

Cilt 31
Volume

Sayı 2
Number

2016

ISSN 1300 - 4700

Çukurova
TARIM
ve **GIDA**
Bilimleri Dergisi



Çukurova Journal of
AGRICULTURAL
and **FOOD**
Sciences



Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Çukurova Journal of Agricultural and Food Sciences

Editörler Kurulu Editorial Board

Orhan BOZAN
Serap GÖNCÜ
H. Hüseyin ÖZTÜRK
Serkan SELLİ

Çukurova Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi

Baş Editör Editor-in-chief

Mahmut ÇETİN

Çukurova Üniversitesi

Sorumlu Editör Managing Editor

Emin Bülent ERENOĞLU

Çukurova Üniversitesi

Bilimsel Danışma Kurulu Advisory Board

Nebahat SARI
İbrahim HAYOĞLU
Kenan BÜYÜKTAŞ
Gülşen SERTKAYA
Filiz ÖZÇELİK
Cemal KAYA
Muharrem A. KAMBEROĞLU
Sibel DERVİŞ
Yusuz YANAR
Recep YURTAL
Nihal BUZKAN
Haşim KELEBEK
Adil AKYÜZ
Ümit ÜNAL
Mustafa KÜSEK
Orhan BOZAN
Tahsin TONKAZ

Çukurova Üniversitesi
Harran Üniversitesi
Akdeniz Üniversitesi
Mustafa Kemal Üniversitesi
Ankara Üniversitesi
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Mardin Artuklu Üniversitesi
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Sütçü İmam Üniversitesi
Adana Bil. ve Tek. Üni.
Sütçü İmam Üniversitesi
İnönü Üniversitesi
Sütçü İmam Üniversitesi
Çukurova Üniversitesi
Ordu Üniversitesi

Amaç ve Kapsam

Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, Tarım, Orman, Gıda, Çevre, Peyzaj, Su Ürünleri, Biyoloji ve Biyoteknoloji alanlarında hazırlanan daha önce başka bir yerde yayınlanmamış araştırma ve derleme makaleleri Türkçe veya İngilizce olarak yayınlar.

Aims and Scope

Çukurova Journal of Agricultural and Food Sciences publishes original papers and review articles dealing with agriculture, forestry, food sciences, environment, landscape, fisheries, biology and biotechnology in Turkish or English.



Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

Tolga İZGÜ⁽¹⁾ Başar SEVİNDİK⁽²⁾ Özhan ŞİMŞEK⁽²⁾ Yeşim YALÇIN MENDİ^{(2)*}

Abstract

In the present study, an efficient method for shoot regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* strains in two different melon cultivars (*Cucumis melo* var. *inodorus* cv. 'Kirkagac 637' and *Cucumis melo* L., cv. *Védrantais*) have been developed. *A. tumefaciens* AGL1 race provide pUBINHX1 plasmid, resistant to salinity. Expression of AtNHX1 (Na-H antiporter) gene driven by CaMV 35S control in pUBINHX1 plasmid. In the structure of the plasmid hygromisin phosphotransferase gene located as plant selection marker gene in T DNA region. The best regeneration result was obtained from MS medium supplemented with 2.2 µM BAP and 0.5 µM NAA. DNA isolation, PCR and gel electrophoresis were done from putative transgenic plants, 200 bp band size was obtain. Regeneration of putative transgenic plants obtained from proximal and cotyledon explants showed differences in both cultivars.

Key Words: *Cucumis melo*, Transformation, Salinity, Gene transfer, PCR

Bazı Kavun Çeşitlerine NHX-1 Geninin Transformasyonu

Özet

Bu çalışmada, iki kavun çeşidinde (*Cucumis melo* var. *inodorus* cv. 'Kirkagac 637' ve *Cucumis melo* L. cv. *Védrantais*) *Agrobacterium tumefaciens* suşu kullanılarak sürgün rejenerasyonu ve transformasyonu için en uygun metod geliştirilmiştir. *A. tumefaciens* AGL1 ırkındaki pUBINHX1 plazmidinde tuzluluğa dayanıklılık geni bulunmaktadır. pUBINHX1 plazmidinde bulunan AtNHX1 (Na-H antiporter) geni, CaMV 35S promotörü kontrolü altında ifade olmaktadır. T-DNA bölgesinde lokalize olan hygromisin fosfotransferaz geni bitki seleksiyon marker geni olarak görev almaktadır. En iyi rejenerasyon sonucu, 2.2 µM BAP ve 0.5 µM NAA içeren MS ortamından sağlanmıştır. Putatif transgenik bitkilerde, DNA izolasyonu, PCR ve jel elektroforez çalışmaları yapılmış, 200 bp bant büyüklüğü saptanmıştır. Proksimal ve kotiledon eksplantlarından elde edilmiş putatif transgenik bitkilerin rejenerasyonu, her iki çeşit içerisinde farklılıklar göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cucumis melo*, Transformasyon, Tuzluluk, Gen transferi, PCR

Introduction

Melon belongs to *Cucurbitaceae* family and known to be one of the most important horticultural crop. Varieties of *Cucumis melo* species spread large area in Asia, especially Korea, China and Japan (Zhang et al. 2014). Melon originates from China and secondary diversification center is Turkey (Pitrat et al. 2000) Turkey is one of the most important country in the world for melon production as 1.7 million tonnes annually

according to 2013 statistics after China (FAO, 2014). There are some reports on genetic transformation in different melon varieties for disease resistance, biotic and abiotic stress resistance (Mendi et al. 2012).

Recently, biotechnology has wide usage among plant breeding techniques and one of the most important technique is genetic transformation. It presents improvement of new plant varieties and new prospects for conventional melon breeding (Mendi et al.

Yayın kuruluna geliş tarihi: 05.08.2016

¹Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Ege, 35100, Bornova, İzmir, Turkey

²Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Çukurova, 01330, Balcalı, Adana, Turkey

*ymendi@gmail.com

2012). The development of biotechnological tools have made it possible to overcome some of conventional problems. Transformation researches were developed for melon, watermelon, and other plants in the last decades and the first gene transformation to melon was performed successfully by Fang and Grumet using cotyledon explants (Bezirganoglu et al. 2014).

It was represented that *Cucumis melo* susceptible to *Agrobacterium* infection and it has high transformation frequency (Zhang et al. 2014). Especially, *Agrobacterium tumefaciens* mediated method has been most successful one for obtaining transgenic plant (Fang and Grumet 1990).

Salinity is an important abiotic stress factor for open-field to produce *Cucumis melo* varieties (Kuşvuran et al. 2007). Researchers have identified and isolated many genes connected salt stress (Serrano and Gaxiola 1994). NHX-1 gene is one of the novel antiport identified from *S. cerevicesae* and the role of this gene is Na⁺/H⁺ antiporters in salt tolerance and pH homeostasis.

The aim of this study is to develop a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation technique followed by an efficient regeneration system which can together provide stable expression and transmission of the introduced ATNHX-1 gene by the use of cotyledon and proximal explants isolated from germinated seeds.

Material and Method

Plant Material

Cucumis melo var. *inodorus* cv. 'Kirkagac 637' and *Cucumis melo* L. cv. Védraçais were used as plant material. Seeds of genotypes were obtained from a commercial seed company.

Bacterial Strain and Plasmid

Agrobacterium tumefaciens EHA 105 recombinant bacteria was used for transformation assays. Bacteria was provided from USA California Davis University Plant Science Department. *A. tumefaciens* AGL1 race provide pUBINHX1 plasmid, resistant to salinity. Expression of AtNHX1 (Na-H antiporter) gene driven by CaMV 35S control in

pUBINHX1 plasmid. In the structure of the plasmid Hygromisin phosphotransferase gene located as plant selection marker gene in T DNA region. Antibiotic resistant gene located, except T-DNA region.

Method

In vitro Regeneration and Transformation Protocols

Coats of melon seeds were removed, and the seeds were sterilized by ETOH solution 70% and 20% NaOCl with 2 drops of Tween 20 per 100 ml solution for 15 min. After rinsing with sterile distilled water three times, the seeds were incubated in dark condition and hormone free MS medium (Murashige and Skoog, 1962) and the cotyledons excised. Totally 400 seeds were used 200 of them *Cucumis melo* L. cv. Védraçais cotyledones and 200 of them *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. 'Kirkagac 637' (200 proximals and 200 cotyledones).

In order to identify the concentration of *A. tumefaciens* incubated in LB medium for overnight, spectrophotometric measurement was carried out. Incubated bacteria races, which has O.D.₆₀₀=(0.5-0.6) absorbance, were used in transformation experiments. The proximal and cotyledon part of the cotyledons without apical meristem was used as an explant. The explants were incubated in *Agrobacterium* culture for 15 min. After pouring of the bacteria, explants were blotted dry with sterile filter paper and placed on MS medium and incubated in dark for 3–4 days.

Inoculation and Co-cultivation

Totally 400 melon cotyledon explants from 200 melon seeds (2 proximal cotyledonary explants without shoot apex per seed) were used for transformation. MR medium (4.4 g l⁻¹ MS basal medium, 1 g l⁻¹ MES, 30 g l⁻¹ sucrose, 2.2 µM BAP, 0.5 µM NAA, 8 g l⁻¹ agar, pH: 5.8) and M2 medium (MR with 750 mg l⁻¹ Cefax) were used as selective regeneration media. *In vitro* cultures were incubated at 25-26 °C in a 16 h photoperiod (30 µmol m⁻² s⁻¹ fluorescent white light) for all regeneration selection treatments. Following regeneration selection, a shoot elongation medium was used (DM) (4.4 g l⁻¹ MS (Murashige and Skoog, 1962) basal

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

medium, 30 g l⁻¹ sucrose, 1 μM BAP, 0.2 μM GA₃, 1 g l⁻¹ MES, 8 g l⁻¹ agar, pH: 5.8), and shoots were rooted on a MSR medium (4.4 g l⁻¹ MS basal medium, 30 g l⁻¹ sucrose, 0.5 μM NAA, 1 g l⁻¹ MES, 8 g l⁻¹ agar, pH: 5.8).

Molecular Analysis

DNA Isolation

Leaves from all samples coming from tissue culture were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. High molecular weight genomic DNA was extracted from the leaf of each sample following the CTAB protocol for minipreps (Edwards et al., 1991). DNA concentration was measured using a NanoDrop (ND 100) spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) and gel electrophoresis. DNA was diluted in water to a final concentration of 50 ng/μL and stored at -20 °C.

PCR Reactions

Primers for NHX-1 genes (F: ACCACGAAGCTGCTTTTCAT, R: TCAAGTCGAAAAGCTCAGCA) were designed using Primer 3, expected DNA size was optimized to be 200 bp. All plantlets were checked whether they have expected DNA size or not. Amplification reactions were performed in 20-μL volumes containing 2X PCR Mastermix (Fermentas K0171, Waltham, MA, USA), 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas EP0402), 25 mM MgCl₂, 20 μM of the forward and reverse primer and 50 ng of melon DNA. Mixtures were assembled at 0 °C, transferred to a thermal cycler, then precooled to 4 °C. The amplification was carried out in a model Master Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) using an optimized in-house program consisting of an initial denaturation step of 2 min at 94 °C, and then 35 cycles of 2 min at 94 °C, 1 min at 37 °C, 2 min at 72 °C, followed by a 10-min elongation step at 72 °C. PCR products were stored at 4 °C before analysis. Amplification products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels and 0.5 g/mL ethidium bromide in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) for 3 h at 70 V. The fragment patterns were photographed under UV light for further

analysis. A 100-bp DNA ladder (Fermentas) was used to determine fragment size.

Results and Discussion

Transformation of ATNHX-1 gene through *Agrobacterium tumefactions* is mainly aimed in the present study. On the other hand efficient regeneration protocol was applied to transformed explants. Following the transformation and regeneration assays plants were confirmed by PCR analysis. Totally 400 seeds belonging to *Cucumis melo* L. cv. Védraçais and Kırkağaç 637 were germinated in hormone free MS medium and germination rate was calculated as 100% (Table 1). In the transformation studies, proximal and cotyledon parts coming from seed germination were used. Transformation was subjected to total 400 cotyledons, 400 proximal explants to transfer ATNHX-1 gene for each genotype.

Totally 400 melon seeds were used as 200 *Cucumis melo* L., cv. Védraçais and 200 Kırkağaç 637 for transformation of AtNHX-1 gene. It was used 800 explants in total, which consisting of 4 explants (2 proximal and 2 cotyledons) from each seeds and *in vitro* cultured.

In this *Cucumis melo* L. cv. Védraçais genotype, 12 putative transgenic were observed as 5 proximal and 7 cotyledon part of the seeds, 1 putative transgenic was observed for *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Kırkağaç 637 genotype. Transformation efficiency of NHX-1 gene was determined as 6.87% from 200 *Cucumis melo* L. cv. Védraçais seeds. Instead, transformation efficiency was obtained as 0.625% for Kırkağaç 637 genotype. In some of the proximal and cotyledon explants, which were transferred to regeneration mediums, as well as the regeneration, callus formation was also observed (Figure 1, 2 and 3). Although, callus formation was observed from all of these explants, shooting were limited. A part of these regenerants, which matured in regeneration mediums, turned into unorganised formation while some others transformed to the shoot forms (Figure 4, 5).

DNA extraction were done from putative transgenic plant which was observed after transformation of NHX-1 gene and DNA

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

quantity and quality were checked by spectrophotometer. Quantity of extracted DNA were not too much but it was enough for PCR.

It was used 800 explants in total, which consisting of 4 explants (2 proximal and 2 cotyledon) from each seeds, different part of the seeds were *in vitro* cultured. Transformation efficiency were determined 3.25% as 13 transgenic plant for 400 seeds material. This study shows that explant is one of the most important factor for transformation studies.

AtNHX-1 gene amplification (200 bp) was observed lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 for *Cucumis melo* L. cv. Védraçais genotype in (Figure 6). PCR was also performed with the same samples using

AtNHX-1 gene specific primers. There was DNA band (200 bp) only in the lanes 1 for *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. 'Kirkagaç 637' genotype (Figure 6). No band was shown in negative control group. This showed that there was no contamination caused by materials used and chemicals in PCR solution (Figure 6). Bordas et al. (1997) studied on Amarillo canario and Pharo. They used real leaves in Amarillo canario genotype, cotyledon and real leaves for Pharo genotypes. They reported that explants taken from Amarillo canario were most effective than Pharo cotyledons and real leaves. In this study, efficient regeneration were observed from cotyledon explants of *Cucumis melo* L. cv. Védraçais seeds.

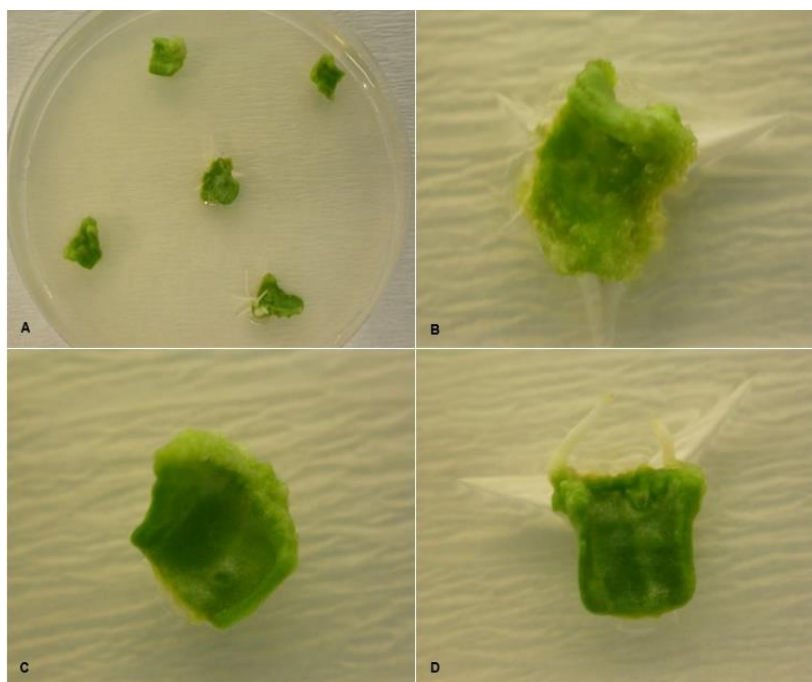


Figure 1. *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Kirkagaç 637 genotype in regeneration medium A-B) regeneration of cotyledon explants (7th day), C-D) Cotyledon explants in regeneration medium

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

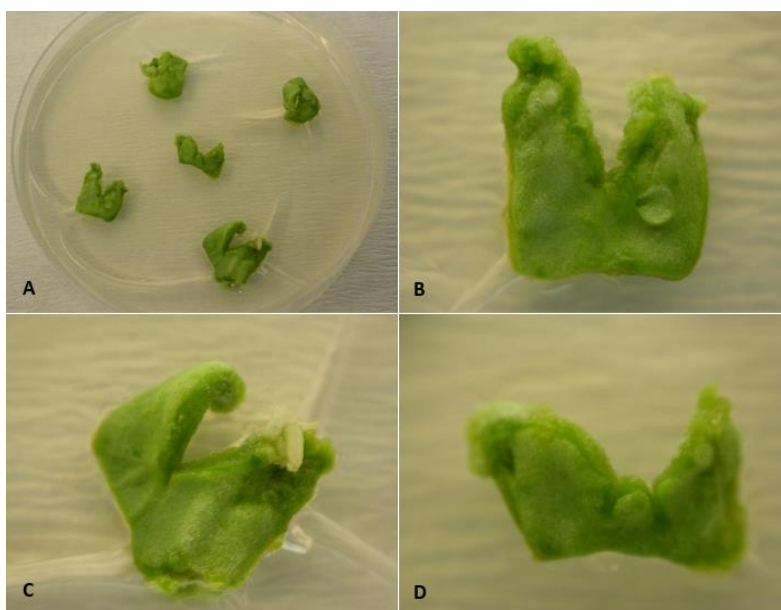


Figure 2. *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Kırkağaç 637 genotype in regeneration medium
regeneration of proximal explants (7th day), C-D) Proximal explants in regeneration medium

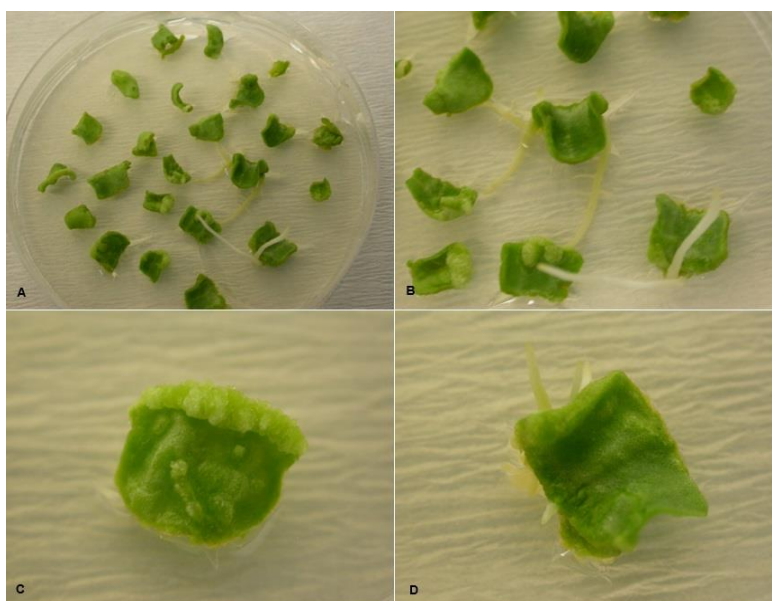


Figure 3. *Cucumis melo* L, cv. Védrantais genotype in regeneration medium A-B) regeneration of cotyledon explants (7th day), C-D) Cotyledon explants in regeneration medium

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties



Figure 4. A) Shoot development in *Cucumis melo* L. cv. Védrantais genotype B) Shoot development in *Cucumis melo* L. cv. Védrantais genotype

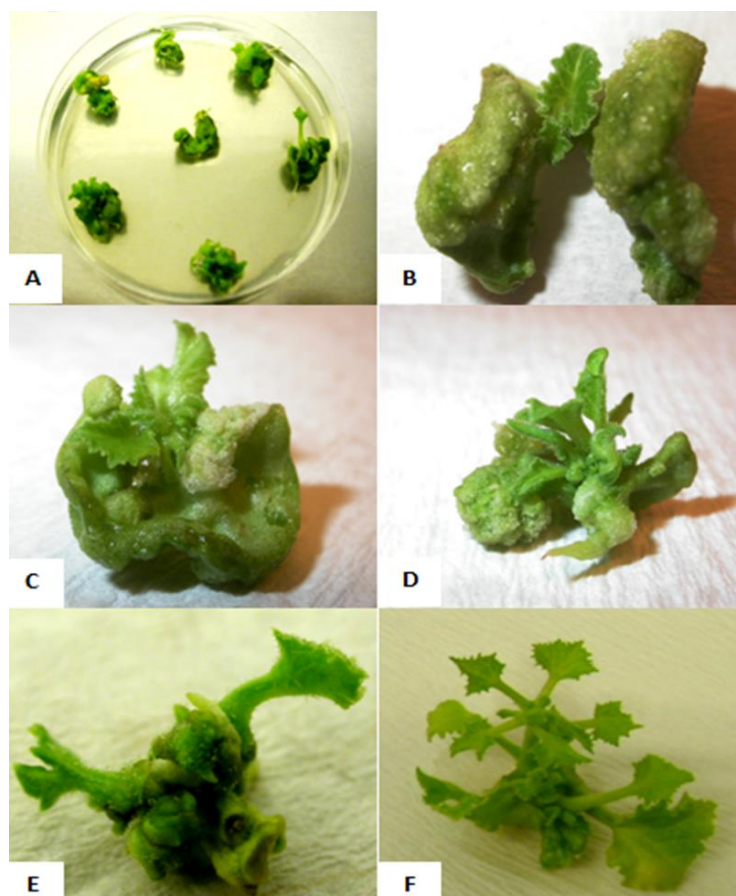


Figure 5. Shoot development of *Cucumis melo* L. cv. Védrantais, B) Regeneration of proximal explants, C) Developed shoots from proximal explants, D-E) Shoots from proximal explants at 15th day, F) Shoots from proximal explants at 21th Day.

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

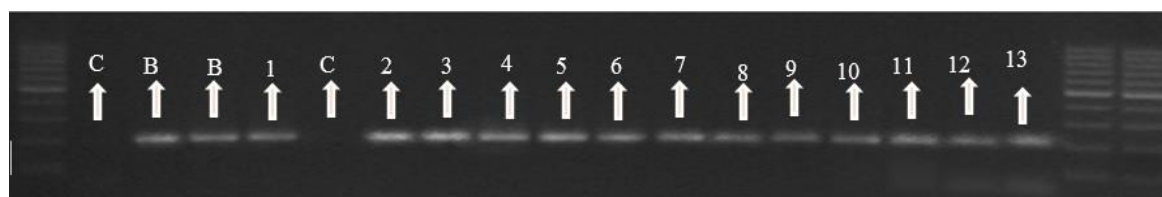


Figure 6. Ethidium bromide- stained agarose gel showing the amplification by PCR of the NHX-1 gene present in transgenic plant, C) Control, B) Bacteria strain, 1) Transgenic *Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Kırkağaç 637 2-13) Transgenic *Cucumis melo* L. cv. Védrantais plants.

Table 1. Influence of an Agrobacterium-mediated transformation step on the regeneration frequency and transformation efficiency of melon cultivars recovered from different explants

Cultivars	Type of explant	Total no. explants tested	Explants with calluses (%)	Explants with shoots (%)	Total transformation efficiency (%)
Védrantais	Cotyledon	200	100	18	6.87
Védrantais	Proximal	200	100	14	5.53
Kırkağaç 637	Cotyledon	200	100	13	5.51
Kırkağaç 637	Proximal	200	100	7	2.625

Conclusions

We have established a transformation system for melons cv, “Kırkağaç 637” and “Védrantais” using *A. tumefaciens* as a vector. Although Kırkağaç 637 and Védrantais were the two cultivars tested, as the transformation of two different genotypes of muskmelon have been reported (Fang and Grumet 1990; Dong et al. 1991) and other Turkish commercial lines of melon have been tested for regeneration efficiency (Yalcin-Mendi et al. 2004), the results are considered to be significant steps in the development of commercial transgenic melon cultivars.

Acknowledgement

This project was supported by Scientific Research Project (BAP) (Project No: ZF2012BAP2) of Çukurova University.

