim vd., 2006).

3.2.5. Total Nükleik Asit İzolasyonu

Total Nükleik Asitizolasyonu Fossiac vd.(2001)'a göre yapılmıştır. 100 mg yaprak dokusu, steril ve 1 gece boyunca -80°C'de bekletilen havan içerisinde ezilerek steril eppendorf tüplerine alınmış ve üzerine 1 ml ezme tamponu (4M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc, 25mM EDTA, 1 M KOAc, %2.5 PVP-40) ile 10µl mercaptoetanol ilave edilerek 14.000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 500 µl hacimde alınan süpernetant yeni steril eppendorf tüplerine alınmış ve üzerine 100 µl 10% Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilerek tüpler ara sıra sallanmak kaydı ile 10 dakika süreyle 70°C de inkube edilmiş ve daha sonra 5 dakika süreyle buzda bekletilmiştir. Tüpler 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj

edildikten sonra üstteki sıvının 300 µl'si boş steril eppendorf tüplerine aktarılmış ve içerisine 150 µl ethanol, 25 µl resuspanse silica ve 300µl 6M sodium iodide ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı-supernatant atılmış ve 500µl yıkama tamponu (10 mMpH:7,5 Tris, 50 mM EDTA, 0,5 mM NaCl)ile oluşan pelletler yıkanmış ve 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar eppendorf tüplerindeki pelletler 500µl yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen pelletler,150 µl RNase-free su ile çözündürüldükten sonra 4 dakika 70°C de benmaride inkübe edilmişlerdir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, supernatant yeni hazırlanan eppendorf tüplerine transfer edilmiştir. Elde edilen total nükleik asit ekstraksiyonu Tek Basamaklı RT-PCR işlemi yapıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

3.2.6. Tek basamaklıRT-PCR (Tek basamaklı Tersine Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Öncelikle sürgünlerin alındığı anaçlarda İncir Mozaik Hastalığına neden olan virüsler tek basamaklı RT-PCR ile belirlenmiştir. Bunu takiben anaç bitkilerden alınan doku kültürü ve termoterapi yöntemleri uygulanmış sürgün uçlarından elde edilen bitkiler, herbirinin kendi anaçlarında Tek Basamaklı RT-PCR ile belirlenen incir viral etmenlerinden arındırılıp arındırılmadığının kontrolü amacı ile tek basamaklı RT-PCR ile testlenmiştir. Negatif kontrol olarak tohumdan yetiştirilen, sağlıklı incir çöğürlerinin yaprakları kullanılmıştır (Edremit, 2013) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Tek Basamaklı RT-PCR işleminde negatif kontrol olarak kullanılacak tohumdan yetiştirilmiş incir çöğürleri

Çizelge 2.1. de verilen dokuz incir viral etmenine ait primer dizileri Fermantes Firmasında hazırlatılarak kullanılmıştır.

Tek basamaklı RT-PCR işlemi Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1 μ l verso enzim mix, 25 μ l 2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix, 2,5 μ l RT Enchanter, 1 μ l Forward primer (10 pmol/ μ l), 1 μ l Reverse primer (10 pmol/ μ l) ile master mix hazırlanarak 16,5 μ l Nükleaz- free su ile 47 μ l ye tamamlanmıştır. Master Mix steril PCR tüplerine eşit olarak dağıtıldıktan sonra 3'er μ l total RNA ilave edilmiş ve termocycle'a yerleştirilmiştir. Çalışmada, FCV etmeni çift RNA ya sahip olduğundan dolayı, testleme bu iki RNA için ayrı ayrı yapılarak FCV-1 ve FCV-2 olarak isimlendirilmiştir (Şekil.4.5.).

Tek basamaklı RT-PCR koşulları Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit RT-PCR koşulları

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
c DNA sentez	50 °C	15 dak	1
Verso inaktivasyon	95 °C	15 dak	1
Denatürasyon	95 °C	20 sn	35
Annealing	FMV, FLMaV-2, FCV, FLV-1 için 58°C	30 sn	
	FLMaV-1 için 55 °C	30 sn	
	FMaV-1, FMaV-2 için 54°C	45 sn	
	AFCV-1, FBV için 55 °C	90 sn	40
Extension	72 °C	1 dak	
Final extension	72 °C	5 dak	1

3.2.7. Agaroz Jel Elektroferez ve Görüntüleme

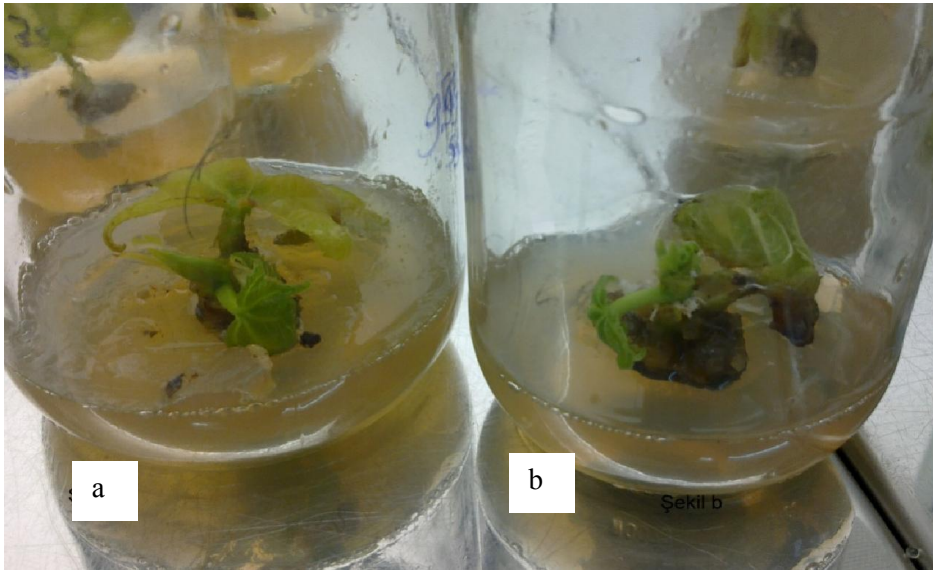
Tek Basamaklı RT-PCR sonrası elde edilen ürünlerin %1 lik agaroz jel üzerinde Çizelge 2.1 deki viral etmenlere ait PCR ürünlerinin moleküler ağırlıklarına (bp) göre analiz yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında, 2-3 dakika agaroz iyi bir şekilde eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Hazırlanan agaroz 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 5µl Safeview Classic eklenmiştir. Eritilip soğutulan jel, su terazisi ile ayarlanmış

düzgün bir zeminde içine tarak oturtulmuş jel tepsisine hiç kabarcık olmayacak şekilde dökülmüş ve katılaşması için oda sıcaklığında 20-25 dakika bekletilmiştir. Katılaştıran jel, jel tepsi ile birlikte elektroforez tankına yerleştirmiş ve üzerine 1X TBE tamponu üzerini kapatacak şekilde dökülüp taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Jelin ilk çukuruna 2µl DNA marker, 3µl yükleme tamponu bir parafilm üzerinde pipet yardımı ile köpürtülmeden karıştırılarak yüklenmiştir. Parafilm üzerinde pipetle köpürtülmeden hazırlanan 5µl yükleme tamponu 10µl PCR ürünü jelin diğer çukurlarına yüklenmiştir. Elektroforez aparatı doğrusal elektrik akımı sağlayan güç kaynağına bağlanarak, DNA lar 85 volt'ta 45 dk süre ile yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra DNA lar, Vilber Lourmat UX2 1100-26 MXJel Görüntüleme ve Analiz Sistemi ile fotoğraflanmıştır.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Doku Kültürü Çalışmaları

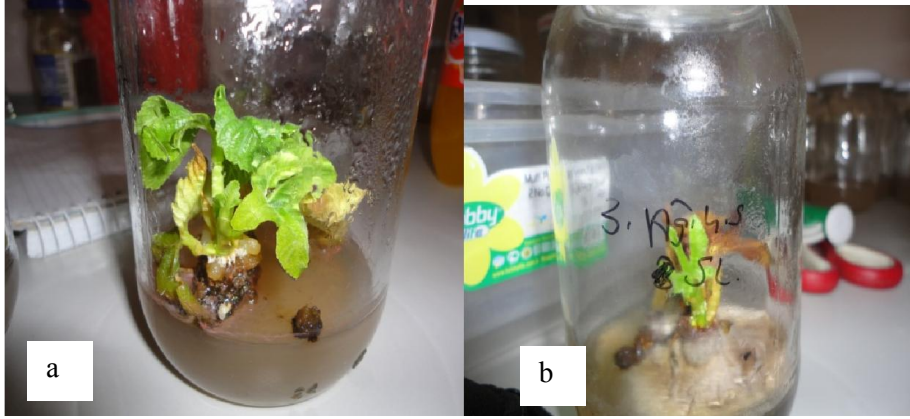
Aralık 2012 yılında kış denemesi için alınan, yüzeysel sterilizasyonu tamamlanmış ve gelişmesi için içerisinde 0.5 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) ve 0.5 mg/L Benzil adenin (BA) içeren MS ortamına aktarılan sürgün uçları 4 hafta süreyle $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 3500-4000 lux ışık şiddetinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Sarılop incir çeşidinden 60 bitkinin hepsinde kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.b), 60 adet Bursa Siyahı çeşidinde de kallus oluşumu olmamıştır (Şekil 4.1.a).



Şekil 4.1. Sürgün ucu kültürü ile incir bitkiciği elde edilmesi a) Kallus oluşumu gözlemlenmeyen Bursa siyahı b) Kallus oluşumu gözlemlenen Sarılop

Nisan 2013 yılında alınan 60 adet Sarılop ve 60 adet Bursa Siyahı incir çeşidi tepe tomurcukları, yüzey sterilizasyon işleminden sonra sürgün gelişimi ve yaprak elde edilmesi amacıyla içerisinde 0.5 mg/L indol-3-butirik asit (IBA) ve 0.5 mg/L Benzil adenin (BA) içeren MS ortamına aktarılarak, 4 hafta süreyle $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 3500-4000 lux ışık şiddetinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmışlardır. Bursa Siyahı incir çeşidinden 32 adet ve Sarılop incir çeşidinden 48 adet incir sürgünü bakteriyel (Şekil 4.2.a) ve fungal enfeksiyonlar (Şekil 4.2.b)

nedeniyle kaybedilmiştir. Çalışmaya 28 adet Bursa Siyahı ve 12 adet Sarılop ile devam edilmiştir.



Şekil 4.2. Bakteriye ve fungal enfeksiyonlar sonucu ölen incir bitkicikleri
a)Bakteriyel enfeksiyon b)Fungal enfeksiyon

Edremit, (2012)'in yaptığı çalışmada kullandığı IBA ve BA bitki büyüme düzenleyicilerin miktarı, çalışmamızda MS ortamına uygulanmıştır. Fakat bu ortamda geliştirdiğimiz bitkiciklerde yeterli kallus ve çoklu sürgün oluşumu gözlemlenememiştir. Fragarus vd. (2004) incir bitkilerinden aldığı sürgün uçlarının en iyi geliştiği ve sürgün oluşturduğu ortamın içerisinde 0.5 mg/L kinetin içeren WPM ortamı olduğunu ifade etmiştir. Çömlekçioğlu vd. (2007) ise Alkuden ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinden aldığı meristem uçlarını içerisinde farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS ortamına aktarmış, en iyi büyümeyi ve sürgün oluşumunu MS ortamına ilave ettiği 0.2 mg/ L GA3 + 2.0 BA mg /L bitki büyüme hormonları ile elde etmiştir.

4.1.1. Termoterapi Çalışmaları

Bu çalışmada Aralık ve Nisan ayında alınan sürgün uçları, 37 °C'de 16 saat aydınlık (5000 lüks), 34 °C'de 8 saat karanlık olacak şekilde bitki büyüme kabinine konularak 4 ila 6 hafta arasında termoterapi uygulaması yapılmıştır (Gella vd. 1997; Edremit, 2013)(Şekil 3.2.).

Aralık 2012 yılında alınan sürgünlerden sağlıklı olan 20 adet Sarılop ve 5 adet Bursa Siyahı incir çeşidi sürgünleri Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsünde 6 Hafta boyunca,16 saat aydınlıkta ve 5.000 lüks ışık şiddetinde 37 °C de, 8 saat

karanlıkta 34 °C de ısıl işleme tabi tutulmuştur. Bitkilerin hepsi bu sıcaklık süresinden etkilenip strese girerek ölmüştür(Şekil4.3.).