Literature

Bezirganoglu, I., Hwang, S. Y., Shaw, J. F., Fang, T. J. 2014. Efficient production of transgenic melon via Agrobacterium-mediated transformation. *Genetics and molecular research: GMR*, 13(2), 3218.

Bordas, M., Moreno, V., Roig, L. 1991. Organogenic and embryogenic potential

of several commercial lines of *Cucumis melo*. *Cucurbit Genetics Cooperative*, 14, 71-74.

Bordas, M., Montesinos, C., Dabauza, M., Salvador, A., Roig, L. A., Serrano, R., Moreno, V. Icente. 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research*, 6(1), 41-50.

Dong, J.Z., Yang, M.Z., Jia, S.R., Chua, N.H., 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Biotechnology* 9, 858-863.

Edwards, A. L., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., Chakraborty, R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12(2), 241-253.

Fang, G., Grumet, R. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant Cell Reports*, 9(3), 160-164.

Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties

- Guowei, F., Grumet, R. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of muskmelon plants. *Plant cell reports* 9(3):160-164.
- Kusvuran, S., Ellialtioglu, S., Yasar, F., Abak, K. 2007. Effects of salt stress on ion accumulations and some of the antioxidant enzymes activities in melon (*Cucumis melo* L.), *Inter. J. Food Agric. Environ.*, 2(5): 351- 354.
- Mendi, Y.Y., Ipek, M., Serbest-Kobaner, S., Curuk, S., Aka-Kacar, Y., Cetiner, S., Gaba, V., Grumet, R. 2004. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of 'Kırkagac 637' a Recalcitrant Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivar with ZYMV Coat Protein Encoding Gene. *Europ.J.Hort.Sci.*, 69 (6). S. 258–262, ISSN 1611-4426.
- Mendi, Y.Y., Izgu, T., Aka-Kacar, Y., Solmaz, I., Simsek, O., Sari, N. 2012. *Cucurbitaceae* 2012. Transformation in Melon. Proceedings of the Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (eds. Sari, Solmaz and Aras) Antalya (Turkey), October 15-18th.
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Pitrat, M., P. Hanelt and K. Hammer, 2000. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. *Acta Horticulturae* 510, 29—36.
- Serrano, R., Gaxiola, R. 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 121-138.
- Yalcin-Mendi, N. Y., Ipek, M., Serbest-Kobaner, S., Curuk, S., Kacar, Y. A., Cetiner, S., Grumet, R. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Kirkagac 637 recalcitrant melon (*Cucumis melo* L.) cultivar with ZYMV coat protein encoding gene. *European Journal of Horticultural Science*, 258-262.
- Zhang, H., Gao, G., Wang, X., Luan, F., 2014. An improved method of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of melon (*Cucumis melo* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23, 3: 278-283.



Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

Ali Demir KESKİNER¹ Mahmut ÇETİN¹ Mert UÇAN¹ Mehmet ŞİMŞEK²

Özet

Bu araştırmanın amacı; *Standardize Yağış İndeksi (SYİ)* yöntemi kullanılarak frekansı 2 ve 10 yıl olan bölgesel meteorolojik kuraklık haritalarının elde edilmesi ve bu haritalar yardımıyla kuraklık riski olan bölgelerin belirlenmesidir. Araştırma, 21 470 km² genişliğindeki Seyhan Havzasında yürütülmüştür. Havza sınırları içerisinde ve yakınında bulunan 41 adet meteoroloji gözlem istasyonundan temin edilen uzun yıllar aylık toplam yağış serileri incelenmiştir. İstasyonların gözlem yılı içerisindeki eksik verileri, aylık veriler kullanılarak regresyon analiz tekniği ile tamamlanmıştır. İstasyonlardan elde edilen aylık ve yıllık toplam yağış serileri kullanılarak *SYİ* elde edilmiştir. Yıllık yağışlara ilişkin *SYİ* serileri frekans analizine tabi tutulmuştur. Uygun olasılık dağılım modelleri %5 önem düzeyinde *Kolmogorov-Smirnov* uygunluk testi ile saptanmıştır. Olasılık dağılımlarından her istasyona ait 2 ve 10 yıl yinelenmeli *SYİ* değerleri belirlenmiştir. Bu değerler kullanılarak Ocak-Aralık periyodu için *Ordinary Cokriging* yöntemiyle Seyhan Havzasının 2 ve 10 yıl yinelenmeli bölgesel meteorolojik kuraklık haritaları çizilmiştir. On yıl yinelenmeli kuraklıkların, Seyhan havzasının önemli bir bölümünü etkisi altına aldığı ve ciddi risk oluşturduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Seyhan Havzası, CBS, standardize yağış indeksi, meteorolojik kuraklık.

Meteorological Drought Analysis With Different Return Periods by Using Standardized Precipitation Index In Geographic Information Systems Environment: A Case Study In The Seyhan River Basin

Abstract

Main objectives of this study were (1) to produce regional meteorological drought maps with return periods of 2 and 10 years by using Standardized Precipitation Index (*SPI*) approach, (2) to put forward areas prone to drought risk through using generated maps. To this end, this study was carried out in the Seyhan River Basin, covering 21 470 km² surface area. Long-term annual precipitation series of 41 meteorological observation stations scattered inside and near by the basin border were utilized in this study. Through using regression analysis technique, any missing precipitation data of meteorological stations were completed on monthly base. *SPI* values for monthly and yearly data were calculated accordingly. Then, the best fitting probability distribution models to *SPI* series of yearly precipitation data were determined by performing regular frequency analysis technique, and Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test was employed to figure out the most suitable probability model at the 5% significance level. *SPI* values with return periods of 2 and 10 years for each meteorological station were estimated from the probability distribution models determined. Regional meteorological drought maps of *SPI* values with return period 2 and 10 years were produced for the period January-December by using *Ordinary Cokriging* method. Drought maps revealed that a great portion of the Seyhan River Basin would be under the serious drought risk if the return period is 10-year.

Keywords: Seyhan Basin, GIS, standardized precipitation index, meteorological drought.

Giriş

İklim değişikliği ve süreçleri sonucunda dünyada ve ülkemizde yaşanan doğal afetlerin meydana gelme sıklıkları ve şiddetlerinde artışlar gözlenmektedir. Kuraklık; doğal afetler içerisinde en önemli doğal afetlerden biri olarak kabul edilmekle birlikte, ülkemizde en sık görülen ve en kapsamlı meteorolojik kökenli doğal afetlerden sayılmaktadır. Kuraklığın diğer doğal afetlerden farkı; daha fazla insanı etkilemesi ve oluşum sürecinin zamana yayılmasıyla en az anlaşılabilen bir felaket olmasıdır (Pamuk ve ark., 2004; Kapluhan, 2013; İçel, 2014). Kuraklık; sadece yağışın olmaması değildir. İnsanların talep ettikleri su miktarının karşılanamadığı yağışlı bölgelerde de yağışların belli bir süre boyunca normalden az olması kuraklığın oluşmasına neden olmaktadır (Topçu, 2013; Şahin ve Kurnaz, 2014). Etki alanına bağlı olarak çeşitli kuraklık tanımlamaları yapılmıştır. Meteorolojik, tarımsal, hidrolojik ve sosyo-ekonomik kuraklık tanımları en yaygın olanlardır (Fidan, 2011). Meteorolojik kuraklık; mevcut su kaynaklarında azalmaya neden olacak yağış miktarındaki azalma ile tanımlanır. Tarımsal kuraklık; bitkilerin gelişmek için ihtiyacı olan suyun toprakta belirli bir değerin altına düştüğünde meydana gelir. Hidrolojik kuraklık; akiferlerdeki, barajlardaki ve göllerdeki su miktarının istatistiksel ortalamasının altına düştüğünde oluşur. Sosyo-ekonomik kuraklık ise; su kıtlığının üretimde meydana getirdiği azalmaya bağlı insanların sosyo ekonomik yaşamında arz ve talep dengesinin bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır (Sırdaş, 2002; Topçu, 2013). Yarı kurak iklim kuşağında yer alan ülkemizde yapılan tahminlerde güney ve batı bölgelerde sıcaklık artışı ve yağış azalması beklenmektedir. Nitekim, tüm bölgelerde ve mevsimlerde oluşabilen meteorolojik, tarımsal ve hidrolojik kuraklık 1970'lerin başından beri daha sık ve şiddetli oluşabilmektedir (Türkeş ve ark., 2009; Şimşek, 2010). Ülkemizde; 1874-1877 döneminde meydana gelen kuraklığın, kıtlıklara ve hastalıklara yol açmak suretiyle yaklaşık 200 000 vatandaşın ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca; 1928, 1973, 1989, 1990, 1993, 1998-2001, 2008'de kuraklığın şiddetli

olarak yaşandığı yıllar olarak kaydedilmiştir (Duygu, 2015).

Belirli bir zaman periyodunda, yağışın normal değerlerin altına düşmesi olarak tanımlanan meteorolojik kuraklığın süresi, tarım alanlarının sulanmasında önemli sorunların yaşanmasına, barajlarda yeterli miktarda su toplanamamasına, içme suyu kaynaklarının yetersiz kalmasına, çevrenin ve sosyal yapının olumsuz yönde etkilenmesine neden olabilmektedir (Tonkaz ve Çetin, 2005). Kuraklığa karşı alınması gereken tedbirlerin, kuraklık ortaya çıkmadan önce alınması gereklidir. Bu tedbirler ise kuraklığın uzun süren etkilerini (kuraklık riskini) uzun dönemde ortadan kaldıracak özellikte olmalıdır (Sarıcan, 2015). Yaşanması muhtemel kuraklığın olumsuz etkilerinin azaltılabilmesi; kuraklık yönetimi ilkelerinin, strateji ve politikalarının iyi belirlenmesi yanında gerekli mevzuatların hazırlanması, kurumlar arası koordinasyonun sağlanması, veri tabanı teşkili ve kurak dönemlerde su kaynaklarının korunması ile sağlanabilir (Çetin ve ark., 2016). Ancak, olası bir kuraklığın *zamanının, süresinin ve şiddetinin* ne olacağına dair cevabın hala belirsizliğini koruduğu da unutulmamalıdır (Smakhtin ve Hughes, 2004; Oğuztürk ve Yıldız, 2014).

Kuraklığın zamanının, süresinin, şiddetinin ve yerinin önceden tahmin edilememesi; zamansal ve konumsal olarak kuraklığın sürekli izlenmesini zorunlu kılmıştır. Kuraklık izlenirken yağışlarda meydana gelen eksikliğin farklı zaman ölçüleri içinde kantitatif olarak ifade edilmesi gerekmektedir. Bu durum, yağış eksikliğinin farklı zaman dilimleri içindeki değişimini dikkate alabilen kuraklık indeksleri ile ortaya konabilmektedir (Hasaniha, 2008). Kuraklığı önceden tahmin etmek için bir çok kuraklık izleme yöntemi geliştirilmiştir (Doğan, 2013; Masoudi ve Hakimi, 2014). Bu yöntemler kullanıldığı bölgeye, iklime ve gözlem süresine bağlı olarak farklı etkinlikte çözümlenmeler yapabilmektedir (Hayes, 2007). Farklı zaman ölçeklerinde etkili olabilen kuraklık olaylarını incelemek ve izlemek için geliştirilen yöntemlerin indeks ve eşik (sınır) değerleri ile çalışılan bölge için kuraklık hakkında yorumlar yapılmaktadır. İndeks ve eşik değerleri; kuraklık koşullarının başlangıcını

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

saptamak, kuraklık olaylarını ölçmek, izlemek ve kuraklık afetinin büyüklüğünü saptamak açısından önemlidir (Sarıcan, 2015). Hızlı bir şekilde şiddetini artıran veya aniden sona erebilen meteorolojik kuraklığın izlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de *Standardize Yağış İndeksi (SYİ)* yöntemidir (MGM, 2016). Bu yöntemin; yalnızca yağış verisine ihtiyaç duyması, hesaplamalardaki kolaylıkları ve güvenilir olması tüm dünyada en çok kullanılan kuraklık indeksleri arasına girmesine neden olmuştur (Arslan ve ark., 2016).

Yapılan araştırmalarda; Seyhan Havzasında beklenen yağışlarda %30-35 arasında bir azalma (Kanber ve ark., 2003) meydana geleceği tahmin edilmektedir. Üstelik Seyhan Havzasında 2070 yılında hava sıcaklığının 2-3.5 °C arasında artacağı da öngörüler arasındadır. Bu durum, hafif ve orta derece kuraklık sınırında bulunan havzada daha şiddetli kurak dönemlerin yaşanma olasılığını artıracaktır (Topçu, 2013). Kuraklık, eğer izlenebilirse etkileri en aza indirilerek alansal ve zamansal değişimi takip edilebilir (Sırdaş, 2002). Kuraklığın belirleme, değerlendirme ve izleme çalışmalarında kapsamlı bir *Kuraklık Yönetim Planı* yapılmalıdır. Bu tür planlamalarda çeşitli kuraklık indeks sınıflarının olasılıklarının hesaplanması ve bilinmesi çok önemlidir (Türkeş ve Tatlı, 2008). Bu nedenle, mevcut durumda Seyhan Havzasında ortalama yağış yüksekliğinin bilinmesi, kuraklığa eğilimli alanların ortaya konulması ve olasılıklı kuraklık eşik değerlerinin haritalanması alınacak önlemler bakımından oldukça önemlidir. Dolayısıyla, olasılık analizi sonuçlarına göre 2 ve 10 yıl yinelenmeli (tekerrürlü) elde edilecek haritaların kuraklık analizlerinde kullanılması önem arz etmektedir. *Kuraklık Yönetim Planı* çerçevesinde olası bir kuraklık durumu bu haritalar yardımıyla izlenebilecek, kuraklık riski taşıyan bölgeler belirlenebilecektir. Böylece, alınması gereken önlemler bakımından *Kuraklık Yönetim Planının* etkinliği artabilecektir. Seyhan Havzasında yürütülen bu çalışma ile;

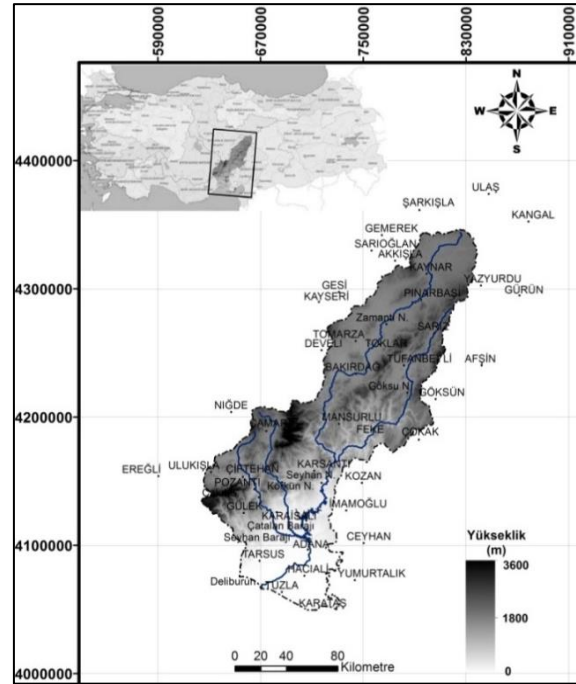
1. SYİ yöntemi kullanılarak; 2 ve 10 yıl yinelenmeli olasılıklı bölgesel meteorolojik kuraklık haritalarının elde edilmesi,
2. Elde edilen haritalar yardımıyla; *Kuraklık Yönetim Planı* çerçevesinde SYİ yöntemine göre

kuraklık riski olan bölgelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bu çalışma; 21 470 km² (Çetin ve ark., 1998) genişliğindeki, Doğu Akdeniz bölgesinde 36°33'-39°12' kuzey enlemleri ile 34°24'-36°56' doğu boylamları arasında yer alan (Öztopal ve Şen, 2007) Seyhan Havzasında yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Seyhan Havzasının Sayısal Yükseklik Modeli görüntüsü

Meteoroloji Genel Müdürlüğü tarafından işletilen Seyhan Havzası içinde ve havza sınırına yakın 41 adet meteoroloji gözlem istasyonuna (MGİ) ait uzun yıllar (1950-2006) aylık ve yıllık toplam yağış serileri ile çalışılmıştır. Araştırmada, Seyhan Havzasına ait 100×100 metre çözünürlükte Sayısal Yükseklik Modeli (SYM) haritası kullanılmıştır.

Yöntem

Regresyon Analizi

Eksik aylık toplam yağış (Y) serilerinin tamamlanmasında Eşitlik 1 ile gösterilen doğrusal polinom tipi regresyon modeli kullanılmıştır. Verilerin tamamlanmasında serisi tamamlanacak ay esas alınarak tam aylık seriye

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

sahip uzun yıllar ardışık iki ayın gözlemleri seçilmiştir. Bağımlı ve bağımsız değişken olarak kullanılan bu veriler ile oluşturulan regresyon modeli ile eksik veriler tamamlanmıştır. Model parametreleri, Landau ve Everitt (2004), Ryan ve Cryer (2005) tarafından belirtilen yöntem izlenerek *MINITAB* ve *SPSS* istatistiksel paket programları ile belirlenmiştir.

$$Y = b_0 + b_1 X + e \quad (1)$$

Burada Y , bağımlı değişken; X , bağımsız değişken; b_i , regresyon katsayıları ve e , hata terimidir.

Frekans Analizi

SPI_SL_6 (WMO, 2012) programı ile uzun yıllık aylık toplam yağış serileri kullanılarak her istasyon ve her yıla ait 12 aylık periyot için elde edilen *SYİ* serilerinin frekans analizleri *BestFit* (2004) ortamında yapılmıştır. Olasılık dağılımlarının uygunluk testleri (Tülücü, 2002) %5 önem düzeyinde *Kolmogorov-Smirnov* testi ile gerçekleştirilmiştir. Belirlenen dağılımlara ilişkin "*frekans faktör eşitliği*" (Chow ve ark., 1988) yardımıyla, *SYİ* yönteminde kullanılmak üzere; 2 ve 10 yıl yinelenmeli *SYİ* değerleri her istasyon için ayrı ayrı kestirilmiştir (Eşitlik 2).

$$\left. \begin{aligned} X_{p\%} &= \bar{X} + K_{p\%} S \\ Tr &= \frac{1}{P\%} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

Burada S , standart sapma; \bar{X} , frekans analizine tabi tutulan veri setinin ortalaması; $X_{p\%}$, incelenen değişkenin belirlenen olasılık düzeyinde ($P\%$) beklenen değeri; Tr , belirlenen olasılık düzeyinin yinelenme yılı ve $K_{p\%}$, frekans faktörü olup, belirlenen olasılık düzeyinde ($P\%$) verilen frekans dağılımının bir özelliğidir.

Standardize Yağış İndeksi (*SYİ*)

Meteorolojik, tarımsal ve hidrolojik kuraklıkla ilgili çalışmalarda kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Farklı iklimlere

sahip bölgelerin kuraklığını tanımlamak amacıyla yağış parametresini tek bir sayısal değere dönüştüren *Standardize Yağış İndeksi (SYİ)* yöntemi Mckee ve ark. (1993) tarafından geliştirilmiştir. Araştırmacılar tarafından özellikle 3, 6, 12, 24, 48 ve 72 ay gibi periyotlar için kuraklığı hesap etmede kullanılır. *SYİ* kuraklık sınıfları (Çizelge 1), standart normal (Gaussian) dağılımlı yağış verilerinden elde edilmesine karşın, yağışların olasılık dağılım fonksiyonu (*ODF*) normal dağılıma uymaz. Yağış verilerine en iyi uyan olasılık dağılımı Gamma dağılımıdır. Bu nedenle *SYİ* yöntemi ile yapılan kuraklık analizlerinde, önce yağış toplamlarının *ODF*'sinin, Gamma *ODF*'sine dönüştürülmesi gerekir. Gamma *ODF*'den elde edilen yağış olasılıkları, ters-standart normal dağılım fonksiyonu kullanılarak, standart yağışlar hesaplanır. Bu yolla, ortalaması sıfır ve varyansı bir olan standartlaştırılmış yağış indeksleri elde edilmiş olur. *SYİ* değerleri dikkate alınarak yapılan bir kuraklık değerlendirmesinde indeksin sürekli olarak negatif olduğu zaman periyodu, "*kurak dönem*" olarak tanımlanmaktadır. Kuraklık, *SYİ*'nin ilk önce sıfırın altına indiği zaman başlar ve tekrar pozitif olduğunda son bulur. Bu yöntemle göre kurak dönemlerin sınıflandırılması, Çizelge 1'e göre yapılmaktadır.

Çizelge 1. *SYİ* yöntemi değerleri ve kuraklık sınıflandırılması (Mckee ve ark., 1993; Hayes, 2007)

<i>SYİ</i> değerleri	Kuraklık sınıfı
2.00 ve üzeri	Aşırı nemli
1.5 ile 1.99	Çok nemli
1.00 ile 1.49	Orta düzeyde nemli
-0.99 ile 0.99	Normal
-1.00 ile -1.49	Orta düzeyde kurak
-1.50 ile -1.99	Şiddetli kurak
-2.00 ve altı	Aşırı kurak

SYİ, seçilmiş bir zaman dilimi içinde yağışın ortalamadan olan farkının standart sapmaya bölünmesi ile elde edilir. Eşitlik 3'de verilen denklem takımıyla tanımlanabilir (Sırdaş, 2002; Pamuk ve ark., 2004; Türkeş ve Tatlı, 2008; Fidan, 2010; Topçu, 2013; Sarıcan, 2015; Arslan ve ark., 2016; Paulo ve ark., 2016)

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

$$SYI_{ij} = \frac{X_{ij} - \mu_j}{\sigma_j} \quad (3)$$

Bu eşitlikte: X_{ij} , bir istasyonda j ayında gözlenen yağış değerlerini; μ_j , j ayı yağış serisinin beklenen değerini; σ_j , serinin standart sapmasını göstermektedir.

Ordinary Cokriging

Bu yöntemle; gözlem değerlerinin deneysel teorik Covariaogram model parametreleri ve *cokriging* tahmin parametreleri kullanılarak tahminler yapılır. Ordinary Kriging yönteminden farkı, gözlenen değerlerin yanı sıra tahminlerde yardımcı bir değişkenin eklenmesidir. Araştırmada, 2 ve 10 yıl yinelenmeli *SYİ* kuraklık eşik değerlerinin

haritalanmasında ikinci (yardımcı) değişken olarak Seyhan Havzası *SYM* görüntüsü (yükselteleri) kullanılmıştır. *Ordinary Cokriging* yöntemiyle 2 ve 10 yıl yinelenmeli (%50 ve %10 olasılıkla beklenen) Seyhan Havzasının *SYİ* haritaları oluşturulmuştur. Covariogramın oluşturulması ve *cokriging* tahminlerine ilişkin matematiksel eşitlikler Goovaerts (1998)'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

**Araştırma Bulguları ve Tartışma
Regresyon Analizi Sonuçları**

İstasyonların aylık yağış serilerinin eksik gözlemleri doğrusal regresyon modelleri ile tamamlanmıştır. Araştırmada regresyon yöntemi ile serisi uzatılan 12 istasyon ile ilgili bilgiler Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Regresyon yöntemi ile aylık toplam yağış serileri uzatılan istasyonlar

SN	İstasyonlar	Gözlem Süresi	Uzatılan Ay Sayısı	Uzatılan Yıllar	SN	İstasyonlar	Gözlem Süresi	Uzatılan Ay Sayısı	Uzatılan Yıllar
1	Afşin	32	6	1984	7	Pozantı	18	7	1992
			1	2006				9	1993
2	Çamardı	18	8	1983	8	Sarıoğlan	15	4	1999
			7	1984				9	1989
			6	1994					4
3	Feke	20	8	1994	9	Tarsus	13	8	1997
4	Gülek	32	6	1979				10	Tufanbeyli
			1	1980	5	1993			
			4	1997	8	1997			
			5	2003	11	Tuzla	11	8	1985
			6	2004				7	1995
			6	2005				4	1976
5	Hacıali	14	9	1989	12	Ulaş	18	5	1978
			5	1991				7	1993
6	Kangal	32	3	1979				4	1998
			4	1980					

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

Frekans Analizi Sonuçları

Meteoroloji Gözlem İstasyonlarının uzun yıllık aylık toplam yağış serilerinin, 12 aylık periyot için (yıllık) hesaplanan her yıla ait *SYİ* değerleri kullanılarak *SYİ* serilerinin frekans analizi yapılmıştır. Gözlem istasyonlarına ait uzun yıllık gözlem süreleri için hesaplanan 12 aylık yağış toplamalarına ilişkin olan *SYİ* serilerine uyan olasılık dağılım modelleri

Çizelge 3'te verilmiştir. Seyhan havzasında, yıllık yağışların *SYİ* değerlerinin %39 oranında *Logistic* dağılımla temsil edildiği bulunmuştur. Havzada 7 farklı olasılık dağılımının hakim olduğu saptanmıştır. Bu dağılımların, 16'sı *Logistic*, 9'u *Weibull*, 6'sı *Normal*, 5'i *Betagenral*, 2'si *InverseGauss*, 2'si *Log-Logistic* ve 1 adet *Extreme Value* dağılımları olduğu görülmüştür.