Şekil 4.3. Altı haftalık termoterapi sonucunda strese girerek kuruyan incir bitkicikleri

Nisan 2012 sürgünleri ise başlangıçta 28 adet Bursa Siyahı, 12 adet Sarılop incir sürgünü 4 hafta boyunca 16 saat aydınlıkta ve 5.000 lüks ışık şiddetinde 37 °C de, 8 saat karanlıkta 34 °C de ısıl işleme tabi tutulmuş ve termoterapi aşamasında, kabinlerde aktarma işlemi yapılırken, bakteriyel enfeksiyonlar sonucu bitkiciklerin çoğu kaybedilmiştir. Dört adet Bursa Siyahı ve bir adet Sarılop incir bitkiciği ve tepe tomurcukları elde edilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Tepe tomurcuğu oluşan Bursa Siyahı incir bitkileri

Yaptığımız çalışmada dört ve altı hafta boyunca termoterapi işlemine tabi tutulan Aralık ayı sürgünleri ve Nisan ayı sürgünleri olan Bursa Siyahı ve Sarılop incir çeşitlerinde Gella vd. (1997)'nin da bildirdiği üzere, 15 gün sonra yaprak ve sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Fakat 6 hafta boyunca termoterapiye tutulan

incir bitkiciklerinin hepsinde fizyolojik kuruma gözlemlenmiş ve tüm bitkiler kurumuştur. Kuruma nedeni olarak termoterapi süresinin 6 hafta olması üzerinde durulduğunda ise Çömlekçioğlu vd. (2007) nun yaptığı çalışmada Alkuden ve Bursa Siyahı incir sürgün uçlarını 38 °C’de, 45 gün boyunca termoterapide bekletmiş olmaları, Edremit (2013) ise 4-6 hafta boyunca Bursa Siyahı ve Sarılop incir çeşitlerini çalışmamızda uygulanan aynı şartlara tabi tutması ve iki çalışma sonucunda da sağlıklı bitkiler elde etmeleri bu olumsuzluğun süreden kaynaklanmadığını düşündürmektedir.

Edremit (2013) ise sonbahar ve bahar dönemi olmak üzere iki farklı dönemde sürgün ucu almış fakat bu dönemlerin hangisinde sürgün ucu gelişiminin daha iyi olduğunu belirtmemiştir. Yaptığımız çalışmada Aralık ayında alınan sürgün uçlarında gelişimin daha iyi olmaması, bu aylar içinde sürgün ucu alınan incir ağaçlarının dormant döneminde olmasından dolayı olabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Nisan ayı sürgünlerinden elde edilen İncir bitkicikleri, termoterapi işleminde herhangi bir kurumaya yeniden neden olmamak için 4 hafta boyunca bekletilmiştir. Çalışmamızda, nisan ayında alınan ve 4 hafta termoterapiye tabi tutulan sürgünlerden, Bursa Siyahı, uygulanan termoterapi şartlarında Sarılop çeşidine göre daha iyi gelişim göstermiştir. Ancak Gella vd. (1997) ise dört farklı incir çeşidini aynı termoterapi şartlarına tabi tutuklarında, bu çeşitler arasında gelişimde herhangi bir farklılık gözlemediklerini ifade etmiştir.

Çömlekçioğlu vd. (2007) Alkuden ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde, Edremit (2013) ise Sarılop ve Bursa Siyahı incir çeşitlerinde yaptıkları termoterapi uygulamalarının, çeşitler arasındaki gelişme farklılıkları üzerine herhangi bir yorum yapmamışlardır.

Termoterapi aşamasındaki olumsuzlukların nedeni olarak, sürgün uçlarının ilk aşaması olan Doku kültürü işleminin Aydın Adnan Menderes Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında yapılmış olması ve bu bitkilerin termoterapi işlemi için Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonuna götürülürken herhangi bir özel şartın uygulanmaması nedeni ile strese girmiş olma ihtimali ve termoterapi aşamasında iki incir çeşidi arasında gözlemlenen gelişme farklılığının bitkilerin içinde barındırdığı fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği ihtimalini düşündürmektedir

Çalışmamızın geri kalan kısmına, Nisan ayında alınan sürgün uçları ve bu sürgün uçlarından elde ettiğimiz bitkilere uygulanan termoterapi sonrasında elimizde kalan, sadece dört adet Bursa Siyahı ve bir adet Sarılop incir çeşidinden olmak üzere 5 adet sağlıklı incir bitkisi ile devam edilmiştir.

4.1.2. Köklendirme Çalışmaları

Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonunda termoterapi işlemi uygulanan İncir bitkicikleri, köklendirme çalışması için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi' ne getirilmiştir.

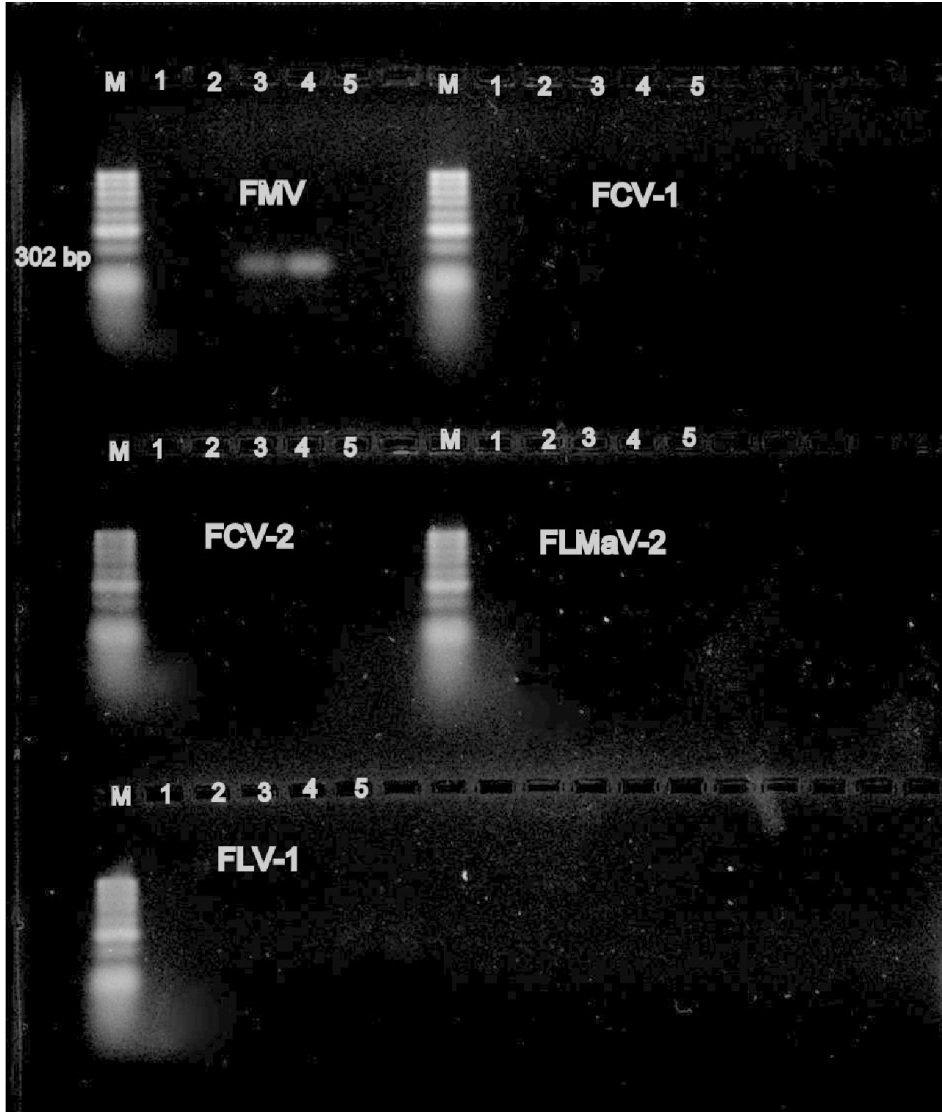
Termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarılmıştır. MS ortamının pH: 5:8' e ayarlanmış ve tüm kültürler, 26±2°C' de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık (3500-4000 lüks) kültür koşullarında 5 hafta süreyle muhafaza edilmiştir. Beş hafta boyunca gözlemlenen bitkiciklerde kök gelişimi zayıf olmuştur. Edremit (2012) ise yaptığı çalışmada, MS ve WPM ortamlarını birleştirerek, termoterapi uygulanmış *in vitro* sürgün uçlarını bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen yarı katı WPM ve 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş ½ doz MS (Murashige ve Skoog,1962) besin ortamlarına köklendirme amacıyla aktarmışlardır. Yaptığımız çalışmada Edremit vd. (2014)' den farklı olarak WPM ortamı ilave edilmemiştir. Bu nedenle zayıf kök gelişiminin ise WPM ve MS ortamının aynı anda kullanılmasının bir nedeni olabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur. Ayrıca örneklerin Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde termoterapi imkanları bulunamadığı için Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü' ne taşınması bir başka neden olarak düşünülebilir.

4.2. Tek Basamaklı RT-PCR

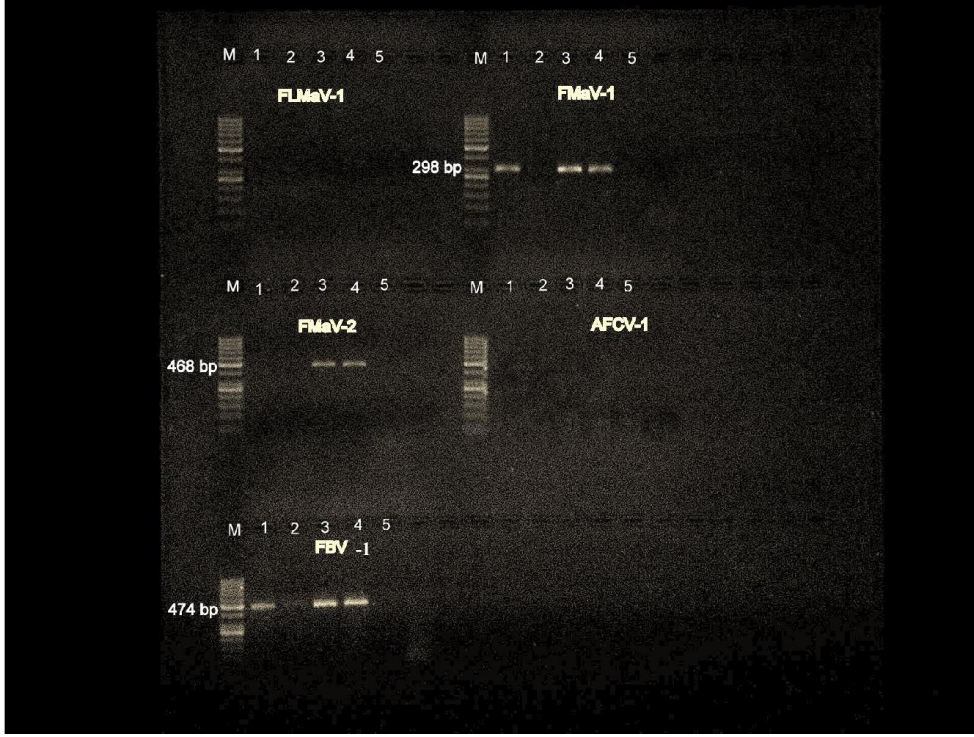
4.2.1. Anaç Bitkilerde İncir Mozaik Etmenlerinin Belirlenmesi

İlk olarak doku kültürü ve termoterapi sonucunda sağlıklı kalan 4, 8, 2 numaralı Bursa Siyahı, 9 numaralı Sarılop anaçlarına FMV, FBV, FCV, AFCV-1, FMaV-1, FMaV-2, FLV-1, FLMaV-1, FLMaV-2 etmenlerinin varlığını belirlemek için Tek basamaklı RT-PCR işlemi uygulanmıştır. Test edilen yaprak örneklerinde FMV için 302 bp, (Elbeaino vd .,2009; Edremit vd., 2011; Edremit., 2012;Edremit vd., 2012; Edremit vd., 2014), FMaV-1 için 298 bp (Walia vd., 2009) FMaV-2 için

468 bp (Walia vd., 2009) ve FBV için 474 bp (Tzenatakis vd., 2010) moleküler ağırlığında bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Tek basamaklı RT-PCR sonucunda 4 numaralı anaç bitkide FMaV-1 ve FBV, 9 numaralı anaçta FBV-1, 8 numaralı anaçta FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV, 2 numaralı anaçta ise FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1 etmenleri tek ve karışım halinde bulunmuştur. Aydın yöresinde FMV, FMaV-1 nin varlığı Edremit vd. (2011) tarafından tesbit edilmiştir. Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda Adana, Hatay, Urfa ve Mersin illerinde Çağlar vd. (2010)'ın FLMaV-2, FMV etmenlerini, Şanlıurfa, Aydın, İzmir, Hatay, Bursa illerinden Elçi vd. (2012) FLMaV-1, FMV, FLV-1, FMMaV, AFCV-1, FBV-1 ve FCV etmenlerini pozitif olarak testlemiştir. Yaptığımız testlemede İncir Mozaik Hastalık etmeninin karışım ya da tek olarak bulunabileceği Elçi vd., (2012); Edremit vd. (2011); Edremit, (2012); Edremit vd. (2012)'tarafından da bildirilmiştir.



Şekil 4.5. İncir sürgünlerinin alındığı anaç bitki örneklerinde FMV, FCV, FLMaV-2, FLV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü M; Marker, 1; 4. Anaç Bursa Siyahı , 2; 9. Anaç Sarılop, 3; 8. Anaç Bursa Siyahı, 4; 2. Anaç Bursa Siyahı, 5; Negatif kontrol.