Çizelge 3. Araştırmada kullanılan istasyonların uzun yıllık *SYİ* serilerinin uyduğu olasılık dağılım modelleri

S.N	İstasyon Adı	Frekans Dağılımı	S.N	İstasyon Adı	Frekans Dağılımı
1	Kangal	INVERSEGAUSS	22	Niğde	LOGISTIC
2	Yazyurdu	NORMAL	23	Çamardı	WEIBULL
3	Ulaş	LOGISTIC	24	Mansurlu	NORMAL
4	Şarkışla	WEIBULL	25	Feke	BETAGENERAL
5	Gemerek	BETAGENERAL	26	Çokak	BETAGENERAL
6	Sarıoğlan	EXTREME VALUE	27	Karsantı	LOGISTIC
7	Akkışla	INVERSEGAUSS	28	Çiftahan	NORMAL
8	Kaynar	LOGISTIC	29	Ulukışla	WEIBULL
9	Gürün	WEIBULL	30	Ereğli	LOGISTIC
10	Pınarbaşı	NORMAL	31	Pozantı	NORMAL
11	Gesi	LOGISTIC	32	Gülek	LOGISTIC
12	Kayseri	LOGISTIC	33	Karaisalı	LOGISTIC
13	Develi	LOGISTIC	34	İmamoğlu	LOGISTIC
14	Tomarza	BETAGENERAL	35	Ceyhan	LOGISTIC
15	Toklar	LOG-LOGISTIC	36	Yumurtalık	WEIBULL
16	Adana	WEIBULL	37	Karataş	LOGISTIC
17	Sarız	WEIBULL	38	Kozan	NORMAL
18	Afşin	WEIBULL	39	Tuzla	WEIBULL
19	Göksün	BETAGENERAL	40	Tarsus	LOGISTIC
20	Tufanbeyli	LOGISTIC	41	Hacıali	LOG-LOGISTIC
21	Bakırdağ	LOGISTIC			

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

**Standardize Yağış İndeksi (SYİ)
Frekans Analizi Sonuçları**

Araştırmada kullanılan istasyonların uzun yıllık aylık toplam yağış serilerinin Ocak-Aralık periyodu için frekans analizi ile hesaplanan 2 ve 10 yıl yinelenmeli SYİ değerleri Çizelge 4'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde; Seyhan

Havzası için hesaplanan 2 yıl yinelenmeli SYİ değerlerinin normal kuraklık sınıflandırılmasına dahil olduğu görülmüştür. Havza için hesaplanan 10 yıl yinelenmeli SYİ değerlerinin ise orta düzey kurak sınıfında yer aldığı bulunmuştur.

Çizelge 4. Araştırmada kullanılan istasyonların yıllık yağışlarına ilişkin SYİ serilerinin farklı yinelenme yılları için (*Tr*) elde edilen değerleri

S.N	İstasyon Adı	SYİ		S.N	İstasyon Adı	SYİ	
		Tr=2	Tr=10			Tr=2	Tr=10
1	Kangal	-0.08	-1.23	22	Niğde	0.06	-1.15
2	Yazyurdu	0.00	-1.32	23	Çamardı	0.11	-1.32
3	Ulaş	-0.04	-1.35	24	Mansurlu	0.00	-1.31
4	Şarkışla	0.14	-1.32	25	Feke	-0.10	-1.49
5	Gemerek	-0.03	-1.33	26	Çokak	0.04	-1.56
6	Sarıoğlan	-0.18	-1.11	27	Karsantı	-0.01	-1.19
7	Akkışla	0.00	-1.26	28	Çiftehan	0.00	-1.31
8	Kaynar	-0.02	-1.26	29	Ulukışla	0.14	-1.32
9	Gürün	0.02	-1.29	30	Ereğli	0.05	-1.13
10	Pınarbaşı	0.00	-1.30	31	Pozantı	0.00	-1.32
11	Gesi	0.13	-1.11	32	Gülek	0.02	-1.29
12	Kayseri	0.00	-1.25	33	Karaisalı	0.02	-1.30
13	Develi	0.03	-1.18	34	İmamoğlu	-0.02	-1.22
14	Tomarza	0.02	-1.34	35	Ceyhan	0.00	-1.28
15	Toklar	-0.13	-1.18	36	Yumurtalık	0.00	-1.28
16	Adana	-0.15	-1.19	37	Karataş	0.02	-1.23
17	Sarız	-0.04	-1.28	38	Kozan	0.00	-1.30
18	Afşin	0.06	-1.28	39	Tuzla	-0.13	-1.21
19	Göksün	0.04	-1.44	40	Tarsus	0.03	-1.22
20	Tufanbeyli	0.07	-1.14	41	Hacıali	-0.20	-1.11
21	Bakırdağ	0.05	-1.18				

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

Ordinary Cokriging Haritalama

Sonuçları

Seyhan Havzasında meteoroloji gözlem istasyonlarının hesaplanan uzun yıllık *SYİ* serilerinin 2 ve 10 yıl yinelenmeli *SYİ* değerlerinin haritalanması *Ordinary Cokriging* yöntemi (Çetin ve ark., 2016) ile gerçekleştirilmiştir. Haritalamada kullanılan küresel tip (Keskiner, 2008; Atlı, 2010) teorik covariogram model parametreleri ve *cokriging*

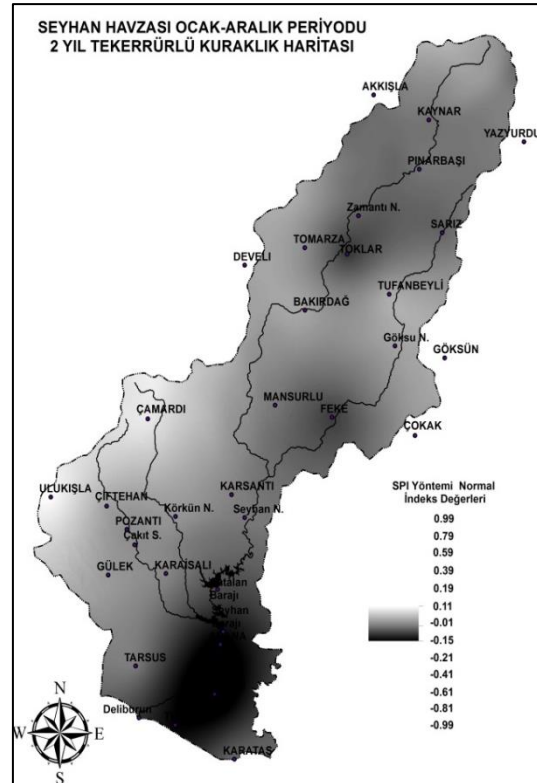
tahmin parametreleri Çizelge 5’te sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde etki uzaklığı (A) değerinin $Tr=2$ yıl için istasyonlar arası mesafenin 51585 metreden sonra etkinliğini kaybettiğini; dolayısıyla, sektör yarıçaplarının bu mesafeden daha fazla seçilmemesi gerektiğini göstermiştir. Böylelikle tahminler bu yarıçaplı sektörler arasında bulunan istasyonlarla kestirilmiştir. $Tr=10$ yıl için ise etki uzaklığı 61861 metre hesaplanmıştır.

Çizelge 5. İki yıl (Tr_2) ve on yıl yinelenmeli (Tr_{10}) *SYİ* değerlerinin haritalanmasında kullanılan *Ordinary Cokriging* modeli ve tahmin parametreleri

Teorik Covariogram Model Parametreleri						Cokriging Tahmin Parametreleri			
Tekerrür	Lag uzunluğu (m)	Lag adeti	C_0 (m)	C_I (m)	A(m)	Sektör Bilgileri			
						Düzeltilme Faktörü:0.2		Tahminde Kullanılan Minimum ve Maksimum İstasyon Sayısı	
						Sektör Sayısı:4			
						Sektör Yarıçapları (m)			
X Yönünde	Y Yönünde	Minimum	Maksimum						
Tr_2	7129	12	2021	42830	51585	51000	51000	2	5
Tr_{10}	10700	12	0	58547	61861	61000	61000	2	5

Seyhan Havzası Ocak-Aralık Periyodu 2 Yıl Yinelenmeli Meteorolojik Kuraklık Haritası Sonuçları

Her istasyonun uzun yıllık aylık toplam yağış değerlerinden faydalanılarak, istasyonların yıllık yağış değerlerine ilişkin olarak hesaplanan *SYİ* serilerinin frekans analizi sonuçları ile 2 yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık haritası oluşturulmuştur. Her istasyon için elde edilen 2 yıl yinelenmeli *SYİ* değerlerinin ArcGIS (Esri, 2016) yazılımıyla 100x100 metre çözünürlükte raster haritası çizilmiştir. Bu haritada; 2 yıl yinelenmeli *SYİ* değerlerinin yersel değişimleri ve alansal dağılımları gösterilmiştir (Şekil 2). Harita incelendiğinde; Seyhan Havzasının tamamında 2 yıl yinelenmeli *SYİ* değerlerinin, kuraklık sınıflandırılmasına göre (Çizelge 1) “Normal” olduğu bulunmuştur. Bu durum, havzada 2 yıl yinelenmeli kuraklık riskinin beklenmediği anlamına gelmektedir. Ancak, 2 yıl yinelenmeli Ocak-Aralık periyodu kuraklık haritasında dikkati çeken; Seyhan Barajından sonra, Seyhan Nehrinin Deliburun’a kadar akış gösterdiği bölgenin diğer bölgelere nazaran 2 yılda bir beklenen kuraklıktan en çok etkilenebilecek alan olduğu bulunmuştur. Lejantta da görüldüğü üzere *SYİ* değerleri



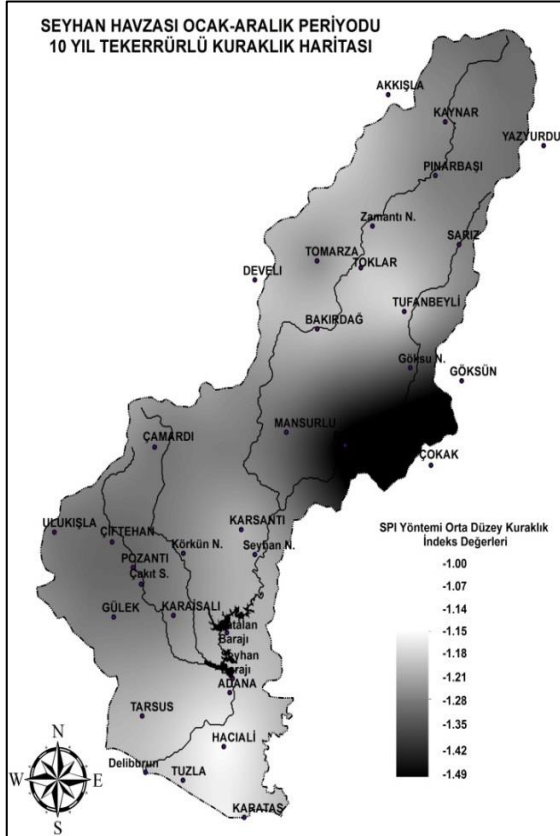
Şekil 2. İki yıl yinelenmeli bölgesel meteorolojik kuraklık haritası

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

“orta düzey kuraklık” indeks değerlerinden uzaktır. Ancak, ilerleyen yıllarda Seyhan Barajı depolamasından sonra Adana, Hacıali ve Tuzla istasyonları hattında 2 yıl yinelenmeli orta düzey kuraklık riski altında olan bölgeler sınıfına dahil olacağı öngörülebilir. Ayrıca, bu bölgeler 0-250 metre yükselteli bölgeler olup, havzanın düz ve düze yakın olan ovalık kesimleridir. Bu durumdan, ovalık alanların 2 yılda bir beklenen tekerrürdeki kuraklıktan daha fazla etkileneceği anlamı da çıkarılabilir.

Seyhan Havzası Ocak-Aralık Periyodu 10 Yıl Yinelenmeli Meteorolojik Kuraklık Haritası Sonuçları

On yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık haritası; 2 yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık haritası ile aynı şekilde oluşturulmuştur. ArcGIS yazılımıyla, her istasyon için elde edilen 10 yıl yinelenmeli SYİ indeks değerlerinin 100x100 metre çözünürlükte raster haritası bu yinelenme yılı için de elde edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. SYİ yöntemine göre 10 yıl yinelenmeli bölgesel meteorolojik kuraklık haritası

Görüldüğü üzere; 2 yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık haritasından çok farklı bir harita elde edilmiştir. Harita incelendiğinde; SYİ değerlerinin “orta düzey kurak” sınıflamasına dahil olduğu görülmüştür. Seyhan Havzasının tamamının 10 yılda bir “orta düzey kuraklık” riski altında olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu haritanın, ortalama yağışların dağılım tavrına paralel bir değişim gösterdiği de açıktır. Bu davranış, beklenen bir durumdur. Örneğin; Mansurlu, Feke, ve Çokak’ın yıllık toplam yağış değerlerinin ortalamaları diğer bir ifadeyle %50 olasılıkla beklenen değerleri (Çetin ve ark., 2016) sayıldığı sıraya göre; 971 mm, 934 mm ve 1471 mm’dir. Adı geçen bu istasyonların bulunduğu bölgeler ise SYİ değerlerine göre en fazla “orta düzey kuraklık” riski altında olan yerlerdir. Diğer bir ifadeyle 10 yılda bir “orta düzey kuraklık” riskini en fazla taşıyan bölgelerdir. Bu bölgelerde yağış ortalamasının havzadaki birçok bölgenin 2 katından fazla olmasına rağmen şiddetli orta düzey kuraklık riski altında olması bu bölgenin ortalama yağışlarının yüksek olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bu durum, “Su miktarının karşılanamadığı yağışlı bölgelerde de yağışların belli bir süre boyunca normalden az olması kuraklığın oluşmasına neden olmaktadır” savını da destekler niteliktedir. Ayrıca, bu bölgelerde beklenen kuraklık düzeyinin SYİ kuraklık sınıflamasına göre “Şiddetli Kuraklık” eşik değerlerine çok yakın olduğu da dikkati çekmektedir. Mansurlu, Feke, ve Çokak’ı kapsayan bu bölgenin ileriki yıllarda 10 yılda bir şiddetli kuraklık riski altında kalma olasılıkları yüksek görülmektedir. Bu nedenle Kuraklık Yönetim Planı çerçevesinde alınacak tedbirler bakımından bu bölgelerin öncelikli ele alınması gereklidir.

Sonuç ve Öneriler

Kuraklık Yönetim Planı çerçevesinde Ocak-Aralık periyodu için 2 ve 10 yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık riski taşıyan bölgeler bu haritalar yardımıyla net bir şekilde anlaşılabilir.

Seyhan Havzasında 2 yıl yinelenmeli meteorolojik kuraklık haritasına göre, havzanın 2 yılda bir kuraklık yaşama riski düşüktür. Diğer bir ifadeyle Seyhan Havzasında 2 yılda

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

bir ciddi anlamda kuraklık riski beklenmemektedir. Seyhan Havzasının tamamı SYİ yöntemine göre kuraklık "Normal" olarak sınıflandırılmıştır.

Seyhan Havzasının tamamında SYİ yöntemine göre 10 yılda bir beklenen tekrürde "Orta Düzey Kuraklık" beklenmektedir. Bu durum, Seyhan Havzası ile ilgili daha önce yapılan Seyhan Havzasının hafif ve orta derece kuraklık sınırında bulunduğunu belirten kuraklık araştırma sonucuyla örtüşmüştür. On yılda bir beklenen SYİ kuraklık indeks değerlerinin "Şiddetli Kuraklık" eşik değerlerine çok yaklaşması, bu sonuçları desteklemiştir.

Meteorolojik kuraklığın "Ne zaman?", "Hangi sürede?" ve "Ne şiddette?" olacağı yönündeki belirsizlik Seyhan Havzasında yapılan bu haritalar yardımıyla bir ölçüde giderilebilecektir. Bu haritalar kullanılarak Kuraklık Yönetim Planı çerçevesinde kuraklık riski olan bölgeler daha etkin bir şekilde izlenerek acil önlem alınması gereken bölgeler hızlı bir şekilde belirlenebilecektir.

Kuraklığın etkili olduğu alanlar, yinelenme yılı arttıkça genişleyecektir. Bu noktadan hareketle, Seyhan Havzasında SYİ yöntemi ile yapılan kuraklık analizine göre, 10 yıl ve daha büyük yinelenme yıllarında oluşacak kuraklıklar havzanın tamamını etkileyecek yayılıma sahip olup, havzanın tamamı su kaynakları yönetimi bakımından risk altında olacaktır. Kuraklık Yönetim Planı çerçevesinde Seyhan Havzası ile ilgili önleyici tedbirler alınırken, elde edilen araştırma sonuçları ve haritalarda gösterilen kuraklık yayılım alanları kullanılabilir.

Kaynaklar

- Arslan, O., Bigil, A., Veske, O. (2016) Standart yağış indisi yöntemi ile Kızılırmak Havzası'nın meteorolojik kuraklık analizi. Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi 5(2): 188-194.
- Atlı, A. (2010) Yer altı suyu (YAS) kirlenme potansiyelinin, CBS tabanlı Drastic modeli kullanılarak belirlenmesi ve Erzin ovası YAS hassasiyet haritalarının geliştirilmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.

BestFit (2004) Users's Guide @Risk Risk Analysis And Simulation Add-In For Microsoft®Excel. <http://www.palisade.com/support/manuals.asp>. Erişim tarihi: 27 Kasım 2016.

Chow, V.T., Maidment D.R., Ways L.W. (1988) Applied Hydrology. McGraw-Hill, Inc., Civil Engineering Series, 572 p, New York.

Çetin, M., Keskiner, A. D., Nagano, T., Kubota, J. (2016) Coğrafi bilgi sistemleri ortamında olasılıklı bölgesel meteorolojik kuraklık analizi: Seyhan Havzası örneği. 13. Ulusal Kültürteknik Kongresi, Akdeniz Üniv. Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, 12-15 Nisan 2016, Antalya, Sözlü Bildiri, Bildiriler Kitabı, sayfa 332-339.

Çetin, M., Topaloğlu, F., Yücel A., Tülücü K. (1998) Yağış kayıtları ve bazı önemli istatistiklerin jeostatistik yöntemle incelenmesi: Seyhan Havzası örneği. II. Ulusal Hidroloji Kongresi, sayfa 75-82, İstanbul.

Doğan, S. (2013) Konya kapalı havzası kuraklık karakterizasyonunun zamansal-konumsal analizi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi.

Duygu, M.B. (2015) Büyük menderes havzasının kuraklıktan etkilenebilirliğinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Su Yönetimi Genel Müdürlüğü, Ankara.

Esri (2016) Spatial Analysis. <http://www.esri.com>. Erişim tarihi: 27 Kasım 2016.

Fidan, İ. (2011) Doğu Akdeniz Bölgesinde standardize yağış indisi (SYİ) ile kuraklık analizi ve Markov zinciri yöntemini kullanarak kurak olma olasılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.

Goovaerts, P. (1988) Ordinary cokriging revisited. Mathematical Geology. International Association for Mathematical Geology 30(1): 21-42.

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

- Hasaniha, H. (2008) İran'ın kuzeybatısında kuraklık ve verim ilişkisinin analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Hayes, M.J. (2007) Drought indices. Western Water Assessment, Feature Article From Intermountain West Climate Summary, Colorado, USA.
- İçel, G. (2014) Mersin'de meteorolojik ve hidrometeorolojik afetler. International Periodical for the Languages, Literature and History of Turkish or Turkic 9(11): 263-282.
- Kanber, R., Kapur, B., Ünlü, M., Tekin, S., Koç D.L. (2003) İklim değişiminin tarımsal üretim sistemleri üzerine etkisinin değerlendirilmesine yönelik yeni bir yaklaşım: ICCAP Projesi. TMMOB 2. Su Politikaları Kongresi, 83-94.
- Kapluhan, E. (2013) Türkiye'de kuraklık ve kuraklığın tarıma etkisi. Marmara Coğrafya Dergisi 27: 487-510.
- Keskiner, A.D. (2008) Farklı olasılıklı yağış ve sıcaklıkların CBS ortamında haritalanmasında uygun yöntem belirlenmesi ve M. Turc yüzey akış haritasının geliştirilmesi: Seyhan Havzası örneği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- Landau, S., Everitt S.B. (2004) A Handbook of Statistical Analyses. A Crc Press Company, Washington.
- Masoudi, M., Hakimi S. (2014) A new model for vulnerability assessment of drought in Iran using percent of normal precipitation Index (PNPI). Iranian Journal of Science & Technology 38A4: 435-440.
- McKee, T. B., Doesken, N. J., Kleist, J. (1993) The relationship of drought frequency and duration to time scales. Eighth Conference on Applied Climatology, 17-22 January, Anaheim, California.
- MGM (2016) Meteoroloji Genel Müdürlüğü. <http://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/kuraklik-analizi.aspx?> Erişim tarihi: 27 Kasım 2016.
- Oğuztürk, G., Yıldız, O. (2014) Kırıkkale ili'nde farklı zaman periyotları için kuraklık analizi. International Journal of Engineering Research and Development 6:2.
- Öztopal, A., Şen, Z. (2007) Bildiri kitabı. I. Türkiye iklim değişikliği kongresi, 11-13 Nisan, İTÜ, İstanbul.
- Pamuk, G., Özgürel, M., Topçuoğlu K. (2004) Standart yağış indisi (SPI) ile Ege bölgesinde kuraklık analizi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 41 (1):99-106.
- Paulo, A., Martins, D., Pereira, L.S. (2016) Influence of precipitation changes on the SPI and related drought severity. An analysis using long-term data series. Water Resour Manage Doi 10.1007/s11269-016-1388-5.
- Ryan, B.F., Cryer, J. (2005) Minitab Handbook. Fifth Edition, Regression and Correlation, in:313-349, Belmont, California.
- Sarıcan, Y. (2015) Avrupa Birliği ve Türkiye'de kuraklık yönetimi uygulamalarının değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Su Yönetimi Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Sırdaş, S. (2002) Meteorolojik kuraklık modellemesi ve Türkiye uygulaması. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Smakhtin, V. U., Hughes D. A. (2004) Review, automated estimation and analyses of drought indices in South Asia. International Water Management Institute Working Paper 83: 25.
- Şahin, Ü., Kurnaz, L. (2014) İklim değişikliği ve kuraklık. İstanbul Politikalar Merkezi Araştırma Raporu, Ekim 2014, İstanbul.
- Şimşek, O. (2010) Türkiyede tarım yılı kuraklık değerlendirilmesi ve bitki gelişim modeli ile buğdayda kuraklık-verim analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Tonkaz, T., Çetin, M. (2005) Şanlıurfa'da kuraklık şiddetinin standardize yağış indeksi ile belirlenmesi ve kuraklık gidiş analizi. GAP IV. Tarım Kongresi, 21-23 Eylül 2005, Şanlıurfa.
- Topçu, E. (2013) L-Momentler ve standart yağış indeksi (SYİ) yardımıyla Seyhan

Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası Örneği

- Havzası kuraklık analizi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- Tülücü, K. (2002) KT-310 Uygulamalı Hidroloji. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 138 Ders Kitabı:A-143, 315 s., Adana
- Türkeş, M., Akgündüz A.S., Demirörs Z. (2009) Palmer kuraklık indisi'ne göre iç anadolu bölgesi'nin Konya bölümündeki kurak dönemler ve kuraklık şiddeti. Coğrafi Bilimler Dergisi 7 (2): 129-144.
- Türkeş, M., Tatlı, H. (2008) Aşırı kurak ve nemli koşulların belirlenmesi için yeni bir standartlaştırılmış yağış indisi (yeni-*SPİ*):Türkiye'ye uygulanması. IV. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu Bildiri Kitabı, 25-28 Mart 2008, İstanbul.
- WMO (2012) Standardized Precipitation Index User Guide. World Meteorological Organization, 1090:16.