Şekil 4.6. İncir sürgünlerinin alındığı anaç bitkilerdeki FLMaV-1, FMaV-1, FMaV-2, AFCV-1, FBV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü M; Marker, 1; 4. Anaç Bursa Siyhi, 2; 9. Anaç Sarılop, 3; 8. Anaç Bursa Siyahı, 4; 2. Anaç Bursa Siyahı, 5; Negatif kontrol.

4.2.2. Sürgün Ucu ve Termoterapi Uygulanan Bitkiciklerde, Anaçlarında Belirlenen İncir Mozaik Etmenlerinin Belirlenmesi

Doku kültürü ve termoterapi uygulanarak elde edilen beş adet incir bitkiciği, kendi anaçlarında saptanan viral (FMV, FMaV-1, FMaV-2 ve FBV-1) etmenlerinden arındırılıp arındırılmadığını tespit etmek amacı ile tek basamaklı RT-PCR ile testlenmiştir.

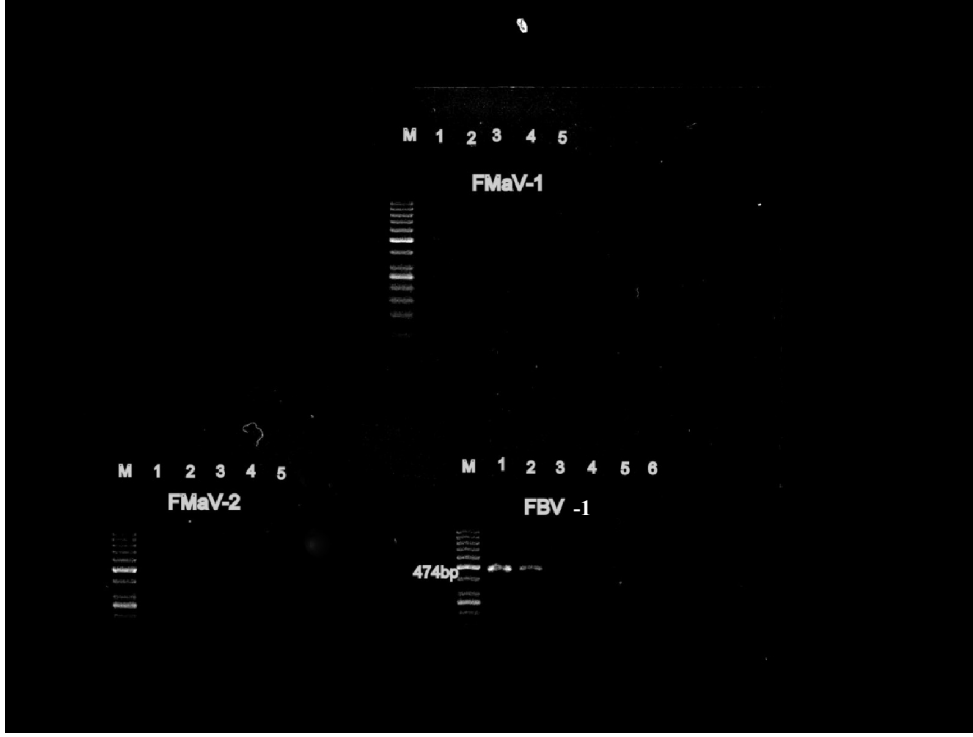
Tek Basamaklı RT-PCR sonucunda; 4 numaralı anaçtan elde edilen bitkicide FMaV-1 elemine edilirken FBV-1 elemine edilememiştir. 9 numaralı anaçtan elde edilen bitkicide FBV-1 elemine edilememiştir. 8 numaralı ve 2 numaralı anaçtan elde edilen bitkiler de ise anaçlarında pozitif olarak belirlenen tüm virüslerden elemine edilmiştir (Şekil 4.7.ve Şekil 4.8.). Edremit (2013)' in yaptığı benzer bir çalışmada sürgün ucu kültürü ve termoterapi işlemleri uygulanarak elde ettikleri

incir bitkilerinde FMV ve FMaV-1 etmenlerinin varlığı RT-PCR ile testlenmiş ve negatif sonuç bulmuşlardır.

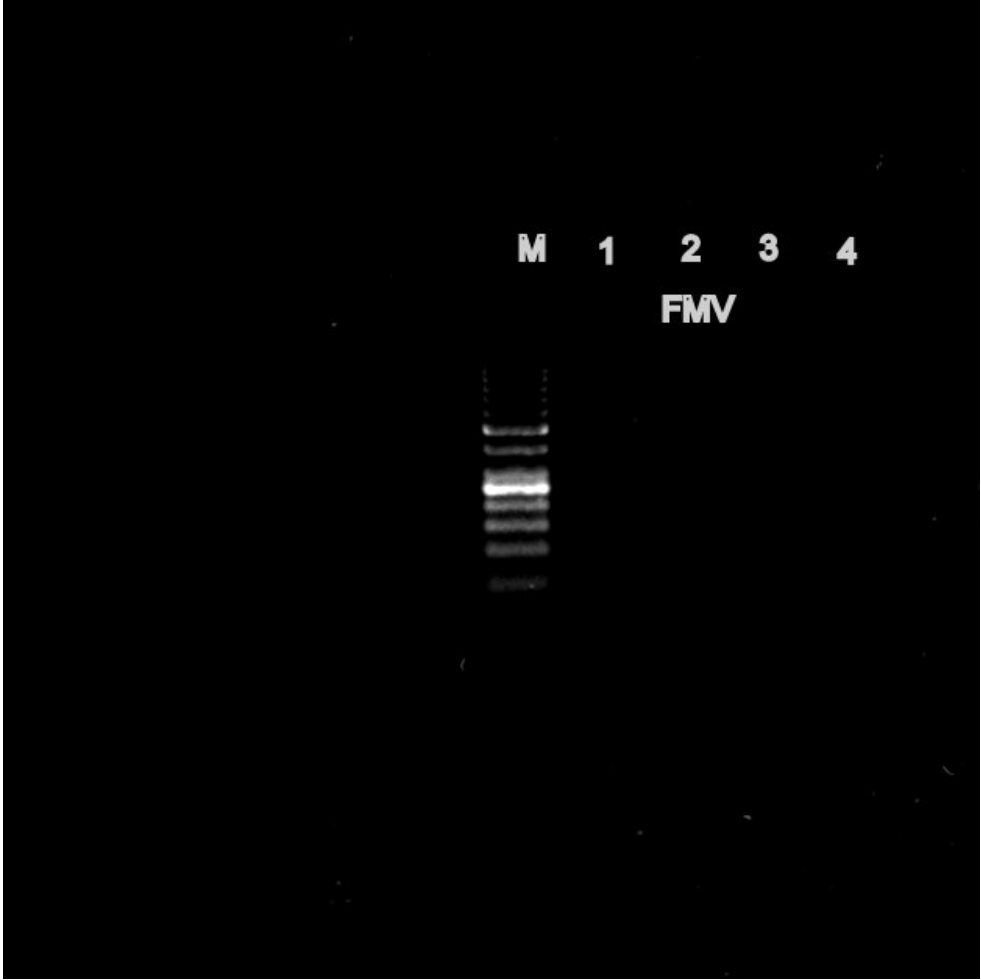
Sonuç olarak anaçlarında FBV-1 saptanan 2 bitkicide FBV-1'nün elemine edilemediği ancak 3 bitkicide elemine edilebildiği belirlenmiştir.

Çift sarmal DNA virüsü olan FBV-1'nin Minafra vd. (2012) Yeni Zelanda da mozaik belirtisi gösteren incir ağaçlarında var olduğunu ve bu virüsün incir genomuna entegre olabileceğini ifade etmiştir. Ayrıca bunun ispatı için çalışmaların yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Elçi vd. (2012) Urfa, Hatay, İzmir, Aydın, Bursa illerinden aldığı incir bitkilerindeki viral etmenlerin tespiti için yaptığı çalışmada FBV-1 etmeninin bu bitkilerle bulaşık olduğunu bildirmiştir.

Laney vd.(2012) meristem ucu kültürü ile elde ettiği ve mozaik simptomsu gösteren incir ağaçlarından ve incir piçlerinden aldığı bitki explantlarını FBV-1 virüsüne karşı RT-PCR ile testlemiş toplam 117 örnekten 114'nün bu etmen ile bulaşık olduğunu saptamıştır. Laney vd. (2012)' nin yaptığı FBV-1 etmeninin incir genomuna entegre olan ve incir genomuna entegre olmayan (episomal) formlarının bulunduğunu bildirmiştir. Fakat bu virüsün, incir genomuna entegre olmayanlarının (episomal) termoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalarla elemine edilebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda anaç bitkilerin hepsinin FBV-1 ile bulaşık olduğu tek basamaklı RT-PCR ile saptanmıştır.4 numaralı Bursa Siyahı (1) ve 9 numaralı (2) Sarılop anaçlarının sürgün ucu ve termoterapi uygulanarak elde edilen bitkilerinde FBV-1 pozitif bulunmuştur (Şekil 4.7.ve 4.8.). Yaptığımız çalışmada pozitif sonuç veren FBV-1etmeninin Laney vd. (2012)'in bildirdiği üzere incir genomuna entegre olan formu, sonuçları negatif bulunan FBV-1 etmenin ise incir genomuna entegre olmayan (episomal) formu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.7. Doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilmiş incir bitkilerinin FLMaV-1, FMaV-2, FBV-1 primerleri ile yapılmış tek basamaklı RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü M; Marker, FMaV-1: 1; 4. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı, 2; 8. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı, 3; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 1. Sürgün, 4; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 4. Sürgün, 5; İncir tohumundan yetiştirilen negatif kontrol. FMaV-2: 1; 4. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı Sürgün ucu, 2; 8. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı, 3; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 1. Sürgün, 4; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 4. Sürgün, 5; Negatif kontrol. FBV-1: 1; 4. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı Sürgün ucu, 2; 9. Anaç *in vitro* Sarılop, 3; 8. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 1. Sürgün, 4; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 1. Sürgün, 5; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 4. Sürgün, 6; Negatif kontrol.



Şekil 4.8. Doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilmiş incir bitkilerinin FMV primeri ile yapılmış RT-PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü M: Marker, FMV 1: 8. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı; 2: 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 1. sürgün; 3; 2. Anaç *in vitro* Bursa Siyahı 4. Sürgün, 4; İncir tohumundan yetiştirilen negatif kontrol.

Tek basamaklı RT-PCR işlemine ait 4 adet anaç bitki ve bu anaçlardan doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilen 5 adet incir bitkiciklerine ait tek basamaklı RT-PCR sonucunda jel elektroforez görüntüleri (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) yukarıda belirtilmiş ve bu analiz sonuçları Çizelge 4.1. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Anaç bitki yaprak örnekleri ve bu anaçlardan doku kültürü ve termoterapi sonucunda elde edilen bitkiciklere uygulanan Tek Basamaklı RT-PCR sonuçları

İncir Çeşitleri ve Numaraları		Virüsler																	
		FMV		FLMaV-1		FLMaV-2		FMaV-1		FMaV-2		FCV		FLV-1		AFCV-1		FBV	
		A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M	A	Ü.M
B.S	4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SL	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B.S	8	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B.S*	2	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B.S**	2	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

A: Anaç bitki, Ü.M: Üretim Materyali, B.S. : Bursa Siyahı, SL: Sarılop,

* 2. Anaç Bursa Siyahının sürgün ucundan yapılan işlemler sonucunda elde edilen 1. sürgün

** 2. Anaç Bursa Siyahının sürgün ucundan yapılan işlemler sonucunda elde edilen 4. sürgün

Anaç bitkilerden elde edilen total nükleik asit ekstraksiyonuna İncir Mozaik Hastalığına neden olan dokuz viral etmenin (FMV, FLMaV-1, FLMaV-2, FMaV-1, FMaV-2, FCV, FLV-1, AFCV-1, FBV) primerleri kullanılarak yapılan Tek Basamaklı RT-PCR ile FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1 etmeninin pozitif sonuçlar verdiği görülmüştür. Edremit (2013), de yaptığı çalışmada Aydın ilindeki incir ağaçlarından aldığı bitkilerden elde ettiği total nükleik asitlere 4 viral etmenin varlığını saptamak amacı ile FLMaV-1, FLMaV-2, FMV ve FMaV-1 etmenlerine ait primerler kullanarak RT-PCR testi uygulamış ve bu dört viral etmeden FMV, FMaV-1 etmenini ya tek ya da gruplar halinde bulmuştur. Çalışmamızda doku kültürü ve termoterapi ile elde ettiğimiz bitkiciklere, sürgün uçlarının anaçlarında pozitif sonuç aldığımız FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV

etmenlerinin primerleri kullanarak testlenmiş ve sonuçta FMV, FMaV-1, FMaV-2 ve 2 bitkicik hariç diğer doku kültürü ile elde edilen bitkiciklerde, anaçlarında pozitif olarak belirlenen etmenlerinden arındırılabilceği belirlenmiştir. Edremit, (2012) yılında doku kültürü ve termoterapi ile elde ettiği bitkilerde, bu bitkiciklerin anaçlarında pozitif bulduğu FMV ve FMaV-1 etmeninin elemine edilmiş olduğunu bildirmiştir. Doku kültürü ve termoterapi işlemleri sonucunda elemine edilemeyen FBV-1 etmenin Laney vd. (2012)'nın, ifade ettiği gibi incir genomuna entegre olan formunun olabileceği düşünölmektedir.