Üzüm Çekirdeklerinin Temel Biyoaktif Bileşenleri

Onur SEVİNDİK⁽¹⁾

Serkan SELLİ⁽¹⁾

Özet

Üzüm çekirdeği, üzüm yetiştiriciliğinde dünyada önemli bir yere sahip ülkemiz için, sahip olduğu zengin biyoaktif bileşenlerle meyve suyu ve şaraphane işletmelerinin ekonomik açıdan önemli bir geri dönüşüm ürünüdür. Son yıllarda gıda, farmasotik ve kozmetik sektörleri için oldukça değerli bir hammadde haline gelen üzüm çekirdekleri, sahip oldukları zengin yağ asitleri, tokoller, fenol bileşikleri ve steroller gibi birçok farklı alanda kullanılacak bileşenlerle önemli bir potansiyele sahiptir. Bu anlamda ülkemizde bu konuya olan ilgi son zamanlarda artmış ve çeşitli tesislerde üzüm çekirdeği yağı üretimi faaliyete geçmiştir. Bu derlemede üzüm çekirdeğinin bulundurduğu önemli biyoaktif bileşenler ve bu bileşenlerin üzümün olgunlaşma evreleri boyunca değişimleri ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Üzüm çekirdeği, üzüm çekirdeği yağı, biyoaktif bileşikler

Main Bioactive Compounds of Grape Seeds

Abstract

Grape seeds, reveals from surpluses of fruit juice and wine industry, is potentially an important raw material for, food, cosmetic and pharmaceutic sectors due to its precious bioactive ingredients such as fatty acids, tocopherols, phenolics and sterols. Grape seeds and its extracts are drawing interests of the new researches, investments and trade routes in Turkey as one of those biggest producer countries of grape cultivation. Therefore, grape seed oil production has been started up already in certain plants which economically plays a crucial role in the valorisation of these seeds. In this review, bioactive compounds of grape seeds and their changes during ripening stages were discussed in depth.

Keywords: Grape seed, grape seed oil, bioactive compounds

Giriş

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyve suyu ve özellikle şarap sektörünün en temel hammadde kaynağı, üzüm posası ise bu meyveyi işleyen işletmelerin ana atığı olarak bilinmektedir. Dünya’da yaklaşık 7 milyon hektar alanda, 58 milyon ton üretimiyle en çok yetiştirilen meyvelerden biri olan üzümün (FAOSTAT, 2013) işlenmesinden sonra, her hasat döneminde onlarca ton posa açığa çıkmaktadır. Sahip olduğu yağ asitleri, tokoller, proantosiyanidinler, steroller gibi zengin biyoaktif bileşenler üzüm posasını, günden güne önemi artan gıda, farmasotik ve kozmetik sektörleri için oldukça makul ve kazançlı bir hammadde haline getirmektedir (Demirtaş ve

ark., 2013; Barba ve ark., 2016). Literatürde antioksidan, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal özellikleri birçok kez bildirilen üzüm çekirdekleri (Oliveira ve ark., 2013; Sofi ve ark., 2016; Soto ve ark., 2015) üzüm posasının kuru ağırlık bazında %38-52’lik bir bölümünü oluşturmaktadır (Teixeira ve ark., 2014). Bu nedenle üzüm çekirdekleri ve ekstraktının değerlendirilmesi, atıkların geri dönüştürülmesi ve dolayısıyla ekonomik açıdan önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Barbieri ve ark., 2013). Yaklaşık olarak %7-20 civarında yağ içeren üzüm çekirdekleri, ağırlıklı olarak lifli yapı, proantosiyanidinler, proteinler, su ve iz miktarlarda şeker ve minerallerden oluşmaktadır (Demirtaş ve ark., 2013; Teixeira

Yayın Kuruluşuna Geliş Tarihi: 22.07.2016

(1) Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü – ADANA

ve ark., 2014, Rombaut ve ark., 2015). Bu önemli bileşikler son yıllarda üzüm çekirdek yağı üretimine ve araştırmalarına olan ilgiyi arttırmıştır. Üzüm üretimi için uygun ekolojik koşullara sahip ülkemizin (Semerci ve ark., 2015) artan üzüm üretim kapasitesiyle çekirdek yağı sektöründe söz sahibi ülkeler arasında yerini alması beklenmektedir. Sahip oldukları yağ miktarı, biyoaktif bileşenleri ve aroma profilleri elde edildikleri üzümün cinsine göre farklılıklar gösterebileceği için (Sabir ve ark., 2012; Fernandes ve ark., 2013) ülkemiz, sahip olduğu birçok farklı üzüm çeşidiyle üzüm çekirdeği yağı alanında gelişime açık bir ülkedir.

Yapılan çalışmalarda, üzümlerin olgunluk evresinde çekirdeklerinin farklı oranlarda yağ bulundurabilecekleri gibi hasat döneminden önceki evrelerde de farklı miktarlarda yağ oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Rubio ve ark., 2009). Yağ miktarındaki bu değişim olgunlaşma etkisinin yanı sıra, nem miktarı (Rubio ve ark., 2009), toprağın yapısı lipoksigenaz gibi enzimlerin aktiviteleri (Padolyan ve ark., 2010) ve mevsimsel koşullar gibi unsurlara da bağlıdır. Çekirdeğin içerisinde bulunan yağ miktarının olgunlaşma süresince nem miktarıyla ters orantılı olduğu belirtilmiştir (Rubio ve ark., 2009). Yağın kalitesinde önemli bir rol oynayan doymamış yağ asitleri, üzüm çekirdeği yağının oldukça yüksek bir kısmını (yaklaşık %90) oluşturmaktadır. Bu yağ önemli miktarda serbest yağ asitleri, linoleik asit (C18:2), oleik asit (C18:1), linolenik asit (C18:3), palmitoleik asit (C16:1), mono ve

digliseritleri içermektedir. Ayrıca, bileşiminin yaklaşık %10'unu da doymuş yağ asitleri olan palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitler oluşturur (Demirtaş ve ark., 2013; Rombaut ve ark., 2015). Üzüm çekirdeği yağının kalitesini belirleyen en önemli özellikleri; hafif meyvemsi lezzete ve turuncu kokuları veren monoterpenlere sahip olması, yüksek dumanlanma sıcaklığı (216,7°C), kolay sindirilebilirliği ve kızartma yağı olarak kullanıldığında viskozitesini koruyabilmesidir (Hanganu ve ark., 2012; Karaman ve ark., 2015).

Bu derlemede üzüm çekirdeği yağının sahip olduğu önemli biyoaktif bileşenleri ve üzümün olgunlaşma evreleri boyunca değişimleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

1. Yağ asitleri

Yağ asitleri, bir ucunda bir metil, diğer ucunda ise bir karboksilik grubu bulunan, doymuş veya doymamış hidrokarbon zincirleridir. *Vitis vinifera* ve *Vitis labrusca* familyalarındaki farklı cins üzümlerden elde edilmiş çekirdeklerin yağlarıyla yapılmış çalışmalarda, yağ bileşiminde çeşitli yağ asitlerinin bulunduğu ve yağ asidinin içerisinde en yüksek miktarda bulunanın linoleik asit (%68-%72) olduğu bildirilmiştir (Lutterodt ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2013). Bununla birlikte, linoleik asit miktarının üzümün her olgunlaşma evresinde diğer yağ asitlerine göre daha baskın olsa da farklı olgunlaşma evrelerinde farklı oranlarda bulunabileceği belirtilmiştir (Rubio ve ark., 2009).

Örneğin, Rubio ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada ilk ben düşme evresinde %72 ile en baskın yağ asiti linoleik asit olmuş, olgunlaşma sırasında miktarında azalmalar görülmüş ve hasat döneminde ise %68'e kadar düştüğü saptanmıştır. Bu azalmanın, lipoksigenaz enziminin linoleik asiti hidroperoksitlere dönüştürerek uçucu esterleri oluşturduğu reaksiyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha sonra bu hidroperoksitler, hidroperoksit liyaz (HPL) enzimiyle çimensi kokular veren hekzenal ve (Z)-3-hekzenallere dönüşürler (Deluc ve ark., 2009). Üzüm çekirdeği yağında yüksek oranlarda bulunan linoleik asit, yağa hoş giden, nötral bir tat kazandırmaktadır. Aynı zamanda yağın oksidatif direncine katkıda bulunurken, kardiyovasküler problemlere karşı sahip olduğu anti-kolesterol özellikleriyle ön plana çıktığı bildirilmiştir (Beveridge ve ark., 2005, Lachman ve ark., 2015). Linoleik asitten sonra yüksek miktarlarda bulunan yağ asitleri sırasıyla, oleik, palmitik ve stearik asitlerdir (Rubio ve ark., 2009). Önceki çalışmalarda, iz miktarlarda tespit edilmiş bazı yağ asitleri ise; linolenik, araşidik, gadoleik, miristik, palmitoleik, margarik, margaroleik, behenik, vakkenik ve kaprilik asitler olduğu bildirilmiştir (Lutterodt ve ark., 2011; Fernandes ve ark., 2013). Öte yandan araştırmacılar, üzümün cinsine bağlı olarak da, yağ asitleri çeşitlerinin ve miktarlarının farklılıklar gösterebileceğini vurgulamışlardır (Fernandes ve ark., 2013).

2. Tokoller

Üzüm çekirdekleri, içeriğinde kimyasal isimleri tokoller olarak geçen, genel isimleri E vitamini olarak adlandırılan tokoferoller ve tokotrienoller gibi yağın oksidasyonunu önleyici bazı doğal fenolik antioksidanları içerirler (Sabir ve ark., 2012). Literatürde üzüm çekirdeği yağında 240-410 mg/kg aralığında bulunduğu belirtilen tokoferoller (Crews ve ark., 2006), üzüm çekirdeklerinin dokularında homojen bir şekilde dağılmış halde bulunurlar (Lachman ve ark., 2013). Çekirdek yağında tokoferol tayini genellikle bir miktar çözgenle çözdürülen ekstraktın filtreleniş HPLC cihazına

enjeksiyonu ile yapılır (Sabir ve ark., 2012; Kostadinovic-Velickovska ve Mitrev, 2013; Lachman ve ark., 2013; Kreps ve ark., 2014; Fiori ve ark., 2014; Assumpção ve ark., 2016). Yağlı tohumlardan elde edilen farklı türde çekirdek yağlarında, bitki genotipine, iklim koşullarına, ürünün yetiştirme şartlarına, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) içeriğine, yağın işleme (rafınasyon vb.) ve saklama koşullarına bağlı olarak farklı miktarlarda tokoferol bulunduğu belirtilmiştir (Assumpção ve ark., 2016). Tokoferoller, yağların en önemli antioksidan kaynağı olmasının yanı sıra, bu bileşiklerin α , β , γ ve δ gibi farklı formlarda bulunmaları (Kreps ve ark., 2014), yağın antioksidan aktivitesindeki farklılıkların temel kaynağı olarak gösterilmektedir (Kostadinovic-Velickovska ve Mitrev, 2013; Assumpção ve ark., 2016). Bu formlar arasında insan vücudunda en aktif olarak bulunan E vitamininin α -tokoferol olduğu (Kreps ve ark., 2014), ancak en önemli antioksidan kaynağı olarak gösterilen tokoferollerin γ formunda bulunanları olduğu bildirilmiştir (Assumpção ve ark., 2016). Yağlardaki istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması ve raf ömrünün uzatılmasını amaçlayan rafınasyon işlemleri, ısıya ve ışığa duyarlı olan vitamların önemli bir kısmının kaybolmasına neden olurken, bazı tokoferollerin rafine edilmiş yağlarda dahi bulunabildikleri saptanmıştır (Kreps ve ark., 2014). Tokotrienoller ise, üzüm çekirdeğinde tokoferollere göre miktarsal olarak daha düşük seviyede bulunurlar. Ayrıca tokoferoller hücrelere yayılmış halde bulunurken, tokotrienoller genellikle endospermde bulunurlar. Üzümün olgunlaşması süresince tokoferol miktarında azalma gözlemlenirken, tokotrienol miktarı ise çekirdeğin olgunlaşmasıyla artmaktadır. Üzüm çekirdeği yağında, tokoferoller genelde α -formda bulunurken, tokotrienoller genellikle γ -formda bulunurlar (Horvath ve ark., 2006). Üzüm çekirdeklerinde bulunan tokollerin miktarları da yağ asitleri gibi üzümün cinsine göre farklılıklar göstermektedir (Sabir ve ark., 2012).

3. Fenol bileşikleri

Üzüm posasının önemli bir kısmını oluşturan üzüm çekirdekleri ve kabukları, fenol bileşiklerinin önemli kaynakları olarak gösterilmektedirler (Bail ve ark., 2008). Yağ eldesinden arta kalan küspede ekstrakte edilememiş bir miktar yağ ve bununla birlikte genellikle proantosiyanidinler gibi flavan-3-ollerden oluşan çok miktarda fenolik bileşikler yer alır (Yılmaz ve ark., 2011). Kırmızı üzüm çekirdeğinde bulunan polifenollerin %40,3'ü flavan-3-ollerden, %26,2'si fenolik asitlerden, %22,7'si antosiyaninlerden, %6,7'si flavonollerden ve %4,2'si hidrokisinasitlerden oluştuğu belirtilmiştir (Yılmaz, 2010). Üzümde monomerik, oligomerik ve polimerik olarak üç temel halde bulunan flavan-3-oller, meyvelerin kabuk ve çekirdeğinde yoğun olarak bulunduğu, fermentasyon sırasında şaraba geçtiği ve şarabın organoleptik özelliklerine olumlu bir katkı sağladığı bildirilmiştir. Asmanın çiçeklenme evresinde oluşmaya başlayan flavan-3-oller, üzümün renk dönme evrelerine kadar hızlı bir şekilde birikerek en yüksek miktarlarına ulaşmakta ve sonrasında olgunlaşma evresiyle birlikte miktarında azalma olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda üzüm çekirdeğinde kateşinin (monomerik flavan-3-ol) en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olduğunu, miktarının üzümün cinslerine göre 62,8 ile 206 µg/g arasında değiştiği ve epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin 3-O-gallatın bulunan diğer monomerik flavan-3-oller olduğu bildirilmiştir. Öte yandan gallik asitle birlikte, kafeik ve ferulik asit üzüm çekirdeği yağında bulunan önemli fenol asitleridir (Lutterodt ve ark., 2011). Flavan-3-ollerin oligomerik ve polimerik yapıda bulunanları olarak bilinen ve güçlü antioksidanlar olarak nitelendirilen proantosiyanidinlerin, antioksidatif etkisinin sulu ortamda C, E vitaminleri ve (+)- kateşine göre çok daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (Ariga, 2004). Yapılan çalışmalarda ham üzüm çekirdeği ekstraktının yaklaşık %38,5'lik önemli bir kısmını oluşturan

proantosiyanidinlerin çekirdekte buldukları konuma göre konsantrasyonlarının ve bileşimlerinin değiştiği bildirilmiştir (Cohen ve ark., 2012; Bautista-Ortín ve ark., 2013). Farklı polimerizasyon derecelerine sahip olan bu bileşikler, kırmızı şarabın önemli kalite parametreleri olarak bilinen burukluk, acılık ve renk dengesi gibi özelliklerin oluşmasına katkıda bulunurlar (Liu ve ark., 2010; Bautista-Ortín ve ark., 2013; Ou ve Gu, 2014; Vilela ve ark., 2016). Bu bileşiklerin polimerizasyon dereceleri arttıkça şaraba geçen buruk tat artarken, farklı boyutlarda dallanmanın şarabın acılığıyla doğrudan bağlantılı olmadığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2010). Çekirdeklerin küspelerinde, proantosiyanidin miktarı monomerik flavan-3-ollere göre çok daha yüksektir. Öte yandan, farklı üzümlerle yapılmış bir çalışmada, üzüm çekirdeğinde bulunan oligomer miktarının üzüm kabuğuna göre çok daha fazla olduğu belirtilmiştir (Mattivi ve ark., 2009). Proantosiyanidinler, gıda endüstrisinde, ürünlerin raf ömrünü uzatmada, özellikle lipitlerin peroksidasyonuna karşı kullanılmaktadırlar. Oksidasyon gerçekleşmesi bitkisel bir yağın kalitesini ve besin değerini düşürmekte, istenmeyen tat ve koku bileşiklerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle bitkisel yağın oksidasyona karşı dayanıklılığı oldukça önemli bir özelliktir (Malićanin ve ark., 2014). Bu önemli özelliklerinden dolayı, özellikle soğuk pres yöntemiyle yağ ekstraksiyonundan sonra arta kalan küspenin bu şekilde değerlendirilebiliyor olması hem araştırmacıların hem de endüstrinin ilgisini çekmektedir (Ariga, 2004; Lutterodt ve ark., 2011). Dünyada ilk kez Japonya'da gıda katkı maddesi olarak kabul edilen üzüm çekirdeği ekstraktı, bu ülkede yılda 100,000 kg civarında tüketilmektedir. Ayrıca proantosiyanidince zengin üzüm çekirdeği ekstraktının, bazı ülser, katarakt ve şeker hastalıklarına karşı koruyucu etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Ariga, 2004).

Üzüm çekirdeğinin yapısında bulunan proantosiyanidinlerin, üzümün çeşidine (Mattivi ve ark., 2009) ve olgunlaşma evrelerine göre değiştiği belirlenmiştir

(Kennedy ve ark., 2000). Üzümün farklı olgunluk evrelerinde proantosiyanidinlerin değişimini inceleyen çalışmalarda, üzümün olgunluk derecesi arttıkça çekirdeklerdeki proantosiyanidin seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Kennedy ve ark., 2000). Öte yandan, çekirdeklerin yağ ekstraksiyonu sırasında maruz kaldıkları sıcaklık 60 °C ve üzerine çıktığında, bu tür fenolik bileşiklerde önemli kayıplar olabileceği bildirilmiştir (Maier ve ark., 2008).

Proantosiyanidinler, üzümde ilk ben düşme evresinde (veraison) en yüksek miktarda bulunmaktadır. Bunun nedeni olarak bu evrede çekirdek tanenlerinin birikiminin aktif olarak devam etmesi gösterilmektedir (Castellari ve ark., 2012). Olgunlaşma sırasında ise proantosiyanidinlerin miktarında azalmalar görülmektedir. Bunun nedeni olarak, bu bileşiklerin oksidasyona uğramaları ve çekirdeğin tadına acılığı veren fenolik fonksiyonel grupların zamanla değişimi gösterilmektedir (Kennedy ve ark., 2000). Öte yandan, bağ yönetimi adı altında bitkilere uygulanan erken veya geç budama, yaprak budaması gibi bazı bağcılık uygulamalarının da bu değişimler üzerinde etkileri olduğu düşünülmektedir.

4. Fitosteroller

Steroid alkollerin bir grubu olan ve üzüm çekirdeği yağının anti-kolesterol özelliğine önemli bir katkı yapan fitosteroller, ham yağa uygulanan bazı rafinasyon işlemlerinin etkisiyle kısmen steradienlere dönüşmektedir (Matthäus, 2008). Bu bileşiklerin miktarı üzümün cinsine bağlı olarak 2580 ile 11250 mg/kg arasında değiştiği ve ortalama miktarının 5710 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Üzüm çekirdek yağında en yüksek miktarda bulunan fitosterolün ise β -sitosterol olduğu bildirilmiştir (Crews ve ark., 2006). Bunun yanı sıra stigmasterol, kampesterol, Δ -5-avenasterol ve Δ -7-sitosterol de üzüm çekirdek yağında bulunan diğer önemli steroller olarak bildirilmektedir (Beveridge ve ark., 2005; Rubio ve ark., 2009; Ruggiero ve

ark., 2013). Bu bileşiklerin olgunlaşma evreleri boyunca değişimlerinin izlendiği çalışmalarda, üzümün renk dönümü öncesi ve renk dönümü evrelerinde fitosterol miktarının çekirdek hücrelerinde arttığı gözlemlenmiştir (Ruggiero ve ark., 2013). Öte yandan, *Vitis coignetiae* ve *Vitis ficifolia* var. ganebu gibi yabancı üzüm türlerinden elde edilen çekirdek yağlarında yapılan bir çalışmada, en baskın fitosterolün, β -sitosterol olduğu, stigmasterol ve kampesterolün belirlenen diğer sterol bileşikler olduğu bildirilmiştir, ancak incelenen yabancı üzüm türleri için farklı olgunluk evrelerinin bu bileşikler üzerinde önemli değişimlere neden olmadığı saptanmıştır (Shiozaki ve Murakami, 2016). Ayrıca üzüm çekirdeği içeriğinde bulunan yüksek stigmasterol miktarının rahim kanserine karşı olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Seeram, 2008).

Sonuç

Şaraphane ve meyve suyu işletmelerinin atıklarından elde edilen üzüm çekirdek yağları, yağ asitleri, tokoller, proantosiyanidinler, flavan-3-oller ve fitosteroller gibi çeşitli biyoaktif maddelerce zengin olması nedeniyle, gıda, farmasötik ve kozmetik alanlarda üretim yapan sektörlerin ve araştırmacıların ilgisini çekmeyi başarmış ve bu nedenle son yıllarda bu konu üzerine birçok çalışmalar yapılmıştır. Üzüm çekirdeğinde bulunan bu biyoaktif bileşenler, antiülser, antikanserijen, antiviral, antimutajenik, antikolesterol özellikleriyle insan sağlığı açısından önemli bir yere sahiptir. Sıcaklık ve basınç gibi parametrelere hassas olan biyoaktif bileşenlerin kaybına sebep olmamak için, günümüz teknolojisinin ilerlemesiyle daha hassas yöntemler geliştirilmesi ve bu yeni yöntemlerin yaygınlaşması beklenmektedir. Doğal kaynakların tükenmeye başlamasıyla hem ekonomik hem de çevresel açıdan her atığın değerlendirilmeye çalışıldığı günümüzde, giderek büyüyen geri dönüşüm zincirinde yerini almakta olan üzüm çekirdekleri, gün geçtikçe ülkemiz için büyük önem kazanmaktadır.

Kaynaklar

- Ariga, T., (2004) The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors* 21: 197–201.
- Assumpção, C. F., Nunes, I. L., Mendonça, T. A., Bortolin, R. C., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, dO. A., (2016) Bioactive Compounds and Stability of Organic and Conventional *Vitis labrusca* Grape Seed Oils. *J Am Oil Chem Soc* 93(1): 115–124.
- Bail, S., Stuebiger, F., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G., (2008) Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem* 108: 1122–1132.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant’ana, A. S., (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products. *Trends Food Sci Tech* 49: 96–109.
- Barbieri, L., Andreola, F., Lancellotti, I., Taurino, R., (2013) Management of agricultural biomass wastes: Preliminary study on characterization and valorisation in clay matrix bricks. *Waste Manage* 33: 2307–2315.
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., Gómez-Plaza, E., (2013) Effect of wine maceration enzymes on the extraction of grape seed proanthocyanidins. *Food Bioprocess Technol* 6(8): 2207–2212.
- Beveridge, J. H. T., Girard, B., Kopp, T., Drover, J. C. G., (2005) Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *J Agric Food Chem* 53: 1799–1804.
- Castellarin, S. D., Bavaresco, L., Falginella, L., Gonçalves, M. I. V. Z., Di Caspero, G., (2012) “Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants.” in Geros, H., Chaves, M. M., Delrot, S., *Bentham Science Publishers* 89–110 [http://hdl.handle.net/10807/61282].
- Cohen, S. D., Tarara, J. M., Gambetta, G. A., Matthews, M. A., Kennedy, J. A., (2012) Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes. *J exp bot* 63(7): 2655–2665.
- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W., (2006) *J Agr Food Chem* 54: 6261–6265.
- Deluc, G. L., Quilici, D. R., Decendit, A., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Schlauch, K. A., Mérillon, J-M., Cushman, J. C., Cramer, G. R., (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10: 212.
- Demirtaş, İ., Pelvan, E., Özdemir, İ. S., Alasalvar, C., Ertaş, E., (2013) Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *Eur J Lipid Sci Tech* 115: 641–647.
- FAO 2013. Year Production, Statistics, FAOSTAT, Grape Production. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> Erişim tarihi: 5 Mayıs 2015.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., Ramalhosa, E., (2013) Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Res Int* 50: 161–166.
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Harsha, P. S. C. S., Mohamed, H. B., Guella, G., (2014) Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *J Supercrit Fluid* 94: 71–80.
- Hanganu, A., Todaşcă, M-C., Chira, N-A., Maganu, M., Roşca, S., (2012) The compositional characterisation of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chem* 134: 2453–2458.

- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Monica, H., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N., (2006) Accumulation of tocopherols and tocotrienols during seed development of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Albert Lavallée). *Plant Physiol Bioch* 44(11): 724–731.
- Karaman, S., Karasu, S., Tornuk, F., Toker, O. S., Geçgel, Ü., Sağdıç, O., Özcan, N., Gül, O., (2015) Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: Physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *J Agric Food Chem* 63: 2305–2513.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., Waterhouse, A. L., (2000) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55: 77–85.
- Kostadinovic-Velickovska, S., Mitrev, S., (2013) Characterization of Fatty Acid Profile, Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Cold Pressed and Refined Edible Oils From Macedonia. *J Food Chem Nutr* 01: 16–21.
- Kreps, F., Vrbíková, L., Schmidt, Š., (2014). Influence of industrial physical refining on tocopherol, chlorophyll and beta-carotene content in sunflower and rapeseed oil. *Eur J Lipid Sci Tech* 116: 1572–1582.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K., Horníčková, S., Pivec, V., Skala, O., Dědina, M., Příbyl, J., (2013) Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Ind Crop Prod* 49: 445–453.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Střalková, R., Vollmannová, A., Bojňanská, T., Dědina, M., (2015) Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *Food Sci Technol-LEB* 63: 620–625.
- Liu, X. Y., Pan, Q. H., Yan, G. L., He, J. J., Duan, C. Q., (2010) Changes of Flavan-3-ols with Different Degrees of Polymerization in Seeds of ‘Shiraz’, ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Marselan’ Grapes after Veraison. *Molecules* 15: 7763–7774.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., Yu, L., (2011) Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chem* 128: 391–399.
- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., Carle, R., (2008). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem* 112: 551–559.
- Malićanin, M., Rac, V., Antić, V., Antić, M., Palade, L. M., Kefalas, P., Rakić, V., (2014) Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *J Am Oil Chem Soc* 91(6): 989–999.
- Matthäus, B., (2008) Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight?. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 645–660.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., Trainotti, D., (2009) Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust J Grape Wine Res* 15: 27–35.
- Oliveira, D. A., Salvador, A. A., Smânia, A., Smânia, E. F., Maraschin, M., Ferreira, S. R., (2013) Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J Biotechnol* 164(3): 423–432.
- Ou, K., Gu, L., (2014) Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *J Funct Foods* 7: 43–53.
- Podolyan, A., White, J., Jordan, B., Winefield, C., (2010) Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis*

- vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Funct Plant Biol* 37: 767–784.
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Castello, J., Van Hecke, E., Lanoisellè, J.-L., (2015) Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grapeseed cold screw pressing. *Ind Crop Prod* 63: 26–33.
- Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Alvarruiz, A., Fernández, E., Pardo, J. E., (2009) Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *J Agric Food Chem* 57: 2812–2815.
- Ruggiero, A., Vitalini, S., Burlini, N., Bernasconi, S., Iriti, M., (2013) Phytosterols in grapes and wine, and effects of agrochemicals on their levels. *Food Chem* 141: 3473–3479.
- Sabir, A., Ünver, A., Kara, Z., (2012) The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agr* 92: 1982–1987.
- Seeram, N. P., (2008) Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *J Agric Food Chem* 56: 630–635.
- Semerci, A., Kızıltuğ, T., Çelik, A. D., Kiracı, M. A., (2015) Türkiye bağcılığının genel durumu. *MKU Ziraat Fak Derg* 20 (2): 45–51.
- Shiozaki, S., Murakami, K. (2016) Lipids in the seeds of wild grapes native to Japan: *Vitis coignetiae* and *Vitis ficifolia* var. *ganebu*. *Sci Hortic-Amsterdam*, 201: 124–129.
- Sofi, F. R., Raju, C. V., Lakshmisha, I. P., Singh, R. R., (2016) Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during ice storage. *J Food Sci Technol* 53(1), 104–117.
- Soto, M. L., Falqué, E., Domínguez, H., (2015) Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* 2(3), 259–276.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C., (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters. *Int J Mol Sci* 15: 15638–15678.
- Vilela, A., Jordão, A., Cosme, F., Desk, S., (2016) Wine phenolics: Looking for a smooth mouthfeel. *SDRP J Food Sci Tech* 1(1).
- Yılmaz, E. E., Özvural, E. B., Vural, H., (2011) Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluid* 55: 924–928.
- Yılmaz, İ., (2010) Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 17(2): 143–153.



Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

Özkan GÜĞERÇİN⁽¹⁾

A. Nafi BAYTORUN⁽¹⁾

Özet

Bu çalışma, ülkemizdeki kırsal konutların inşasında etkili olan faktörler ile yeni konut inşasında karşılaşılan sorunların saptanmasına yöneliktir. Ülke nüfusunun önemli bir bölümü (%20) kırsal alanlarda yaşamakta ve gerek konfor, gerekse afet güvenliği açısından yetersiz konutlarda yaşamını sürdürmektedir. Kırsal alanlarda yeni, güvenli ve çağdaş konutların inşası ise ekonomik, sosyal, kültürel ve yasal nedenlerle istenilen düzeylere ulaşmamaktadır. Oysa kırsalda refah düzeyinin artırılması, göçü önlemnin yanında, tarımsal üretimde artışı da beraberinde getirecektir. Dolayısıyla kırsal alanlarda yeni konutların inşasının özendirilmesi önem kazanmaktadır. Bu amaçla kredi, proje ve teknik destek, harçlardan muafiyet ve özellikle yerel malzemelerin kullanımı ile hane halkının işgücünden yararlanılmasını sağlayacak malzemelerin üretimine ve kullanımına önem verilmeli, yapı projelerinde Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik ile Yığma Binaları İçin Depreme Dayanıklı Tasarım Kuralları'da dikkate alınarak, kırsal ahali tarafından uygulanabilecek projeler üretilerek, halka sunulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Konut, Kırsal konut, Kırsal nüfus

Housing in Rural Settlements and Construction of New Housing

Abstract

This study aims to determine the drivers of housing in rural settings and the problems associated with the issue. About 20 percent of population in Turkey lives in inadequate circumstances of comfort and disaster safety, in rural settings. But in rural setting, safe and modern new housing is not always available due to economic, social, cultural and legal issues. Whenas, the enhancing welfare in rural settings not only prevents migration but also paves the way for agricultural production. From this point of view, encouragement of new housing in rural settings gains importance. In this sense; credit, project and technical supports, exemption from fees and particularly the use of local materials are crucial to make a positive effect on housing in rural settings. The housing projects should comply with "Regulations For The Structures To Be Built in Disaster Areas" and projects to be produced for the rural community.

Key words: Housing, Rural dwelling, Rural population,

Giriş

İnsanların temel gereksinimlerinden birisi de barınma ihtiyacıdır. İnsanlık barınma ihtiyacını karşılamak amacıyla ilk dönemlerde doğadaki mevcut mekânlardan yararlanmış, zamanla geliştirilen barınak kültürü bu gün kullandığımız çok katlı yapılara kadar ulaşmıştır. Konut olarak tanımlanan yapılar insanların huzur buldukları, aile bireylerinin birlikte güven içinde oldukları mekânlardır. Konutlar zamana bağlı olarak, teknolojik, ekonomik, sosyal ve kültürel gelişmeler doğrultusunda farklılaşmak yanında; kültürel yapıya, yörenin iklim koşullarına, coğrafi ve

topografik durumuna, yörede bulunan yapı malzemelerine, konutu kullananların sosyal statülerine ve dâhil oldukları meslek gruplarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. İnsanlığın gelişmesine paralel olarak konuttaki mekânların sayısı artarken, boyutları da değişmiştir. Fiziki olarak boyut ve mekân sayılarında meydana gelen artışla birlikte, özellikle kırsal yerleşimlerde bulunan konut yapılarda kullanılan yerel malzemelerin (taş, ahşap, kerpiç) yerini beton, betonarme, briket ve tuğla alırken, yapıların inşa tekniklerinde de önemli değişiklik gözlenmiştir. Kuşkusuz kırsal yerleşimde yeni malzeme ve inşa teknikleriyle

Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

üretilen yapıların büyük çoğunluğu, geleneksel yöntemlerle inşa edilmiş olanlara oranla daha güvenli hale gelmiş, ancak buna paralel olarak yerel malzeme kullanımını azalmış ve yerel mimari kullanım dışı kalmıştır. Bunun yansımaları ise, konut maliyetlerinde önemli ölçüde artmış olarak ortaya çıkmıştır. Sonuçta kırsal alanlarda (köy, mezra, kom, vd.) ikamet eden ve büyük çoğunlukla tarımla uğraşan dar gelirli birçok aile, özellikle ekonomik nedenlerle, yeni yapı malzemelerine ve yapım yöntemlerine ulaşamadığından, fen ve sağlık açısından yetersiz ve günün koşullarını karşılamaktan uzak ve güvensiz konutlarda yaşamını sürdürmek zorunda kalmıştır. Oysa ülkede artan refahın konutlar bağlamında da kentlerle sınırlı kalmaması ve ülke geneline yayılması hedeflenmelidir.

Özellikle uzun yıllardır görmezlikten gelinen yasal düzenlemelerin son yıllarda daha ziyade Büyükşehir Belediyelerince zorlanması ve bu bağlamda denetimlerin artırılması da kırsal konutların maliyetini artırıcı yönde etki yaparak, kırsal konut inşasını zora sokmuştur.

Hal bu ki ülke topraklarının %95'i; ülke nüfusunun %98'i deprem kuşağı içerisinde yer almaktadır. Bu nedenle ülkemizde afetlerin yapılar üzerindeki yıkıcı etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yıllardır sürdürülmekte, bir yandan yeni yasal düzenlemeler yapılırken, diğer taraftan denetimler sıkılaştırılmakta, hatta son yıllarda gündeme gelen Kentsel Dönüşümle depreme dayanıklı bina üretiminin gerçekleştirilmesine çalışılmaktadır. Ancak nüfusun yaklaşık %20'sinin yaşadığı kırsalda bu tür çalışmalar pek göze çarpmamaktadır.

Aslında afetlerin sonuçları açısından kırsal alanlar daha büyük risk altındadır. Bu nedenle güvenli kırsal konutların inşası kaçınılmazdır. İnşa edilecek konutlarda maliyetin düşük tutulabilmesi yanında, kültürel değerlerin korunması açısından da yerel malzemelerden yararlanılması önem kazanmaktadır. Ayrıca planlama sürecinde konut sahiplerinin yaşam biçimleri, kültürleri, örf ve adetleri ile ihtiyaçları dikkate alınmalıdır. Unutulmamalıdır ki kırsal konut birçok yönü ile kentsel konuttan farklıdır.

Burada sözü edilen konutlar, kırsalda sürekli olarak oturan ve tarımsal faaliyetlerde bulunanların kullandıkları konutlardır. Köyden kente göç eden ve yazları köyüne gelerek, doğa ile bütünleşmek için veya tatil amaçlı olarak kırsalda oturanların konutları değerlendirme dışıdır. Kuşkusuz tarımsal faaliyette bulunanlarla, çeşitli nedenlerle zamanın bir bölümü kırsalda geçirenlerin konutlarından beklentileri farklıdır. Bu nedenle sözü edilen iki gruba ait konutlardaki mekânlarda farklılaşmaktadır.

Türkiye'de Nüfus Ve Kırsal Nüfus

TÜİK (2015) Yılı nüfus sayımı sonuçlarına göre 78 731 053 olan ülke nüfusunun 5 001 952'si Büyükşehir Belediyeleri dışında kalan illere bağlı köylerde yaşamaktadır. Ülkemizde hane sayısı 19 481 678 ve hane başına düşen nüfus ise 3.8 kişidir. Kırsal kesimde hane başına düşen nüfusun sayısı hakkında veriler bulunmamasına karşın, kırsal yerleşmelerde hane başına nüfusun ülke ortalamasının üstünde olduğu düşünüldüğünde (hane başına 5 kişi varsayımı ile), söz konusu kırsal nüfusun barınmakta olduğu konut sayısının $(5\ 001\ 952/5) = 1\ 000\ 390$ olduğu söylenebilir. Büyükşehir dışında kalan 51 ilin toplam nüfusu 17 778 965'dir. Bu yerleşim yerlerinin kırsal kesimde yaşayan nüfusun, bu illerin (51) toplam nüfusa oranı $(5\ 001\ 952/17\ 778\ 965)$ ise, %28.1'dir. 30 Büyükşehir Belediyesi sınırları içinde yaşayan nüfusun toplamı ise $(78\ 731\ 053 - 17\ 778\ 965) = 60\ 962\ 088$ kişidir. Büyükşehir Belediyeleri içinde yaşayanların %18'nin kırsal alanda yaşadığı varsayımından hareket edildiğinde, Büyükşehir Belediyesi sınırları içindeki köylerde (günümüzde mahalle olarak tanımlanmaktadır) yaşayanların sayısının $(60\ 962\ 088 * 0.18) = 10\ 973\ 175$ olduğu görülmektedir. Belirtilen yerleşim yerlerinde bulunan her konutta 5 kişinin yaşadığı dikkate alınırsa söz konusu nüfusu barındıracak konut sayısının yaklaşık $(10\ 973\ 175/5) = 2\ 194\ 635$ olduğu görülmektedir. Özetle ülkemizde toplam $(10\ 982\ 217 + 5\ 001\ 952) = 15\ 984\ 169$ kişi için $(2\ 194\ 635 + 1\ 000\ 390) = 3\ 195\ 025$ kırsal konuttan söz edilebilir.

Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

TÜİK (2013) verilerine göre, ülke nüfusunun yalnız %21.8'i yaşı 0-10 arasında olan konutlarda oturmaktadır. Bu durum elbette kırsal alanlar için de geçerlidir. O halde kırsal alanlarda da çok sayıda yaşlı konuttan söz edilebilir. Bu konutlardan bir bölümü, geleneksel malzemelerle ve yerel ustalarca yapılmış ve köylerde halen oturanlarca kullanılmaktadır. Ancak değişen mekân talepleri ve mekân ilişkileri, inşa teknolojisi ve artan maliyetler, bu yapıların onararak, güvenli hale getirilmesine engel teşkil ederken, özellikle yığma yapı tekniğinde inşa edilmiş yapılarda güvenlik sağlanamamaktadır. Kaldı ki ülke nüfusunun önemli bir bölümünü barındırmakla kalmayan, üretim ve istihdam açısından da önemi yadsınamayan kırsal alanlardaki konutların güvenlik, sağlık ve konfor açısından iyileştirilmelerinde sayısız fayda vardır.

Konut ve Kırsal Konut:

1. Konut:

Konut içinde yaşanan, oturlan, dinlenen, dış faktörlere karşı korunulan ve barınılan mekân olarak tanımlanabilir. Tarihsel olarak öncelikli işlevi güvenlik olan konutun bu işlevi zamanla değişmiş, güvenlik yanında, sağlık ve konfor ihtiyacına da cevap vermek, yani rahat yaşam koşullarını da sağlamak olarak genişlemiştir (Olgun, 2011).

Yerleşmeler kırsal ve kentsel yerleşmeler olarak iki grupta ele alındığı gibi, konutlar da kırsal ve kentsel konutlar olarak sınıflandırılabilir. Çünkü özellikleri yönünden köydeki yaşam kentlerden daima farklı olmuştur. Bu durum konutlarda mekânların sayı ve boyutları ile işlevlerine de etki etmektedir.

Aslında tüm konutlar mahal olarak oturma, yatak ve servis gruplarından oluşur. Planlamada öncelikle ihtiyaçlar göz önünde tutulmak kaydı ile inşa edilen konutun aşağıda sıralanan üç temel özelliğe de sahip olması istenir. Bunlar: Konutun kullanışlı olması ve sağlık kurallarına uygun olması, ekonomik olması ve emniyetli olmasıdır. Bu koşullar ancak mahallerin iyi bir şekilde gruplandırılması, yönlerin ve iklim koşullarının dikkate alınması, para dolaşımı alanlarının, kapı

ve pencere ölçü ve açılış yönlerinin dikkate alınması ve yapıda ölü alan bırakılmaması ile sağlanabilmektedir (Ergen, 1986). Bu bağlamda konutun kullanıcının her türlü ihtiyaçlarını karşılayacak biçimde ve yörede mevcut her türlü olanağın kullanımına olanak sağlayacak şekilde planlanması, projelenmesi ve inşası gereklidir. Burada birçok faktör söz konusu olmakla birlikte, özellikle konutlarda mekân, mekân ilişkileri ve mekânların yönlendirilmesi önem kazanmaktadır. Kırsal konutlar planlanırken, özellikle kentsel konutlarda bulunmayan buna karşın tarımsal faaliyetlerin gerektirdiği mekân ve eklentilerin dikkate alınması gerekir.

2. Kırsal Konut

Kır yerleşmeleri tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin birlikte veya ayrı ayrı yapıldığı sanayi ve ticaret faaliyetlerinin gelişmediği, nüfus yoğunluğunun az olduğu yerleşmeler olarak tanımlanabilir (Karakuyu, 2008). Diğer bir ifade ile kırsal alan; genel anlamda şehrin dışında kalan bütün yerleşim alanlarını içine alan geniş bir mekânı ifade eder. Kırsal konut ise, söz konusu yerleşim alanları içerisinde yaşayanların kullandıkları konutları tanımlar. Kırsal konutlar ve kırsal yerleşmeler, coğrafi konumları, biçimleri, yapı karakterleri, dış mekân kullanımları ile özgündürler. Aynı şekilde her köy faaliyet alanına göre farklıdır ve farklı mekânsal özellikler sunar. (Eminağaoğlu, 2004).

Kırsal alandaki konutlar, işletme özellikleri, yaşam biçimi ve ekonomik özellikleri ile kentteki konuttan bazı farklılıklar gösterir. Çünkü kırsal konut, çiftçi ailesinin yaşadığı ve dinlendiği yer olmak yanında, tarımsal işletmenin merkezi konumundadır. Çiftçi ailesi zamanının önemli bir bölümünü burada geçirir. Tarımsal üretimin gereği olarak kırsal konutlarda; çalışma yeri, mutfak, yiyecek hazırlama, koruma gibi mekânlar ile banyo ve tuvaletin gerek dış ortam, gerekse iç mekân bağlantısı önem kazanmaktadır (Olgun, 2011). Öte yandan köy ve kent sosyal ve ekonomik yapısı ile farklı bir düzene sahiptir. Köy, içerdiği doğal bütünlük ve zenginlikleri ile ekolojik bir denge unsurudur. İklim bölgelerine,

Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

topoğrafik yapıya, bitki örtüsüne, arazi mülkiyetine, devlet müdahalesine, sosyoekonomik yapıya, doğal afetlere, ulaşım imkânlarına, tarımın yapısına göre özellik gösterirler. Kırsal yerleşmelerde konut ve diğer yapılar buldukları bölge koşullarına göre biçimlenmekte ve karakter kazanmaktadır. Yapılar yörede yaygın bulunan yapı malzemeleri (ahşap-taş-kerpiç) kullanılmakta ve çoğunlukla insan ölçeği baz alınmaktadır. Açık ve kapalı alanlar bölgenin iklim koşullarına ve faaliyet alanlarına göre biçimlenmektedir (Eminağaoğlu, 2004).

Yukarıda sıralanan faktörlerin konut planlamasında dikkate alınması gerekir. Konutlar kırsal ya da kentsel olsun bir takım eklentilere ihtiyaç duyarlar. Bu bağlamda özellikle kırsal konutlar, konutu kullananın faaliyet alanına bağlı olarak, barınak, yem deposu, ürün deposu, silo gibi eklentilere sahiptirler. Bu nedenle tarımsal işletmelerde konut yerinin seçiminde, servis binaları ile ilişkiler, manzara, arazinin eğimi, güneş ve rüzgârdan yararlanma gibi faktörler öne çıkmaktadır (Olgun, 2011).

Kırsal konutların bir özelliği de çoğunlukla teknik eleman katkısı olmadan inşa edilmiş olmalarıdır. Bu yapılar, yörenin koşullarına bağlı olarak taş, kerpiç veya ahşap malzemelerle inşa edilmektedir. Örneğin, Alaşehir’de ova kesimindeki konutlar tek katlı bahçeli ve %75’i kerpiçten yapılmıştır. Yağışın az olduğu yerlerde (500 mm.’den az) düz damlar yaygındır. Çift katlı konutlar arazi kıtlığı nedeniyle genelde eğimli arazilerde inşa edilmektedir (Karakuyu, 2008).

Kırsal yörelerdeki hayvan barınakları ise ilkel yapıları nedeniyle, düşük şiddetteki depremlerde dahi göçmekte ve köylünün gelir kaynağı ya da serveti olan hayvanları telef olduğundan, göç olayı başlamaktadır. Her zaman olduğu gibi afetler sırasında da siyasal söylemler dışında destek bulamayan köylü kente, gecekonduya yönelmekte, ancak şehrin olanaklarından yeteri kadar yararlanamayan bu insanların ruh sağlıkları da bozulmaktadır. Oysa gelişen ve değişen ülke koşullarına bağlı olarak, kırsal alanda ki yaşam standardının yükseltilmesi ve fiziksel yapıların geliştirilmesi

ihtiyacı ortadadır. Ancak bu ihtiyaç kentsel alanlardaki konut tasarımının kırsal alanlara taşınması ile yani kırsal alanda kentsel yapıların inşası ile sağlanamaz (Çevik, 1998).

Kırsalda Konut İnşası

Yaklaşık 15 milyonun üzerinde insanın yaşadığı kırsal alanlarda konut inşası çeşitli nedenlerle yürümektedir. Yani kırsalda yaşayan insanımız çağdaş ve güvenli konuta ulaşmamaktadır. Bunun nedenlerini şöyle sıralayabiliriz.

1. Ekonomik nedenler

Dünyada şehirleşme tarım sektörünün etkinliğinin azalması dolayısıyla, tarımsal üretimden, tarım dışı üretime geçişi simgelemesine karşın, ülkemizde tarım dışı üretim ve istihdam yaratılmadığından, çağdaş anlamda bir şehirleşme söz konusu olamamıştır (Ergen, 1979). Bizde şehirleşmenin nedeni; tarımsal üretimde girdilerin ve üretim maliyetlerinin artması, ürün fiyatlarının düşük olması, toprağın bölünmesi ve tarımda mekanizasyon uygulanması gibi nedenlerle gelirin azalması ve sonuçta birçok ailenin geçim sıkıntısı çekmesidir. Bu aileler ekonomik nedenlerle kırsalda yeni konut inşa edemezken; kentin olanaklarından yararlanmak isteyen genç kuşak ekonomik olarak yeterli olsa dahi, maliyetleri de dikkate alarak, kırsalda konut inşa etmek yerine, kentte konut edinmeyi öncelikli hedef haline getirmiştir. Böylece bir yandan gelir elde etmek, öte yandan kentte göç için altyapı hazırlamak gibi düşüncelerini hayata geçirme fırsatı yakalamışlardır. Öyle ki, Çevre ve Şehircilik Bakanlığınca yayımlanan “2016 Yılı Yapı Yaklaşık Maliyetleri” verilerine göre en düşük konut birim fiyatı 630 TL./m²’dir. Buna göre 100 m² alana sahip bir konutun yaklaşık maliyeti 63 000 TL.’dir. Bu fiyata Katma Değer Vergisi dahil değildir. Konut maliyetine ek olarak proje giderleri, TUS, yapı ruhsatı ve yapı kullanma izni ve yatırılması gereken harçlar gibi giderlerde eklendiğinde (Yaklaşık 7 000 TL.) konut maliyetleri ekonomik boyutu ile köylünün bütçesini aşmaktadır. Önemli bir sorun da kırsal kesimdeki yapı birim maliyetlerinin kentlerden

daha yüksek olmasıdır. Örneğin kırsalda nakliye ve işçilik giderleri her zaman kentlerden daha pahalıdır. Büyük çoğunluğu düşük gelire sahip olan kırsal bölge insanının, bu bedeli ödemesi oldukça güçtür.

2. Sosyal ve Kültürel Nedenler

Şehre göçler nedeniyle kentlerde az katlı yapılar ortadan kalkarken; sosyal, ekonomik, kültürel ve geleneklere bağlılık nedeniyle, kırsal kesimde halen az katlı ve yığma binalar revaçtadır. Hatta bu yapılar bazı kullanıcıları tarafından korunmakta ve kullanılmaktadır. Ancak genç kuşağın köy dışında yaşamak istemesi, köyün olanaklarını yetersiz bulması gibi faktörler göçü zorlamakta (Şenol ve Er Akan, 2011) ve göçün ilk yıllarında bir süre yaz tatilleri için köyüne gelen yeni kentliler, zamanla köyünden tamamen uzaklaşmakta ve atalarından kalma yapıların yıkılmasına göz yumar hale gelmektedirler. Buna karşın, yaşlı ve özgün kullanıcılar; ailelerine, anılarına, mazilerine dair izleri görebildikleri içindir ki geleneksel konutları koruma duygusu içindedirler. Diğer bir söylemle evlerini ve çevrelerini korumaya dair yüksek bir duyarlılığı sahiptirler (Dalkılıç, 2008). Ancak ekonomik gücü bulunmayan yaşlı kuşak en fazla konutunu onarma yoluna gitmekte ve ölümünden sonra konutun yenilenmesi veya onarımı söz konusu olmamaktadır. Ailenin reisi konumuna gelen genç kuşak kırsala yatırım yapmaktan kaçınmaktadır. Konutu kullanılmaz durumda olanlardan bir bölümü her an göçü planladığından, eski konutunu kullanmaya devam etmektedir. Küçük onarımları ise geleneksel malzeme ve yöntemlerle yapılabilmektedirler.