5. SONUÇ

2012-2013 yıllarını kapsayan bu çalışmada, Erbeyli İncir Araştırma İstasyonu Deneme Bahçesindeki virüs belirtisi gösteren Bursa Siyahı ve Sarılop incir anaçları kullanılmıştır. Sürgün ucu ve termoterapi ile virüs etmenlerinden arındırılmış olduğu virüs testlerinin yapılmasıyla belirlenmiş olan Bursa Siyahı ve Sarılop üretim materyalinin elde edilmesi amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Aralık 2012’ de alınan 120 adet tepe tomurcuğundan sürgün ucu ve termoterpi uygulamalarından sonra geriye sağlam bitki kalmamıştır. Nisan 2013’de toplam 120 tepe tomurcuğundan 28 adet Bursa Siyahı ve 12 adet Sarılop incir çeşidi sürgün ucu elde edilmiş ve toplam 40 adet bitki termoterapi işlemine 4 hafta boyunca tabi tutulmuştur. Sonuçta 4 adet Bursa Siyahı 1 adet Sarılop incir çeşidi toplam 5 bitkicik elde edilmiştir. Bu çalışmada sürgün ucu alımında Aralık yerine Nisan ayı olumlu sonuç vermiştir. Elde edilen bitkiciklerde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen köklendirme ortamına aktarıldığında beş hafta sonunda zayıf kök gelişimi gözlemlenmiştir. Kök gelişiminin yeterli düzeyde olması için farklı köklendirme hormonlarının farklı konsantrasyonları denenebilir. Ayrıca bu çalışma doku kültürü ve termoterapi yöntemlerinin birlikte uygulanabileceği laboratuvar koşullarında ve daha çok örnek sayısı ile tekrarlanması durumunda daha kesin sonuçlara ulaşmak mümkün olabilir.

FMV, FLMaV-1, FLMaV-2, FMaV-1, FMaV-2, FCV, FLV-1, AFCV-1, FBV-1 primerleri kullanılarak yapılan Tek Basamaklı RT-PCR sonucu Bursa Siyahı ve Sarılop incir anaçlarının FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1 ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Bu viral etmenlerin (FMV, FMaV-1, FMaV-2, FBV-1) çoğunlukla karışım enfeksiyonu gösterdiği belirlenmiştir.

Sürgün ucu kültürü ve termoterapi uygulanmış beş adet bitkiciğin anaçlarında belirlenen virüslerin tümünden arındırılmış olmasına rağmen bir Bursa Siyahı ve bir de Sarılop olmak üzere iki bitkicikte FBV-1 nin bulunduğu tek basamaklı RT-PCR ile saptanmıştır. Sürgünucu ve termoterpi sonrası tüm diğer viral etmenler elemine olurken iki bitkicikte FBV-1 nin pozitif olarak bulunması, bu etmenin Bursa Siyahı ve Sarılop incir genomuna entegre olması ile ilişkilendirilebilir. Beş örnekten üçünde FBV-1’ in negatif bulunması bu etmenin Sürgün ucu kültürü ve termoterapi ile arındırılabilir olduğunun göstergesi olabilir. Çelişki gibi görülen bu durum FBV-1’ in episomal olarak da bulunabileceği bulgusu ile açıklanabilir.

KAYNAKLAR

- Açıköz, S. ve Döken M.T., 2001. İncir mozaik hastalığı etmeninin tanılanmasında dsRNA analiz yönteminin kullanılması. **Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi**, 3-8 Eylül 2001,145s,Tekirdağ.
- Akşit, T., Özsemerci, F., Çakmak, İ., 2003. Aydın ilinde incir ağaçlarında saptanan zararlı türler. **Türk Entomoloji Dergisi**, 27: 181-189.
- Alfieri S. A., 1967. Fig mosaic.**19 Plant Pathology**, 64: 24-28.
- Anonim, 2003. İncir Çalışma Grubu Raporu. [<http://www.tzob.org.tr/Portals/0/Dokumanlar/FaaliyetRaporlari/docs/incir>]. Erişim Tarihi: 15.04.2014.
- Anonim, 2013a.Türkiye İstatistik Kurumu Bitkisel Üretim Verileri. [<http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>]., Erişim Tarihi: 15.04.2014.
- Anonim, 2013b.T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.[<http://koop.gtb.gov.tr/data/5342b6b0487c8ea5e4b4d9bf/2013%20Kuru%20%C4%B0ncir%20Raporu>]. Erişim Tarihi: 15.04.2014.
- Appiano, A., Conti, M., Zini, N., 1990. Cytopathological study of the double-membrane bodies occurring in fig plants affected by fig mosaic disease. **XVI. International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases**, Roma-ITALY.
- Barbosa, W; Campo Dall Orto, F. A., Ojima M., Martines, F. P., Bovi, V., Castro, J. L., 1992. Produção de mudas da figueira, Roxo de Valinhos, através de cultura in vitro. **Agrônômico Campinas**, 44(1): 6-10.
- Bradfute, O. E., Whitmoyer, R. E., Nault, R. L., 1970. Ultrastructure of plant leaf tissue infected with mite-born viral-like pathogens. **Proc. Electron Microsc. Soc. Amer**, 28: 178-179.
- Blodgett, E.C., Gömeç, B., 1967. FAO-UNSF Proje No:142 Ürün Araştırma ve Geliştirme Merkezi, İzmir.
- Castellano, M.A., Stradis, A., Minafra, A., Boscia, D., Martelli, G.P., 2009. Seed transmission of fig latent virus-1. **Journal of Plant Patholog**, 91(3), 697-700.
- Condit, I. J., Horne, W. T., 1933. A Mosaic of The Fig in California. **Phytopathology**, 23: 887-896.

- Çağlar, B.K., Fidan, H., Güldür M.E., Elbeaino, T., 2010. The prevalence of three viruses infecting fig in Southern Turkey. **Journal of Phytopathology**, 30: 1-3.
- Çağlayan, K., Serçe, Ç., Barutçu, E., Kaya, K., 2010. Comparison by Sequence-based and electron microscopic analyses of fig mosaic virus isolates obtained from field and experimentally inoculated fig plants. **Plant Disease**, 94 (12): 1448-1452.
- Çömlekçiöğlü, S., Kuden, A. B., Kaçar, Y., Kamberoğlu, M.A., 2007. Meristem culture of two fig cultivars in Turkey. **Fruits**, 62 (2): 125-131.
- Demiralay, A., 1997. Bursa Siyahı İncir Çeşidinin Meristem Kültürü Yöntemiyle Çoğaltılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Adana.
- Edremit, N.F., Açıkgöz, S., 2011. Aydın yöresinde incir mozaik hastalığı ile ilgili ilk rapor. **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 28-30 Haziran 2011, 73s, Kahramanmaraş.
- Edremit, N.F., Açıkgöz, S., Gurel, A., Hayta Ş., 2012. Production of virus-free fig plantlets by shoot tip culture and thermotherapy and virus detection of in vitro plantlets through RT-PCR. **Uluslararası Gıda Tarım ve Gastronomi Kongresi**, 15-19 Şubat 2012, 185s, Antalya.
- Edremit, N.F., 2013. Aydın İlinin Bazı İlçelerinde İncir Mozaik Hastalığının Yaygınlığının Belirlenmesi, Etmenin Tanınması Ve Üretim Materyalinin İncir Sürgün Ucu Kültürü-Termoterapi İle Etmenden Arındırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Edremit, N.F., Açıkgöz, S., 2014. İncir mozaik hastalığına neden olan viral etmenlerin biyolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi**, 3-5 Şubat 2014, 199s, Antalya.
- Elçi, E., Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., 2012. Molecular detection and comparative sequence analysis of viruses infecting fig trees in Turkey. **J Phytopathol**, 160:418-423.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Stradis, A., Martelli, G.P., 2006. Partial characterisation of a clostero virus associated with a chlorotic mottling of fig. **Journal of Plant Pathology**, 88 (2), 187-192.

- Elbeaino, T., Digiario, M., Stradis, A., Maertelli, G.P., 2007. Identification of a second member of the family *Closteroviridae* in mosaic-diseased figs. **Journal of Plant Pathology**, 89(1), 119-124.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Stradis, A., Alabdullah, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M., Martelli, G., 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. **J. Gen. Virol**, 90: 1281-1288.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Heinoun, K., Stradis, A., Martelli, G.P., 2010. Fig mild mottle-associated virus a novel closterovirus infected fig. **Journal of Plant Pathology** (2010), 92(1), 165-172.
- Elbeaino, T., Kubaa, R., Digiario, M., Minafra, A., Martelli, G.P., 2011. The complete nucleotide sequence and genome organization of fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. **Virus Genes**, 42:415–421. DOI 10.1007/s11262-011-0581-0 Virus Genes (Epub ahead of print).
- Fayez K. A., Mahmoud S. Y., 2011. Detection and partial characterization of a putative closterovirus affecting *Ficus carica*: molecular, ultrastructural and physiological aspects of infected leaves. **Acta Physiol Plant**, 33:2187–2198.
- Foissac X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Candresse, T., 2001. Polyvalent detection of fruit tree Trichovirus, Capillovirus and Foveavirus by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (DOP RT-PCR). **Acta Horticulture**, 550: 37-43.
- Fraguas, C.B., Pasqual, M., Dutra, L.F., Cazetta, J., 2004. Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) “Roxo De Valinhos” plants *in vitro*. **Cell. Dev. Biol.—Plant**, 40:471–474.
- Gattoni, G., Minafra, A., Castellano, M., Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P., 2009. Some properties of fig latent virus 1, a new member of the family flexiviridae. **Journal of Plant Pathology**, 91(3), 555-564.
- Gella, R., Marin, J.A., Coralles, M., Toribio, F., 1997. Elimination of fig mosaic from fig shoot tip cultures by thermotherapy. **First International Symposium on Fig. Acta Horticulturae**, 480: 173-177.
- Hepaksoy, S., Aksoy, U., 2006. Propagation of *Ficus carica* L. clones by *in vitro* culture. **Biologia Plantarum**, 50 (3): 433-436.

- Kim, K., Kim, M., Yun, P., Chandrasekhar, T., Lee, H., Song, P., 2006. Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.). **Journal of Plant Biology**, 50(4) : 440-446.
- Laney, A. G., Hassan, M., Tzanetakis, I. E., 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. **Phytopathology**, 102:1182-1189.
- Llyod, G.B., McCown, B.H., 1980. Commercially-feasible micoprpagation of mountain laurel- *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proc. Int. Plant Prop. Soc**, 30: 421-427.
- Linsmair, E.M., Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobaccotissue culture. **Physiol Plant**, 18: 100-127
- Lopez C., Cella, M. R., Mann, J.A., Torihio, F., 1998. Elimination of fig mosaic from fig shoot-tip cultures by thermotherapy. **I. İnernational Symposium on Fig. Acta Horticulturæ**, 480: 173-177.
- Minafra, A., Chiumenti, M., Elbeaino, T., Digiario, M., Bottalico, G., Pantaleo, V., Martelli, G.P., 2012. Occurrence of fig banda virus 1 in fig trees from different countries and in symptomless seedlings. **Journal of Plant Pathology**, doi: 10.4454/JPP.DN.2012.024.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, 56: 473-497.
- Özalp M., Heper E., 1972. Ege Bölgesinde incir mozaik virüsü ve bu virüse dayanıklı incir ağaçları üzerinde araştırmalar. **Bitki Koruma Bülteni**, 12 (4): 228-262.
- Plavsic, B., Milicic, D., 1980. Intracellular changes in trees infected with fig mosaic. **Acta Horticulturæ**, 110: 281-286.
- Pontikis, C. A., Melas, P., 1986. Micropropagation of *Ficus carica* L. **HortScience**, 21:153.
- Salomon, R., Mawassi, M., Flaishman, M., 2005. Isolation and Characterization of A Virus From Fig Leaves Exhibiting Mosaic Symptoms and Development of A Sensitive Detection Procedure For This Virus. Departments of Virology and Fruit Trees, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel.
- Şevik, A. M., Akyazı, R., 2011. Akarlar ile taşınan bitki patojeni virüsler. **Türk Entomoloji Bülteni**, (1): 49-65.

- Turan, D., 2013. Sarılop İncir (*Ficus carica* L.) Çeşidi Yaprak Segmentlerinden Somatik Embriyogenesis. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Aydın.
- Tzanetakı, I.E., Laney, A.G., Keller, K.E., Martin, R.R., 2010. New viruses found in fig exhibiting mosaic symptoms. **21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv**, 427,79-82.
- Walia, J. J., Salem, N.M., Falk, B.W., 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. **Plant Disease**, 93 (10): 4-10.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gülçin SÜMER

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir/ 08.06.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Çakır Ekolojik ve Zirai Ürünler Ltd. Şti 2012- halen

İLETİŞİM

E-posta Adresi : sumergulcin@gmail.com

Tarih : 24.11.2014