Yeni konutların yapımı konusunda bir sorun da kuşak çatışmalarının yaşanmasıdır. Köylerde kalan yaşlı kuşaklar, yeni yapı malzemelerine ve yapım tekniğine karşı çıkarken, genç kuşak ya bu talebe karşı çıkmakta ya da bir an önce köyünü terk ederek, kente göçmek sevdiğinden, kırsal konuta yatırım yapmaktan imtina etmektedir.

Konut yapımını engelleyen diğer bir sorun ise, yeni konutların yapımında yaşanan

yasal düzenlemelerdir. Bu durum eski konutların onarımını da zorlamaktadır.

3. Konut Yapımı Konusundaki Yasal Düzenlemeler

AB'ye uyum yasaları çerçevesinde ülkemizin kırsal alanlarında yaşayan nüfusun oranının düşürülmesi planlanmıştır. Bu amaçla göç özendirilmiş, ancak kente göçecekler için yerleşim ve istihdam alanları ne yazık ki yaratılamamıştır. Göçün özendirilmesi tarımsal üretimde azalmaya yol açarken, Türkiye bazı tarım ürünlerini ithal etmek durumunda kalmıştır. Ayrıca Büyükşehir Belediyeleri Kanununda yapılan değişiklikler sonucunda, söz konusu belediyelere kırsal konutların inşasında denetimci rolü verilmiş, yeni inşa edilecek konutlar için proje yapılması ve teknik uygulama sorumlusu, inşaat ve iskân ruhsatı gibi konularda yaptırımlar getirilmiştir. Söz konusu yaptırımlar da konut yapımını engeller nitelikte etki yapmıştır. Bazı belediyeler ve valilikler tarafından hazırlanarak, bedelsiz olarak isteklilere dağıtılan projeler ise, daha çok yeni yapı malzemeleri (beton, betonarme, tuğla, briket) ile inşa edilebilecek özellikte yapılar için söz konusu olduklarından ve yapı maliyetini artırdığından, uygulanamamaktadır.

2014 Yılında yapılan yasal düzenleme ile Büyükşehir Belediyesi Sınırları içerisinde bulunan köylerin mahalle statüsüne alınması sonucunda, kırsal nüfus rakamsal olarak %9'lara düşmüş gibi gözükmektedir. Aslında bu durum gerçeği yansıtmaktan uzaktır. Hukuki statüde durum böyle olsa dahi, üretim alanı ve biçimi, yaşam tarzı, konut ve konutları oluşturan mekânlar ile kırsal nüfus hala %20'ler seviyesindedir. Aslında ülke nüfusunun azımsanmayacak bir bölümünün (%20) yaşamakta olduğu kasaba ve köylerin imar açısından daha geliştirilmesi, yerleşme ve yapılaşma anlamında imar planlarının uygulanması, kırsal alanlarda yaşayanların güvenli, sağlıklı ve çağdaş konutlara kavuşması anlamına gelir ki, bunun sağlanmasında çok yönlü yararlar vardır.

İmar Kanunu

Yerleşme yerlerindeki yapıların plan, sağlıklı ve çevre şartlarına uygun teşekkülünü sağlamak amacıyla çıkarılan 3194 sayılı İmar Kanun ve ilgili yönetmeliklerin ve yapılaşmaya yönelik diğer kanunların ve eklerinin bir bölümü kırsal alanlar için de geçerlidir. Yani köy yerleşkeleri içinde yapılacak yapılarda bazı yasal düzenlemelere uyulması gerekmektedir. Bununla birlikte, söz konusu düzenlemeler yıllardır çeşitli nedenlerle uygulanamamış, dolayısıyla bu yasal düzenlemelerden istenilen ve beklenen sonuçlar da alınamamıştır.

3194 Sayılı İmar Kanunu kırsal kesim için ele alındığında: son yıllarda köylerde ve özellikle Büyükşehir Yasası kapsamındaki mahalle olan köylerde, konut yapabilmek için yasal düzenlemelere harfiyen uyulması istenmektedir. Ancak bunun getirdiği maddi külfetin ve zaman kaybının konut yapımını engeller nitelikte olduğu unutulmaktadır. Tarihsel olarak mevcut olan imar kanunu ve imar düzenlemelerine yönelik yaptırımlar, kentlerde dahi yeterince uygulanmazken, kırsal alanlardaki yapılaşmanın son yıllarda titizlikle takip edilmeye başlanması ve konut yapımı için proje, yapı ruhsatı ve yapı kullanma izinlerinin kontrollerinin aralıksız sürdürülmesi mali ve zaman kaybına neden olmaktadır. Diğer bir ifade ile Teknik Uygulama Sorumlusu (TUS), projenin aplikasyonu gibi zorlamalara duyulan tepki ve maliyetlerdeki artış konut yapımını engellemektedir. Kuşkusuz gerek sağlıklı yerleşimlerin oluşturulmasında, gerekse çağdaş ve daha güvenli yapıların inşası anlamında yapılan uygulamalar gerekli ve önemlidir. Ancak bu durum köylerde yaşayan dar gelirli insanları konut edinmekten alıkoymaktadır. Dolayısıyla kırsalda yeni, güvenli ve düşük maliyetli konutların inşası önem kazanmaktadır.

Yapı Ruhsatı:

3194 sayılı Yasa çerçevesinde yapılan imar düzenlemeleri, planı bulunan ve bulunmayan yerleşmeler için ayrı ayrı hükümler getirmek yanında; kişilerin ikamet etme durumları ve yapının amacı gibi konularda da farklı yaptırımlar getirmiştir. Burada konu

edilen imar planı bulunmayan yerlerde yapı ruhsatıdır.

Kırsalda ruhsat işleri önceleri Bayındırlık İl Müdürlükleri, ardından İl Özel İdareleri kanalı ile yürütülürken, Büyükşehirlerde İl Özel İdarelerinin kapatılması ile ruhsat işleri Büyükşehir Belediyelerince (6360 Sayılı Yasa); Büyükşehir dışındaki yerleşmelerde ise Valiliklerce yürütülmeye başlanmıştır.

Aslında kırsal konutların inşasında 2 farklı durum ile karşılaşmaktadır. Bunlar:

1. Büyükşehir dışındaki yerleşmelerde konut inşası: Buralarda Valiliklerden temin edilen projelerin uygulanması veya kişilerin kendi projelerini yaptırıp uygulamaları yoluyla konut edinmeleri,

2. Büyükşehir Belediyesi sınırları içinde kalan kırsal yerleşmelerde ise, kişilerin hazırlattıkları konut projelerini inşa etmeleri yoluyla konut edinme yöntemidir (Buralarda konut edinmek için izlenecek yol il merkezlerinde konut edinmek için izlenmesi gereken yol ile aynıdır).

Büyükşehir Belediyeleri dışında kalan kırsal yerleşmelerde Plansız Alanlar İmar Yönetmeliği uygulanmaktadır. **İlgili yönetmelik Madde 57- (Değişik: RG-2/9/1999-23804):** *Köy ve mezraların yerleşik alanlarında ve civarında sadece köy nüfusuna kayıtlı ve köyde sürekli oturanlarca yapılacak konut, tarım ve hayvancılık amaçlı yapılar ile müştemilat binaları yapı ruhsatı ve yapı kullanma iznine tabi değildir. Ancak, yapı projelerinin fen ve sağlık kurallarına uygun olduğuna dair valilik görüşü alınmasından sonra, muhtarlıkça izin verilmesi ve bu izne uygun olarak yapının yapılması şarttır.*

İnşa edilen yapının fen ve sağlık kurallarına uygunluğu İmar Kanununun 30 uncu maddesine göre valiliklerce belirlenir.

Valilikler, talep halinde köy yerleşik alanlarında yapılacak yapılar için, yörenin geleneksel, kültürel ve mimari özelliklerine uygun olarak üretilmiş projeleri temin edebilirler.

3194 Sayılı İmar Kanununun Köylerde yapılacak yapılar ve uyulacak esaslar (1),

başlığı altındaki **Madde 27 –(Değişik: 12/7/2013-6495/73 md.)** Belediye ve mücavir alanlar dışında köylerin köy yerleşik alanlarında, civarında ve mezralarda yapılacak konut, entegre tesis niteliğinde olmayan ve imar planı gerektirmeyen tarım ve hayvancılık amaçlı yapılar ile köyde oturanların ihtiyaçlarını karşılayacak bakkal, manav, berber, köy fırını, köy kahvesi, köy lokantası, tanıtım ve teşhir büfeleri ve köy halkı tarafından kurulan ve işletilen kooperatiflerin işletme binası gibi yapılar için yapı ruhsatı aranmaz. Ancak etüt ve projelerinin valilikçe incelenmesi, muhtarlıktan yazılı izin alınması ve bu yapıların yöresel doku ve mimari özelliklere, fen, sanat ve sağlık kurallarına uygun olması zorunludur. Etüt ve projelerin sorumluluğu müellifi olan mimar ve mühendisler aittir. Bu yapılar valilikçe ulusal adres bilgi sistemine ve kadastro planlarına işlenir. Köy yerleşik alan sınırları dışında kalan ve entegre tesis niteliğinde olmayan ve imar planı gerektirmeyen tarım ve hayvancılık amaçlı yapıların yapı ruhsatı alınarak inşa edilmesi zorunludur. Tarım ve hayvancılık amaçlı yapıların denetimine yönelik fennî mesuliyet 28 inci madde hükümlerine göre mimar ve mühendislerce üstlenilir. (...)

3194 Sayılı İmar Kanununun Müelliflik, fenni mesuliyet, şantiye şefliği, yapı müteahhitliği ve kayıtlar başlığı altındaki (1), **Madde 28 – (Değişik: 9/12/2009-5940/1 md.)** Bu Kanun kapsamındaki mimarlık, mühendislik ve planlama hizmetine ilişkin harita, plan, etüt, proje ve eklerinin düzenlenmesi ve bunların yerine getirilmesinin; uygulamada bulunulacak alanın, yerleşme merkezinin ve yapının sınıfına, özelliğine ve büyüklük derecesine göre, uzmanlık alanlarına uygun olarak 38 inci maddede belirtilen meslek mensuplarına yaptırılması mecburidir. Müellifler ve uygulamada bulunan meslek mensupları, işlerini bu Kanuna ve ilgili diğer mevzuata uygun olarak gerçekleştirmekten sorumludur. Yapıda inşaat ve tesisat işleri ile kullanılan malzemelerin kamu adına denetimine ilişkin fenni mesuliyet, ruhsat eki etüt ve projelerin gerektirdiği uzmanlığı haiz meslek mensupları tarafından ayrı ayrı üstlenilmek zorundadır.

Fenni mesul mimar ve mühendisler uzmanlık alanlarına göre; yapının, tesisatı ve malzemeleri ile birlikte, bu Kanuna, ilgili diğer mevzuata, uygulama imar planına, ruhsata, ruhsat eki etüt ve projelere, standartlara ve teknik şartnamelere uygun olarak inşa edilmesini denetlemekle görevlidir. Yapı sahibine ve idareye karşı sorumlu olan fenni mesuller, uzmanlık alanına uygun olarak yapıda yetki belgesi olmayan usta çalıştırılması veya şantiye şefi bulundurulmaksızın yapım işinin sürdürülmesi veya yapının mevzuata aykırı yapılması veya istifaları halinde, bu durumları altı iş günü içinde ilgili idareye yazılı olarak bildirmek zorundadır. Aksi takdirde, fenni mesuller kanuni mesuliyetten kurtulamaz. (...)

3194 Sayılı İmar Kanununun Köylerde yapılacak yapılar ve uyulacak esaslar (1), başlığı altındaki

Ruhsat müddeti: Madde 29 – Yapıya başlama müddeti ruhsat tarihinden itibaren iki yıldır. Bu müddet zarfında yapıya başlanmadığı veya yapıya başlanıp da her ne sebeple olursa olsun, başlama müddetiyle birlikte beş yıl içinde bitirilmediği takdirde verilen ruhsat hükümsüz sayılır.

Ruhsatsız veya ruhsat ve eklerine aykırı olarak başlanan yapılar: Madde 32 – Bu Kanun hükümlerine göre ruhsat alınmadan yapılabilecek yapılar hariç; ruhsat alınmadan yapıya başlandığı veya ruhsat ve eklerine aykırı yapı yapıldığı ilgili idarece tespiti, fenni mesulce (...) tespiti ve ihbarı veya herhangi bir şekilde bu duruma muttali olunması üzerine, belediye veya valiliklerce o andaki inşaat durumu tespit edilir. Yapı mühürlenerek inşaat derhal durdurulur. Durdurma, yapı tatil zaptının yapı yerine asılmasıyla yapı sahibine tebliğ edilmiş sayılır.

Bu tebligatın bir nüshasında muhtara bırakılır. Bu tarihten itibaren en çok bir ay içinde yapı sahibi, yapısını ruhsata uygun hale getirerek veya ruhsat alarak, belediyeden veya valilikten mührün kaldırılmasını ister. Ruhsata aykırılık olan yapıda, bu aykırılığın giderilmiş olduğu veya ruhsat alındığı ve yapının bu ruhsata uygunluğu, inceleme sonunda

anlaşırsa, mühür, belediye veya valilikçe kaldırılır ve inşaatın devamına izin verilir.

Yapı kullanma izni: Madde 30 - 27 nci maddeye göre, ruhsata tabi olmayan yapıların tamamen veya kısmen kullanılabilmesi için ise ilgili belediye ve valilikten izin alınması mecburidir.

Kullanma izni alınmamış yapılar: Madde 31 – İnşaatın bitme günü, kullanma izninin verildiği tarihtir. Kullanma izni verilmeyen ve alınmayan yapılarda izin alınuncaya kadar elektrik, su ve kanalizasyon hizmetlerinden ve tesislerinden faydalandırılmazlar. Ancak, kullanma izni alan bağımsız bölümler bu hizmetlerden istifade ettirilir.

İlgili maddeler incelendiğinde: Sürekli olarak köyde oturanlar için yapı ruhsatı ve yapı kullanma izninin söz konusu olmadığı belirtilmesine karşın, yapı projesinin fen ve sağlık kurallarına uygun olduğuna dair valilik görüşünden söz edilmektedir. Bu da yetmemekte, valilik onayını takiben, muhtarca da izin verilmesi ve yapının bu izne (valilik iznine) uygun olarak yapılmasının şart olduğu belirtilmektedir.

Ayrıca yasal düzenlemede “İnşa edilen yapının fen ve sağlık kurallarına uygunluğu İmar Kanununun 30 uncu maddesine göre valiliklerce belirlenir” denilmektedir. Valilik bu sorumluluğunu mimarı, statik tesisat ve diğer projelerin ilgili teknik elamanlarca hazırlanmış ve imzalanmış olması, hatta Oda onayından geçirilmiş olması ve yapının fen ve sağlık kurallarına uygunluğu ise, ancak teknik elemanların işi, iş süresince takip etmeleri durumunda mümkün olabilecektir. Bu durumda TUS'un (Teknik Uygulama Sorumlusu) devreye girmesi gerekir ki bu da konutu yaptıran için ek maliyet demektir, ya da yapının Valilik yetkililerince denetlenmesi gerekmektedir.

Aynı şekilde Valilikçe hazırlanan ve talepler karşılığında köylüye verilen projelerde dahi, yapılan işin fen ve sağlık kurallarına uygunluğu, projelerin uygulamaya nasıl aktarıldığı gözlenmeksizin, yani yapı denetlenmeksizin binanın fen ve sağlık kurallarına uygunluğu hakkında karar vermek mümkün görünmemektedir. Örneğin beton

kalitesi yapı çeliklerinin kesitleri ve aralıkları vs. iş süresince denetlenmesi gerekmektedir. Çünkü bir yapının güvenliği konusunda karar vermek ancak sürekli kontrollük hizmetlerinin yürütülmesi ile veya sonradan yapılan detaylı uzman araştırmaları ile mümkündür. Bu durumda denetimler İl Özel İdareleri, Belediyeler, Yapı Denetim birimleri ya da TUS'larca mı yapılacaktır ve bir bedeli olacak mıdır sorusu akla gelmektedir.

Güncel Bazı Uygulamalar:

Bazı valilikler ve belediyeler hazırladıkları tip projelerin istekliler tarafından uygulanması halinde, istekliği proje bedeli ve diğer bir takım harçlardan muaf tutmaktadırlar. Böylece yeni konutların inşasına ve hatta yenilenmesine destek vermektedirler. Örneğin Muğla'nın Menteşe Belediyesi başkanı “6360 sayılı Büyükşehir Kanunu kapsamında mahalleye dönüştürülen köylerimizde oturanlar bir takım zorluklar getirdi. Bu nedenle konut inşa edenler için projeler hazırladık ve projeleri ücretsiz olarak isteklilere verdik” içerikli açıklama yapmıştır. Ancak desteğin sadece proje kapsamında mı kaldığı, kontrollük hizmetleri veya iskan ruhsatı gibi konuları da kapsamına alıp almadığından söz etmemiştir.

Diğer bir çalışma ise TOKİ tarafından gerçekleştirilen Tarım Köy Projeleridir. Tanıtımında derme çatma evlerde yaşayan vatandaşlar, tarım köy uygulamaları ile çevre düzenlemesi, yeşil alanı, düzenli yolları, altyapısı, çocuk parkı hazır hale getirilen konutlardan söz edilirken, konutların her bölgenin ihtiyaç ve özelliklerine göre farklı olacağı belirtiliyor. Ayrıca konutlar için

250-3000 m² tarım arazisinin verileceği belirtilirken, 120-130 m² konutun fiyatının 180 000 -195 000 TL. civarında olacağı belirtilmektedir (Anonim, 2016). Ancak bu projeler köylü için oldukça pahalı ve yeterli tarım alanı sunamamaktadır. Örneğin Kırşehir'in Kaman ilçesi Hirfanlı Barajı kıyısında inşa edilen 113 m² (2+1) konutun bedeli peşin 93 000 TL., 178 m² (3+1) 147 000 TL.'dir (Anonim, 2016a). Bu yapılar kırsal kesimde yaşayanlardan çok kentlilerin yazlık konutları olabilir. Kırsal kesimin

Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

beklentisi yerel malzeme ve yerel iş gücü ile inşa edilebilecek güvenli ve konforlu yapılara ulaşmaktır.

Sonuç ve Öneriler:

Sonuç

Ülke nüfusunun yaklaşık %20'si belde ve köylerde konfor şartlarından uzak, yaşlı ve deprem güvenliği açısından da güvensiz konutlarda yaşamaktadır. Bir yandan deprem ve benzeri felaketler sonrası oluşabilecek kayıpları azaltmak, öte yandan kırsal alanlarda yaşayan insanımızı hiç olmasa daha çağdaş ve yaşanılabilir mekânlarda yaşatabilmek amacıyla yeni konutların inşası kaçınılmazdır.

Ancak kırsal alanlarda inşa edilecek yapıların maliyetlerinin kentlere oranla daha yüksek ve köylünün gelirinin düşük olduğu dikkate alındığında; kırsal için düşük maliyetli ancak sağlıklı konutların üretimine ihtiyaç duyulduğu ortaya çıkmaktadır. Bu ihtiyacın karşılanmasında devlet ve belediyelerin desteğine şiddetle ihtiyaç duyulduğu ortadadır.

Kırsal alanlarda yaşayan ve tarımsal faaliyette bulunan nüfusun önemli bir bölümü, yöredeki ustalarca bölgenin iklim, malzeme, coğrafi yapı, tarımsal uğraş alanı, sosyal ve tarihsel değerlerin dikkate alınarak üretilen ve yöreye özgü yaşam tarzının sürdürüldüğü yapılarda oturmaktadır. Yeni konut inşası ise pekte kolay görünmemektedir.

Öneriler

Kırsalda konut üretimini engelleyen temel faktör konut maliyetleridir. Konut maliyetlerinin düşürülmesi için

1. Yerel malzemenin kullanımına ağırlık verilmeli,
2. Hane halkının inşa aşamasında görev alması sağlanmalı,
3. Yerel malzemelerin kullanılabilirdiği afetlere karşı dayanıklı (Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik mutlaka dikkate alınmalı) yığma yapı projeleri hazırlanarak, isteklilere verilmeli, böylece maliyetler azaltılmalı,
4. Kırsal kesimde konut inşa etmek isteyenlerden harç alınmamalı,
5. İnşa edilen konut yapılarının proje desteği dışında kontrollük hizmetleri de

kamu kurumlarınca yapılarak maliyet yükselmesi önlenmelidir.

Kaynaklar:

- Anonim, (2016), <http://dortdivan.bel.tr/haber/334/17/tokden-drtdivana-tarim-ky-projesi>.
- Anonim, (2016a), <http://www.trthaber.com/haber/gundem/tokid-n-gol-manzarali-tarimkoy-konutu-64891.html>
- Çevik, B., Tekinel, O. (1998) Kırsal Yerleşim Tekniği, Çukurova Üniversitesi yayınları No: 202 Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi.
- ÇSGB, (2006) Yapı Yaklaşık Birim Maliyetleri, 9 Nisan 2016 CUMARTESİ tarih ve 29679 Resmi Gazete.
- Dalkılıç, N., (2008) Geleneksel Konutlarda Kullanıcı Mekan ilişkisi: Midyat Örneği, Uludağ Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi dergisi, Cilt 13, Sayı 1.
- Eminağaoğlu, Z. (2004). Kırsal Yerleşmelerde Dış Mekân Organizasyonu İlgili Politikalar ve Değerlendirmeler, KTÜ Fen Bilimleri Ens. (Doktora Tezi).
- Ergen, Y. (1986) Bina Bilgisi, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul.
- Ergen, Y. (1979) Şehircilik Ders Notları, Yüksek Teknik Öğretmen Okulu Yayınları.
- Karakuyu, M. (2008). Türkiye'de Kırsal Konutları ve Eklentileri Üzerine Bir Araştırma Fatih Üniversitesi 2008, Alaşehir Örneği ", bilig, No. 44, Jan. 2008, pp. 45-62.
- Olgun, M. (2011). Tarımsal Yapılar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 1577.
- Plansız Alanlar İmar Yönetmeliği, <https://www.google.com.tr/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8>
- Şenol, P., Er, Akan, A. (2011), Kırsal Yaşam /Kırsal Konut: Bir Yaşam Biçimi Olarak Geleneksel Kırsal Konut Üretiminde Kızılcık Köyü Örneği, SDU Faculty of Arts and Sciences Sosyal

Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası

- Bilimler Dergisi Journal of Social Sciences Aralık 2011, Sayı:24, ss.143-160.
- TÜİK, (2015). 31Aralık 2015Tarihli adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi Sonuçları İl, İlçe, Belediye Ve Köylerin Sayı ve Nüfusları.
- TÜİK, (2013), Nüfus ve Konut Araştırması, 2011., TÜİK Haber Bülteni, Sayı: 15843.
- 3194 Sayılı İmar Kanunu: Köylerde yapılacak yapılar ve uyulacak esaslar (1).
- Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik 1997 Deprem Yönetmeliği (1998 değişiklikleri ile birlikte) İlk Yayın Tarihi : 2.9.1997 – 23098 mükerrer sayılı Resmi Gazete Yürürlüğe Giriş Tarihi: 1.1.1998 Değişiklik Tarihi: 2.7.1998 – 23390 sayılı Resmi Gazete.
- 6360 Sayılı Kanun: (On Üç İlde Büyükşehir Belediyesi Ve Yirmi Altı İlçe Kurulması İle Bazı Kanun Ve Kanun Hükmünde Kararnamelerde Değişiklik Yapılmasına Dair Kanun) Kabul Tarihi: 12/11/2012.



Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu*

Ruşen KIŞLAK⁽¹⁾

Nüket ÖNELGE⁽²⁾

Özet

Çalışma domates bitkisinde *Pospiviroid* cinsi viroidlerin varlığının araştırılması için yürütülmüştür. 2014-2015 arasında, 400 adet domates tohum, fide ile yaprak örneği toplanmış ve total nükleik asit ekstraktları elde edilmiştir. Posp1-FW/RE ve Vid-FW/RE primerleri ile yürütülen RT-PCR çalışmalarında, 398 adet domates örneğinin bir viroidle bulaşık olmadığı görülmüştür. "Çeri" çeşidi iki domates örneğinin ise *Citrus exocortis viroid* (CEVd) etmeni ile bulaşık olduğu, CEVd-FW/RE primer çifti ile belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında bu örneklere ait 371 bp'lik DNA bantları görüntülenmiş ve CEVd ile enfekteli izolatlar moleküler açıdan da karakterize edilmiştir. Nükleotid dizilimi analizi sonuçları NCBI gen bankasına bildirilen domates, turunçgil ve diğer izolatlara %89-98 sekans benzerliği göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Viroid, domates, *Pospiviroid*, RT-PCR, mekanik inokulasyon.

Investigation and Molecular Characterization of Viroid Agents Existence at *Pospiviroid* Genus on Tomato Plant

Abstract

Study was conducted to investigate viroids' existence at *Pospiviroid* genus on tomato plant. Between 2014-2015, 400 tomato seeds, seedlings and leaves samples were collected and total nucleic acid extracts of samples were obtained. In RT-PCR studies which were carried out by Posp1-FW/RE and Vid-FW/RE primer sets, any viroid infection was detected in 398 tomato samples. Two tomato samples on "Çeri" cultivar, found infected with *Citrus exocortis viroid* (CEVd) by CEVd-FW/RE primer pair. 371 bp of DNA bands were shown belong to samples in agarose gel electrophoresis studies. CEVd infected isolates were also characterized molecularly. Nucleotid alignments analysis showed %89-98 sequence similarity to some tomato, citrus and other isolates reported to NCBI Genbank database.

Keywords: Viroid, tomato, *Pospiviroid*, RT-PCR, mechanical inoculation.

Giriş

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Solanales takımının Solanaceae familyasının *Lycopersicon* cinsine bağlı, ılıman iklimlerde tek yıllık, tropikal bölgelerde ise çok yıllık bir bitkidir (Şeniz, 1992).

Domates dünyada en fazla yetiştirilmekte olan sebze türlerinden birisidir. Dünyada toplam 4 751 530 hektar alandan, 156 477 012 ton domates üretilmektedir. Dünya domates üretimi ülkeler sıralamasına bakıldığında 50 552 200 ton üretim ile Çin birinci sırayı almaktadır. Bu sırayı 18 227 000 ton üretim ile

Hindistan, 12 574 550 ton üretim ile ABD, 11 820 000 ton üretim ile Türkiye ve 8 533 803 ton üretim ile Mısır takip etmektedir (FAO, 2013).

Domates üretimindeki mevcut rakamlarla Türkiye, dünyada 4. sıradadır (FAO, 2013).

Kültür domatesi yetiştiriciliğinde fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu bitkide hastalık oluşturan önemli bir patojen grubu da sub-viral etmenler olarak bilinen viroidlerdir.

Viroidler çok sayıda tarımsal üründe önemli düzeyde ürün kayıplarına neden

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 02.09.2016

*Yüksek Lisans Tezi

(1) T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Mersin Ziraat Karantina Müdürlüğü, Yenişehir/MERSİN

(2) Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sarıçam/ADANA

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

olabilen, dairesel, tek zincirli formda ve RNA molekülü yapısındaki etmenlerdir (Diener, 1987).

Nükleotid (baz) dizilimi benzerliklerine dayalı yapılan son taksonomik çalışmalarda, viroidler "*Pospiviroidae*" ve "*Avsunviroidae*" familyalarına ayrılmıştır (Flores ve ark., 2005).

Günümüzde dünya çapında yapılan çeşitli çalışmalarla, bu iki familyaya dahil yaklaşık 30'un üzerinde viroid etmeni birçok kültür bitkisinde saptanmış durumdadır (Flores ve ark., 2011).

Özellikle de Solanaceae familyasında hastalıklara neden olan, *Pospiviroidae* familyası *Pospiviroid* cinsi içerisinde 10 adet viroid türü bulunmaktadır. *Pospiviroid* cinsi viroidlerin benzer semptomlar ve oluşan verim kayıplarıyla, domates bitkilerinde çeşitli enfeksiyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir (Mongera ve ark., 2010).

Pospiviroid cinsine ait türlerden *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (Leontyeva, 1980; Puchta ve ark., 1990), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), (Walter ve ark., 1980; Walter, 1987), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), (Galindo ve ark., 1982), *Columnnea latent viroid* (CLVd), (Hammond ve ark., 1989; Singh ve ark., 1992), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), (Mishra ve ark., 1991; Fagoaga ve Duran-Vila, 1996), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), (Singh ve ark., 1999), *Mexican papita viroid* (MPVd), (Ling ve ark., 2008) ve son olarak da *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), (Reanwarakorn ve ark., 2011) etmenlerinin domates bitkilerinde çeşitli hastalıkların oluşumlarına sebebiyet verdiği bilinmektedir.

Viroid enfeksiyonları nedeni ile domates bitkilerinde değişen oranlarda meydana gelen verim kayıplarının ve bazen de bitkilerin ölümü ile sonuçlanan durumların ortaya çıkabildiği bilinmektedir.

Domates bitkisi ve Solanaceae familyası bitkilerinde hastalık oluşturan viroid etmenleri ile ilgili dünya genelinde yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Ülkemizde viroid etmenleri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcut olmakla birlikte,

özellikle domates bitkilerini kapsayan detaylı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma domates bitkilerinde hastalık oluşturduğu bilinen *Pospiviroid* cinsi viroid etmenlerinden PSTVd, CEVd, TASVd, TCDVd etmenlerinin 2014 ile 2015 yıllarında toplanan domates tohum, fide ve yaprak örneklerindeki varlığının araştırılması amacı ile moleküler yöntemler kullanılarak yürütülmüştür.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bitkisel Materyal

Çukurova Bölgesinde yapılan çalışmanın tüm bitkisel materyallerini; çeşitli sörvey çalışmaları, fide firmalarına yapılan ziyaretler ve tohum firmaları aracılığı ile toplamda 400 adet olmak üzere elde edilen domates bitkilerine ait yerli ve ticari çeşitleri içeren tohum, fide ve yaprak örnekleri oluşturmuştur.

Tohum örnekleri yerli ve ticari çeşit tohumlar olarak ayrılmakla birlikte, bu çalışma için toplam 150 çeşit tohum örneği toplanmıştır. Yerli domates tohumları Türkiye'de yetiştirilen farklı bölge çeşitlerini temsil edecek şekilde toplanan, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. H. Yıldız Daşgan'a ait yerli domates tohum koleksiyonundan temin edilmiştir. Ticari domates tohumları ise bölgemiz illeri ve farklı illerdeki tohum firmalarından temin edilmiştir. Domates bitkilerine ait 250 adet fide ve yaprak örneği ise Adana ile Mersin illerinde bulunan bazı üretici seralarından ve ticari üretim yapılan çeşitli seralardan temin edilmiştir.

Moleküler Çalışmalarda Materyal

Gerçekleştirilen total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmalarında hassas terazi, CTAB tamponu çözeltisi, havan ve dövücüler, makas, bistüri, saf su, %2'lik NaClO, kurutma kağıdı, 1.5 ml ve 2 ml hacimlerinde eppendorf tüpler, değişik hacimlerde pipet ve pipet uçları, rak, su banyosu, derin dondurucu, karıştırıcı, santrifüj cihazı, kloroform:izoamil alkol (24:1), izopropanol, %70'lik etil alkol, TE tamponu çözeltisi ve saf su cihazı kullanılmıştır.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

RT-PCR çalışmalarında total nükleik asit örnekleri, primerler, dNTP, ddH₂O, 5X tamponu çözeltisi, DTT, ters transkriptaz (RT) enzimi, Taq polimeraz enzimini içeren GoTaq karışımı, pipet ve pipet uçları, PCR tüpleri, karıştırıcı, santrifüj cihazı ve thermal cycler kullanılmıştır.

Elektroforez çalışmalarında 1X TAE tamponu çözeltisi, agaroz, elektroforez tankı, güç ünitesi, mikrodalga fırın, jel tepsisi ve tarakları ile 100 bp'lik DNA markör kullanılmıştır.

Örneklerin görüntülenmesi aşamasında ise UV transillüminatör cihazı ve saf suyla seyreltilmiş etidyum bromür kullanılmıştır.

Yöntem

Domates Bitkisine Ait Örneklerin Elde Edilmesi ve Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan 50 domates çeşidine ait tüm yerli tohumlar, 1:1 oranındaki perlit ve torf karışımı hazırlandıktan sonra 9x5'lik plastik vıyollere ekilmiştir. Bitkiler tohum ekiminden 20-21 gün sonra 8-10 cm uzunluğa ulaştıncaya, her bitkiden 2-3 gram yaprak örneği alınıp buz kutuları içindeki plastik torbalarda Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarına getirilmiştir. Tohumların ekim aşamaları ve çeşitli diğer tüm bakım işlemleri çalışma tamamlanıncaya kadar Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait plastik seralarda yürütülmüştür.

Adana, Mersin ve Antalya ile diğer bazı illerdeki tohum firmaları aracılığıyla ve doğrudan satın alım yapılarak temin edilen 100 çeşit ticari domates tohum örneği, kurutma kağıtları ve cam petri kapları gibi materyaller kullanılarak çimlendirme kabinlerinde çimlendirilmiş ve bu bitkiler 9-10 gün sonra 5-6 cm uzunluğa ulaştıncaya 1:1 oranında hazırlanmış perlit:torf karışımı içeren vıyollere şaşırtılmıştır.

Şaşırtma işleminden sonra 12-14 cm uzunluğa ulaşan bitkilerin farklı kısımlarından birer gram örnek alınarak ekstraksiyon aşamalarında kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılmak üzere toplanılan domates bitkisine ait fide ve yaprak örnekleri, Adana ve Mersin illerindeki ticari üretim yapan fide üretim tesisleri ile üretici seralarından toplam 250 adet örnek içerecek şekilde elde edilmiştir.

Fide örnekleri, araştırılan viroidlerin karakteristik bazı hastalık belirtilerini sergileme durumlarına göre güdümlü örnekleme yöntemi ile toplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmaları

CTAB temelli total nükleik asit ekstraksiyonu için, Murray ve Thompson'un (1980) tanımladığı yöntem kullanılmıştır. Domates bitkisine ait örneklerin kullanıldığı total nükleik asit ekstraksiyonu çalışmaları, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarında yürütülmüştür.

RT-PCR ve Elektroforez Çalışmaları

RT-PCR çalışmaları Önelge (1997)'e göre iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada viroid RNA'sı tamamlayıcı DNA'ya çevrilmiş daha sonra PCR çalışmasına alınmıştır.

Gerçekleştirilen tüm PCR çalışmalarında pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarında kullanılan etmenlere özgü primerler Çizelge 1'de verilmiştir.

Elektroforez çalışmalarında cDNA'ların (viroid bandları) görüntülenmesi %2'lik agaroz jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin çeşitli bazı aşamaları ise Önelge (1997)'e göre modifiye edilmiştir.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 1. Araştırılan viroid etmenlerini belirlemede kullanılan çeşitli primer çiftleri (Önelge, 1997; Verhoeven ve ark., 2004).

Primer Çiftleri	Sekans Dizilimi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge (bp)
Pospil-FW	GGGATCCCCGGGAAAC	59-62 °C	86-102 bp
Pospil-RE	AGCTTCAGTTGT(T/A)TCCACCGGT	59-62 °C	261-283 bp
Vid-FW	TTCTCGGAACAACTCGTG	58-60 °C	16-355 bp
Vid-RE	CCAACTGCGGTTCCAAGGG	58-60 °C	336-354 bp
CEVd-FW	GTGCTCACCTGACCCTGCAGG	58 °C	371 bp
CEVd-RE	ACCACAGGAACCTCAAGAAAG	58 °C	371 bp

Sekans Analizleri ve Verilerin Karşılaştırılması

RT-PCR ve agaroz jel elektroforezi sonucunda bulaşık bulunan örnekler, saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacı ile Adana ilindeki "Molgentek" firmasına gönderilmiştir.

Sekanslama işlemleri tamamlanan bulaşık domates örneklerinin mevcut baz dizilimleri "Finch TV" programı aracılığıyla görüntülenip, NCBI gen bankasında yer alan bazı verilerle "BLAST" yönteminde karşılaştırılmıştır.

Yapılan filogenetik analiz çalışmalarında ise bulaşık domates örneklerine ait DNA dizileri, "Mega 6" programı ile "Neighbour Joining" yönteminde sınıflandırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma Domates Tohum Örneklerinin Testlenmesi

50 çeşidi içeren yerli ve 100 çeşidi içeren ticari domates tohum örneklerinin tamamı PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd etmenleri açısından Pospil-FW/RE ve Vid-FW/RE primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004) ile RT-PCR yöntemi kullanılarak testlenmiştir.

Sonuçta bu çalışma amacı doğrultusunda testlenen domates tohum örneklerinin tümünün araştırılan viroid etmenleri açısından sağlıklı oldukları görülmüştür.

Testlenen domates tohumu örneklerinde araştırılan viroid etmenlerinin tespit edilmemesi olumlu bir sonuçtur ama bu durum ülkemizdeki domates bitkilerine ait tohumluk materyalin tümüyle temiz olduğu anlamını taşımamaktadır. Çok daha fazla sayıda tohum örneğinin rutin olacak şekilde testlenmesinin sürdürülmesi ile daha belirgin bazı sonuçların elde edileceği öngörülmektedir.

Domates Fide ve Yaprak Örneklerinin Testlenmesi

Yerli ve ticari çeşitleri içeren 250 adet domates bitkisine ait fide ve yaprak örneklerinin tamamı PSTVd, CEVd, TASVd ve TCDVd açısından Pospil-FW/RE ve Vid-FW/RE primer çiftleri (Verhoeven ve ark., 2004) ile RT-PCR yöntemi kullanılarak testlenmiştir.

Sonuçta testlenen 248 örnekte araştırılan viroid etmenleri açısından bir bulaşıklık durumu tespit edilmemiş ancak saksılı bir şekilde temin edilen "Çeri" çeşidi iki domates örneğinde ise CEVd etmeni ile bulaşıklık saptanmıştır.

2015 yılında yürütülen çeşitli sörveyler ile Adana ilinin Yüreğir ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden temin edilen bitkilerden Nisan ayında alınan bitki Örnek-1, Haziran ayında alınan bitki ise Örnek-2 olarak isimlendirilmiştir.

"Çeri" çeşidi domates örneklerinde küçük boyutta ve kıvrık yaprak yapılarının görülmesi, bitkilerin özellikle tepe kısımlarında kümeleşme oluşumları ve boğum aralarının kısılması belirtilenlerle bitkilerdeki genel gelişim geriliği ve bodurluk gibi belirtilerin (Şekil 1) gözlemlenmesi mevcut domates örneklerinin CEVd etmeni ile bulaşık durumda olabileceğini düşündürmüştür.

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Simptomolojik bazı gözlemlerin ardından yapılan RT-PCR çalışmasında CEVd etmenine özgü CEVd-FW/RE primer çifti (Önelge, 1997) kullanılarak, Örnek-1 ve Örnek-2 domates bitkilerinin CEVd etmeni ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. PCR düzeninin CEVd-FW/RE

Çalışmada CEVd etmeni ile bulaşık olan örneklerin oluşturduğu bant uzunluklarının, pozitif kontrol örnekleri ile aynı seviyelerde olduğu da görülmüştür.

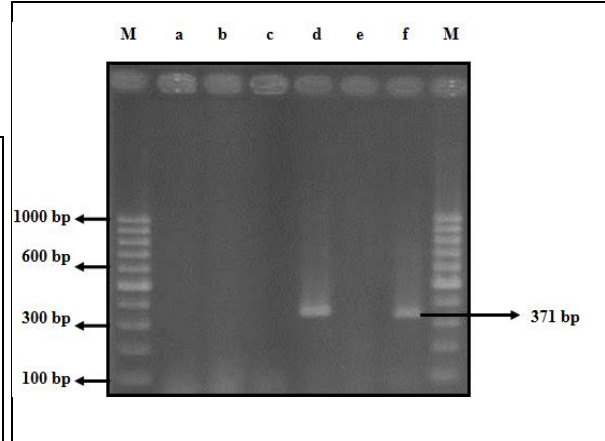


Şekil 1. Örnek-1 bitkisinde gelişim geriliği, boğum aralarının kısalığı ve bitkinin bodur bir yapıya sahip olması

Örnek-1 izolatu ile NCBI veri tabanında yürütülen çalışmalara göre karşılaştırılan ilk 100 CEVd izolatu içinde Örnek-1 izolatu, NCBI veri tabanında kayıtlı CEVd izolatlarına %91'den %98'e varan çeşitli oranlarda sekans benzerliği göstermiştir. Veriler incelendiğinde Örnek-1 izolatına sekans benzerliği gösteren birçok CEVd izolatının "*Citrus*" cinsine dahil bazı türlerden bildirildiği görülmüştür.

Örnek-1'e en yüksek oranda sekans benzerliği gösteren ve mevcut bu benzerlik

primer çiftinin uygun bağlanma sıcaklığı olan 58 °C sıcaklık koşullarına göre modifiye edildiği çalışmalarda, mevcut domates örneklerine ait 371 bp'lik DNA bantları agaroz jel üzerinde (Şekil 2) görüntülenmiştir.



Şekil 2. RT-PCR ile testlenen Örnek-1 domates bitkisine ait %2'lik agaroz jel görüntüsü.

M: 100 bp'lik DNA markör, a: Negatif kontrol (Steril su), d: Örnek-1, f: Pozitif kontrol (CEVd)

oranının da %97 ile %98 olduğu ilk beş CEVd izolatının mandarin (*C. reticulata*), portakal (*C. sinensis*) ve greyfurt (*C. paradisi*) türlerinden bildirildiği görülmüştür. Domates bitkilerinde bazı doğal enfeksiyonlara sebep oldukları bildirilen CEVd izolatları ise Örnek-1 izolatına %89-92 arasında değişen oranlarda sekans benzerliği sergilemiştir (Çizelge 2).

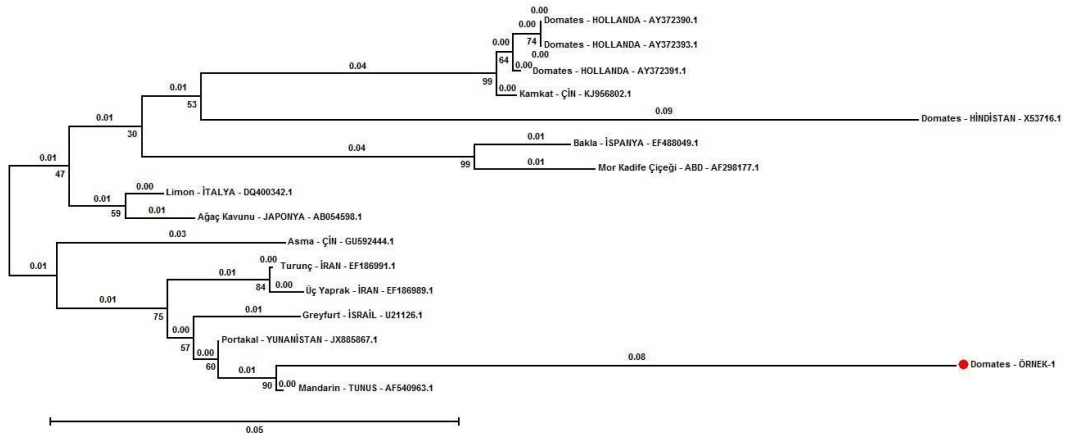
Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 2. Örnek-1 ile CEVd varyantlarının NCBI veri tabanında karşılaştırılması

Varyant Adı	Erişim Numarası	Konukçu Bitki Türü	Bildirilen Ülke	Benzerlik Oranı (%)
CEVd-tun/c14	AF540963.1	Mandarin (<i>C. reticulata</i>)	Tunus	%98
EK4-CEVd	JX885867.1	Portakal (<i>C. sinensis</i>)	Yunanistan	%97
BSE	EF186991.1	Turunç (<i>C. aurantium</i>)	İran	%96
CEVd-225	U21126.1	Greyfurt (<i>C. paradisi</i>)	İsrail	%96
LMPE3	EF186989.1	Üç Yaprak (<i>P. trifoliata</i>)	İran	%96
Variant KA	AB054598.1	Ağaç Kavunu (<i>C. medica</i>)	Japonya	%95
ISA 8-NA-1	DQ400342.1	Limon (<i>C. limon</i>)	İtalya	%94
CEVd-4-20	EF488049.1	Bakla (<i>Vicia faba</i>)	İspanya	%94
Hb-G1	GU592444.1	Asma (<i>Vitis vinifera</i>)	Çin	%94
CEVd-S	AF298177.1	Mor Kadife Çiçeği (<i>G. aurantiaca</i>)	ABD	%93
CEVd 2	KJ956802.1	Kamkat (<i>C. japonica</i>)	Çin	%93
8900808	AY372390.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%92
89002600	AY372393.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%92
89002594	AY372391.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hollanda	%91
CEVd-4	X53716.1	Domates (<i>L. esculentum</i>)	Hindistan	%89

Şekil 3'teki soyağacında Örnek-1 izolatu kendisine %96-98 arasında değişen oranlarda sekans benzerlikleri sergileyen AF540963, X885867, U21126, EF186989 ve EF986991 izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Bu grup çeşitli turunçgil türlerinden bildirilen izolatlar olmakla birlikte Tunus, Yunanistan, İsrail ve İran izolatlarından oluşmuştur. Örnek-1'e %89-

92 arasında değişen çeşitli bazı oranlarla sekans benzerliği sergileyen ve domates bitkilerinden bildirilmiş olan Hollanda (AY372390, AY372391, AY372393) ile Hindistan (X53716) izolatları ise aynı grupta ve farklı dallarda yer almıştır.



Şekil 3. Örnek-1 izolatu ile CEVd varyantlarının filogenetik yakınlıklarını gösteren soyağacı (Kimura 2-Parametre Modeli, Bootstrap Değeri: 1000 Tekrar)

Sonuçlar

Yürütülen bu çalışmanın sonucunda CEVd etmeni ile bulaşık oldukları belirlenen domates bitkilerinde, CEVd'inin 371 nükleotid uzunluğuna sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuç, CEVd etmeninin saptanan nükleotid uzunluğu bakımından mevcut literatür bilgileri ve dünyada yapılmış çeşitli çalışmalarla uygunluk içerisinde olduğunu göstermektedir.

CEVd ile bulaşık domates örneklerinin alındığı ticari işletmede süs bitkileri, bazı sebze fideleri ve çeşitli meyve fidanlarının da satışı gerçekleştirilmektedir.

Kaynaklar

- Bora, T., Karaca, İ. (1970) Bitki hastalıklarının sorveyi: *Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi*. 167:8-43, Ege Üni. Matbaası, İzmir.
- Diener, T. O. (1987) *The Viroids*. Plenum Publishing Corporation, USA.
- Fagoaga, C., Duran-Vila, N. (1996) Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetables. *Plant Path.* 45:45-53.
- FAO (2013) Faostat Agricultural Database. www.faostat.org. Accessed: 17.02.2015.
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., Diener, T. O. (2005) A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143(3):623-629.
- Flores, R., Grubb, D., Elleuch, A., Nohales, M. A., Delgado, S., Gago, S. (2011) Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: *Variations on a Theme*.
- Galindo, J., Smith, D. R., Diener, T. O. (1982) Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopatology* 72:49-54.
- Hammond, R. W., Smith, D. R., Diener, T. O. (1989) Nucleotid sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid* (CLVd): A natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17:10083-10094.
- Leontyeva, J. A. (1980) Tomatoes and *Potato spindle tuber viroid*. *Zashc. Raste.* 8: 22.
- Ling, K. S., Bledsoe, M. E. (2008) First report of *Mexican papita viroid* (MPVd) infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease* 93(8):839.
- Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R., Diener, T. O. (1991) Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of *Citrus exocortis viroid*. *J. Gen. Virol.* 72:1-5.
- Mongera, W., Tomlinsona, J., Boonhama, N., Marnb, M. V., Pleskob, I. M., Molinero-Demillyc, V., Tassus, X., Meekesd, E., Toonend, M., Papayiannise, L. (2010) Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods* 169:207-210.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8(19):4321-4325.
- Önelge, N. (1997) Direct nucleotide sequencing of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *Turk. J. Agric. For.* 21:419-422.
- Puchta, H., Herold, T., Verhoeven, K., Roenhorst, A., Ramm, K., Schmidt-Puchta, W., Sanger, H. L. (1990) A new strain of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) exhibits major sequence differences as compared to all other strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology* 15:509-511.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S., Porsoongnurn, J. (2011) First report of natural infection

Domates Bitkisinde *Pospiviroid* Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu

- of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Dis. Rep.* 24:6.
- Singh, R. P., Boucher, A., Somerville, T. H. (1992) Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Dis.* 76(9):951-953.
- Singh, R. P., Nie, X., Singh, M. (1999) *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd): An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J.Gen. Virol.* 80:2823-2828.
- Şeniz, V. (1992) Domates, Biber ve Patlıcan Yetiştiriciliği. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, İstanbul.
- Verhoeven, J. TH. J., Jansen, C. C. C., Willemsen, T. M., Kox, L. F. F., Owens, R. A., Roenhorst, J. W. (2004) Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:823-831.
- Walter, B., Thouvenal, J. C., Fauquet, C. (1980) Les virus de la tomate en Cote d'Ivoire. *Annales de Phytopathologie* 12:259-275.
- Walter, B. (1987) Tomato apical stunt: *The Viroids*. T. O. Diener (Ed.), 321-328, Plenum Publishing Corporation, USA.



Hemin İlavesinin Laktik Asit Bakterilerinde Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Burcu ÖZEL⁽¹⁾

Ömer ŞİMŞEK⁽²⁾

Hüseyin ERTEN⁽³⁾

Özet

Laktik asit bakterileri diğer bakteriler gibi gerek in vitro gerekse in vivo koşullarda üreme ve gelişme süreçlerinde birçok stres faktörü ile karşılaşılır. Bunlardan biri de oksidatif streştir. Oksidatif stres laktik asit bakterilerinin mikrobiyal gelişimi ve metabolit üretme yeteneklerini olumsuz etkiler. Katalaz negatif özellikli laktik asit bakterilerinin oksijene karşı hassasiyetlerinin azaltılmasında bugüne kadar çeşitli moleküler çalışmalar yapılmıştır. Öte yandan, üretici suşun genetik doğasında herhangi bir değişiklik yapmadan kültür ortamına hemin ilavesi ile de oksidatif stres ortadan kaldırılabilmektedir. Bu derlemede; laktik asit bakterilerinde görülen oksidatif stresin hücre tarafından elemin edilmesinde etkili olan hemin ve hemin ilavesinin hücredeki etki mekanizması üzerinde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, oksidatif stres, hemin, solunum

Influence Of Hemin Addition On Oxidative Stress In Lactic Acid Bacteria

Abstract

Lactic acid bacteria as much as other bacteria are faced to many stress factors during their growth and development process in vitro and in vivo conditions. Oxidative stress represents one of these stress factors. Oxidative stress negatively affects microbial growth and metabolite production of lactic acid bacteria. Many molecular studies have been done on the reduction of oxygen sensitivity of lactic acid bacteria which have catalase negative property. However, addition of hemin into the fermentation medium can prevent the oxidative stress of lactic acid bacteria without doing any genetic modification. In this review, hemin structure and addition of hemin for the elimination of oxidative stress by the cell occurring in lactic acid bacteria were discussed.

Keywords: Lactic acid bacteria, oxidative stress, hemin, respiration

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 02.09.2016

⁽¹⁾Osmaniye Korkut Ata Üniv. Bahçe Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Böl., Bahçe, Osmaniye

⁽²⁾Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kınıklı, Denizli.

⁽³⁾Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balcalı, Adana.

Giriş

Mikroorganizmaların gelişme ve üremesini olumsuz yönde etkileyen herhangi zararlı bir faktöre/ortama stres adı verilir (Dikici, 2009). Herhangi mikroorganizma her türlü strese karşı farklı direnç gösterebilir. Laktik asit bakterilerinin (LAB) de gösterdiği direnç farklıdır ve hücre üzerine etkisi gelişim üzerinde meydana gelen değişimler incelenerek belirlenmektedir. Isı şoku, düşük sıcaklık, düşük pH, besin yetersizliği, ultraviyole radyasyon, ortamdaki çözünmüş oksijen miktarı, mikrobiyal metabolit miktarı, yarışmacı flora gibi çevresel stres faktörleri LAB'nin fermentasyon verimine etki eder. Fermentasyon verimini azaltıcı bu stres faktörlerini ortadan kaldırmak için genetik yolla rekombinant mikroorganizmalar üretimi, üretici hücrenin metabolik yolunda modifikasyonlar yapılması ve fermentasyon koşullarının optimize edilmesi gibi yollarla verim artırımı üzerine çalışılmıştır (Abriouel ve ark. 2004; Wardani ve ark. 2006; Şimşek ve ark. 2009; Papagianni ve Avramidis 2012; Kördikanlıoğlu ve ark. 2015).

Oksijen her ne kadar birçok canlının yaşamsal faaliyeti için enerji üretiminde önemli olsa da anaerobik mikroorganizmalar için toksik etki gösterir. Serbest oksijenin toksisitesi oluşturduğu çeşitli hidroksil radikal gruplarından kaynaklanır. Söz konusu bu mikroorganizmaların metabolik döngülerine serbest oksijenin dahil olması ile hücre sitoplazması ve membranında farklı türlerde reaktif oksijen bileşenleri oluşur. Bu bileşenlerin oluşumunu ise elektron transfer zincirinden kurtularak serbest kalan elektronlar katalizler. Süperoksit (O_2^-), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri lipid, protein, nükleik asit, karbonhidrat ve enzim gibi hücrelerin önemli bileşiklerine etki ederek ortamda toksik etki yaratırlar. H_2O_2 doğrudan protein yapılı bileşiklerin sistein bağlarını okside ederek önemli enzimlerin inaktif olmasına neden olur. Öte yandan reaktif oksijen bileşenleri ortamdaki Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi katyonlar ile de fenton tepkimeleri gerçekleştirerek hidroksil radikallerini oluşturur. Hidroksil radikali

hücrenin tüm organik bileşikleri etkileyebilen oksidatif bir ajandır. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH) ise sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi ile de membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisi ile proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır (Miyoshi ve ark. 2003).

Birçok mikroorganizmada olduğu gibi fakültatif anaerobik olan LAB'nin gelişme ortamında da yüksek miktarda çözünmüş oksijenin olması hücreleri oksidatif strese sokar. Bu stres bakteri hücrelerinin metabolik iz yolunda değişim ve gen bölgelerinde mutasyon gibi hem moleküler hem metabolik düzeyde birçok hasara yol açar (Guchte ve ark. 2002; Pedersen ve ark. 2012). LAB'nde oksijenin metabolik döngüye girmesi ile gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimler Çizelge 1'de detaylı şekilde verilmiştir. Oksidatif stres oluştuğunda LAB'nde laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesi baskılanır ve NADH oksidaz ve NADH peroksidaz enzim aktivitesi artar.

Çizelge 1. LAB' nde serbest oksijenin metabolik döngüye girmesi ile gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar ve kullanılan katalitik enzimler (Pedersen ve ark. 2012).

Enzimatik Reaksiyonlar	Katalitik Enzimler
$NADH + H^+ + O_2$	NADH: H_2O_2 oksidaz
$2NADH + 2H^+ + O_2$	NADH: H_2O oksidaz
Pirüvat + fosfat + O_2	Pirüvat oksidaz
α - gliserolfosfat + O_2	α -gliserol fosfat oksidaz
$2H^+ + 2 O_2^-$	Süperoksit dismutaz
$NADH + H^+ + H_2O_2$	NADH peroksidaz

Glikolitik döngüde meydana gelen bu değişim LAB'nin gelişimi ve büyümesini baskılayan hatta hücre ölümlerine sebep olabilen H_2O_2 'nin oluşmasına neden olur. H_2O_2 'nin atimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ortamda 0.2mM miktarında H_2O_2 bulunması durumunda bakteri gelişiminin %50 oranında azaldığı, 1.15 mM 'ı aşan miktarlarda

Hemin İlavesinin Laktik Asit Bakterilerinde Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

ise hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir (Duwat ve ark. 2001).

Oksidatif Stres Direnç Mekanizmaları

LAB genetik doğalarında oksidatif stres ile mücadelede çeşitli savunma sistemlerine sahiptir. Bunlardan en önemlileri; NADH oksidaz, NADH peroksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, *recA* geni ve sitokrom oksidaz sistemleridir (Pedersen ve ark. 2012).

Anaerobik koşullarda LAB homofermantatif yolu kullanır ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığı ile glukozu laktik aside indirger. Ortamda oksijen varlığında ise oksidatif strese karşı korunma amacı ile NADH oksidaz aktivitesini artırır. Bu enzim aktivitesindeki artış ile birlikte hücre içerisinde glikolitik döngüde düzenlemeye gidilir ve metabolik iz yol olarak bu sefer heterofermantatif döngü takip edilir. Hücre içindeki serbest O₂ direnç mekanizması bileşeni olan NADH oksidaz enzimi aracılığıyla NADH'ı NAD'a indirgemek için kullanılır ve ara ürün olarak H₂O₂ oluşturulur. Bir diğer savunma elemanı olan NADH peroksidaz enzimi de H₂O₂'yi suya indirgeyerek H₂O₂'nin neden olabileceği toksik etkinin oluşumunu engeller. Bu anlamda ortamdaki NADH/NAD oranı hücre tarafından izlenecek olan glikolitik döngünün yeniden düzenlenmesinde önemlidir (Pedersen ve ark. 2012).

Oksidatif stres anında aktifleşen diğer önemli savunma bileşenleri; süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesidir. Süperoksit dismutaz enzimi; süperoksit serbest radikalının (O₂⁻) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan yapılı bir enzimdir. LAB'nde süperoksit dismutaz aktivitesi oksijen varlığında artış gösterir. Glutatyon peroksidaz enzimi de ortamdaki hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan tetramerik yapıdaki bir enzim olup proteinlerdeki (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları okside olmaktan korur (Miyoshi ve ark. 2003).

LAB yanında, *Escherichia coli* de dahil olmak üzere birçok bakteri hücresinde kodlanmış olan *recA* geni, oksijen varlığında aktifleşir. Normal şartlar altında *lexA* geni ile

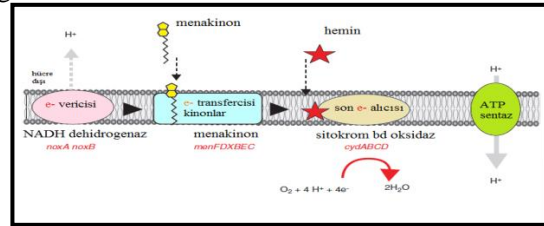
baskılanan *recA* geni, hem oksidatif strete kullanılan savunma sisteminin hem de hücrenin SOS düzenleme sisteminin önemli bir elemanıdır. Herhangi bir DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek daha fazla mutagenез görülmelerini engeller.

Oksidatif stresin tolere edilmesinde LAB'nin sahip olduğu direnç mekanizmaları arasında en etkili olanı sitokrom d oksidaz tarafından kodlanmış *cydA* genidir. Söz konusu bu gen, LAB'nin aerobik solunum yapabilmesinde etkili olan en önemli bileşendir. Birçok LAB sahip olduğu bu gen varlığı sayesinde serbest oksijeni metabolik döngüsünde aktif olarak kullanabilir ve oksidatif stresin neden olabileceği hasarları azaltabilir. *cydA* geni, elektron transfer sisteminde aktif rol alarak son elektron alıcısının oksijen olmasını sağlayarak oksijenin toksik bir bileşen olmasını önler.

LAB *cydA* geninin kodlanması için hemine ihtiyaç duyarlar. Bakteri hücresinde sitokrom d oksidazın aktifleşmesini sağlamak için hemin zorunlu bir kofaktördür. LAB hemin biyosentezini gerçekleştirecek enzimlerden yoksun olduklarından, solunum yapabilmeleri için ortama dışarıdan hemin ilavesi gerekir (Yamamoto ve ark. 2005; Rezaiki ve ark. 2008; Lechardeur ve ark. 2011).

LAB'nin Solunum Yapabilme Yeteneği

Aerobik solunum yapabilen hücrelerde solunum enzimleri diğer bir deyişle elektron transfer sistemi (ETS) elemanlarının bulunması gerekir.



Şekil 1. Solunuma Teşvik Edilmiş LAB'nde Elektron Taşıma Sisteminin Şematik Gösterimi (Pedersen ve ark. 2012).

Prokaryotlarda ETS Şekil 1'de görüldüğü gibi hücre zarında, mezozomda veya sitoplazmada bulunan bir dizi molekülden

Hemin İlavesinin Laktik Asit Bakterilerinde Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

oluşur. Bunlardan ilki elektron vericisi olarak görev yapan NADH dehidrojenazlar, ikincisi aktarılan bu elektronu dehidrojenazlardan son elektron alıcısı olan oksijene taşımakla görevli olan kinonlardır. Üçüncü ETS elemanı ise prostetik grubunda 'hem' proteini içeren son elektron alıcısı olarak görev yapan sitokrom oksidazdır. Sitokrom oksidaz, substrat moleküllerinin dehidrojenazlarca oksidasyonu sonucu ortaya çıkan elektronların son alıcı olan serbest oksijene taşınmasından sorumludur. Mikrozomlar da dahil oksijen kullanabilen canlıların hepsi biyolojik oksidasyon katalizörleri olarak sitokromlara sahiptir (Rezaiki ve ark. 2004). Fermentatif karakteri ile bilinen *Lactococcus lactis*, hemin içeren

aerobik ortamlarda sahip olduğu bu genin varlığı sayesinde solunum yapabilir. Solunum boyunca *cydA* geni, elektron transfer sisteminde aktif rol alır ve son elektron alıcısının oksijen olmasını sağlayarak ATP üretimi gerçekleştirir. *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* ve *Leuconostoc mesenteroides* gibi LAB hemin dışında tüm solunum zinciri elemanlarına sahiptir (Duwat ve ark. 2001; Rezaiki ve ark. 2004). Çizelge 2'de de belirtildiği gibi bazı LAB ise menakinonları sentezleyemediklerinden hemine ek olarak menakinona ilavesine de ihtiyaç duyarlar (Huycke ve ark. 2001; Brooijmans ve ark. 2009).

Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin solunum yapabilme yeteneklerine göre sınıflandırılması (Pedersen ve ark. 2012).

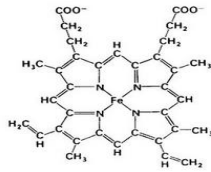
Solunum yapabilmek için sadece hemine ihtiyaç duyanlar	Solunum yapabilmek için hemin ve menakinona birlikte ihtiyaç duyanlar	Solunum yapabilme yeteneği olmayanlar
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Enterococcus italicus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	<i>Streptococcus infantis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>		<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Leuconostoc argentinum</i>	<i>Lactobacillus antri</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	
<i>Leuconostoc kimchii</i>	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Weissella cibaria</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus iners</i>
<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
	<i>Lactobacillus oris</i>	
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	
	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	

Hemin İlavesinin Laktik Asit Bakterilerinde Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Bunlar *menFDXBEC* genlerinden de yoksundur. Gelişme ortamına eklenen menakinonlar lipofilik yapıda olduklarından hücre duvarlarındaki membranlardan kolayca hücre içine geçer ve solunum zincirine dahil edilirler. Hemin bulunan kültür ortamında hücre sitokromlarının aktifleştiği ve elektron transfer sisteminin yapılandırıldığı 1970'lerde bazı laktokok ve enterokoklarda belirlenmiştir (Bryan-Jones ve Whittenbury, 1969; Sijpestejn, 1970; Lan ve ark. 2006; Zhao ve ark. 2013). Bugüne dek yapılan çalışmalar sonunda çoğu LAB'nin (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus species*, *Leuconostoc mesenteriodes*) sadece hemin veya hemin-menakinonun gelişme ortamında bulunduğu, ETS'lerini oluşturduğu ve glikolitik döngü olarak heterofermantatif yolu tercih ederek aerobik solunum yaptıkları belirlenmiştir (Lan ve ark. 2006; Zhao ve ark. 2013).

Heminin Kimyasal Yapısı ve İşlevi

Hemin; 1853 yılında Teichmann tarafından hemoglobinin asit hidrolizi sonucunda kristal formda bulunmuştur (Warburg, 2010). Sitokromlar sahip olduğu demir atomunu ferik oksidasyon durumundan (Fe^{+3}) ferrous oksidasyon durumuna (Fe^{+2}) geçiren bir hem grubu içerir. Söz konusu hem grubu, Şekil 2'de görüldüğü gibi bir karenin köşelerinden tutturulmuş dört azot atomu ve merkezinde bir demir atomundan oluşmuş bir porfirin halkasıdır.



Şekil 2. Hem Grubunun Kimyasal Yapısı

Hemin solunum mekanizmasında redoks tepkimelerinin düzenlenmesinde önemlidir (Mayfield, 2011). Heminin olmadığı oksijenli ortamlarda menakinonlar tarafından ortama salınan elektronların kullanılması ile Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e yükseltgenmesi kolaylaşmakta ve bu

elementlerin hücre içerisine girişi hızlanmaktadır. Benzer şekilde serbest oksijenin (O_2), süperoksit (O_2^-)e yükseltgenmesi ile de istenmeyen reaktif oksijen bileşenleri oluşabilir. Bu noktada solunum zincirinde menakinonların redoks aktivitesindeki önemi fark edilmekte ve heminin riskli radikal grupların oluşumundaki engelleyici etkisi dikkat çekmektedir. Hemin; oksijenli ortamlarda ve sayısız enzimatik reaksiyonda elzem bir bileşen olmasına rağmen serbest formda iken hücreler için toksik özellik gösterebilir. Hücreler bu toksik etkilerden korunabilmek için kendi metabolizmalarında hemin homeostasisini oluşturan sistemler oluşturur (Pedersen ve ark. 2012).

Heminin Hücre İçerisinde Kullanımı

LAB'nde solunum; heminin sitokrom *bd* oksidazlara bağlanması ve hücre içerisinde heminin kullanılmasının koordinasyonu ile gerçekleşir. Hemini sentezleyebilme kabiliyetinden yoksun olan LAB hemini hücre içerisine alabilme ve kullanabilme mekanizmasına sahiptirler. Hücre içi bu düzenleme *Lactococcus lactis*' de *fbuDBAR* operon bölgesinin varlığı ile gerçekleştirilir (Warburg, 2010).

Heminin sitokrom oksidazların membranlarından geçebilmesi ise stres koşullarında sentezlenen şaperon proteinler yardımıyla gerçekleşir (Saarikangas ve Barral, 2016). Normal fizyolojik koşullarda bu proteinlerin görevi; proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak veya doğru katlanmasını sağlamak, ya da ribozomdan gerekli yerlere taşımaktır. Oksijen varlığında ortamda oluşan oksidatif strese tepki olarak hücre hemini yıkıma uğratma yoluna gidebilir. Bunu önlemek amacı ile bir şaperon protein olan *AhpC*, hemine bağlanarak hemini yıkımlanmaktan korur. Bir başka şaperon protein ise *CycCD* kompleksidir. Bu protein kompleksi de sitokrom oksidazdan (*CydAB*) geçerek, *CydAB*-hemin interaksiyonlarını kolaylaştırır (Pedersen ve ark. 2012). Sitoplazma içerisinde heminin parçalanmaması için başka bir şaperon

proteine bağlanmış şekilde bulunması gerekir. *Lactococcus lactis*'de hemin akışını düzenleyen *HrtRBA* olarak kodlanmış gen bölgesi mevcuttur (Sawai ve ark. 2012). Bu gen bölgesi, hücre içerisindeki hemin trafğini düzene sokarak fazla heminin hücre içerisinde birikmesini engeller.

Heminin Hücre Metabolizmasına Etkisi

LAB'nin fermentasyon koşullarında homofermentatif döngü sonucu oluşturduğu laktat, ortamın asitliğini yükseltmesinden ötürü hücre üzerinde güçlü inhibitör etki gösterir. Homofermentatif döngü ile üretilen enerjinin büyük kısmı ortamın alkalizasyonunda kullanıldığından mikrobiyal üremede yüksek biyokütle ağırlığı elde edilemez. Diğer yandan hemin varlığında aerobik ortamda yapılan fermentasyon ile *L. lactis* ortamda laktik asitle beraber asetat, asetoin gibi yan ürünler de oluşturur. Buna paralel olarak da hücre üzerindeki geri inhibisyon etkisi minimize edilmiş olunur ve biyokütle gelişiminde avantaj elde edilir. Bu durum hemin ve oksijenin varlığı ile metabolik döngünün heterofermentatif olarak tekrardan yapılandırılması ile ilgilidir (Nagayasu ve ark. 2007).

Çoğu laktik asit bakterisi hemin içeren kültür ortamlarında geleneksel kültür ortamlarına kıyasla daha fazla ATP üreterek daha fazla biyokütle miktarına ulaşır. Artan biyokütle ağırlığı ile *Lactococcus lactis* tarafından üretilen önemli bir bakteriyosin olan nisinin de üretim veriminin artırılabilmesi mümkün olmuştur (Kördikanlıoğlu ve ark. 2015). Ayrıca heminin varlığı ile hücrelerin fenotip özelliklerinde de gelişmeler gözlenmiştir (Arioli ve ark. 2013; Watanabe ve ark. 2012). Hemin takviyesi yapılmış aerobik koşullarda geliştirilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının starter ve probiyotik kültür üretim safhalarında karşılaşılabilen termal şok, ani basınç değişikliği gibi stres faktörlerine karşı daha dayanıklı oldukları bildirilmiştir. Hemin ile geliştirilen hücrelerde adaptasyon fazında gözlemlenen kısalma dikkati çeken bir başka noktadır (Mayfield ve ark. 2011).

Sonuç

Endüstriyel gıda üretiminde yaygın kullanılan LAB'nin üretim esnasında karşılaştıkları streslere karşı dirençli hale getirilmeleri önemli bir çalışma konusudur. Söz konusu organizmaların solunum yapabilme kabiliyetlerinin doğal yollarla geliştirilmesi ile sıklıkla karşılaşılan oksidatif stres tolere edilebilmektedir. Herhangi bir moleküler modifikasyon gerçekleştirilmeden suşlarda gözlemlenen yüksek enerji üretimine paralel olarak biyokütlede elde edilen artışlar söz konusu bu bakterilerin daha efektif olarak kullanımını sağlayacaktır. Bununla birlikte hücreler tarafından üretilen tat, aroma bileşikleri, depolama ve işlemler esnasında gösterilen stabilite ve bakteriyosin gibi önemli metabolitlerin üretim kinetiğinde gelişmeler sağlanmış olacaktır.

Kaynaklar

- Abriouel H., Herrmann A., Stärke J., Yousif N.M., Wijaya A., Tauscher B., Holzapfel W., Franz C.M. (2004) Cloning and heterologous expression of heme-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228. *Appl Environ Microb.* 70(1):603-6.
- Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M.B., Dedenroth P.D., Pedersen, Dal Bello F., Mora D. (2013) Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:376–380.
- Brooijmans R., Smit B., Santos F., Riel J.V., Vos W., Hugenholtz J. (2009) Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb Cell Factor.* 8:28-30.
- Brooijmans R.J., de Vos W.M., Hugenholtz J. (2009) *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3580–85.
- Bryan-Jones D.G., Whittenbury R. (1969) Haematin-dependent oxidative phosphorylation in *Streptococcus faecalis*. *J. Gen Microb.* 58:247-60.

- Dikici A. (2009) Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları. *Gıda*.4 (3): 59-68.
- Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K. (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and positive its effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* 183:4509-16.
- Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S., Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *A van LeeuwJ Microb.* 82, 187–216.
- Huycke M.M., Moore D., Joyce W., Wise P., Shepard L. (2001) Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethyl menaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microb.* 42:729–40.
- Kördikanlıoğlu B., Şimşek Ö., Saris P.E. (2015) Nisin production of *Lactococcus lactis* N8 with hemin-stimulated cell respiration in fed-batch fermentation system. *Biotechnol Progr.* 31(3):678-85.
- Lan Q.C., Oddone G., Mills A.D., Block E.D., (2006) Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of hemin. *Wiley Inter Science.* 96 (6) :1127-38.
- Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P., Gruss A. (2011) Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotech.* 22:143–149.
- Mayfield J.A., Dehner A., DuBois J.L. (2011) Recent advances in bacterial heme protein biochemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 15(2):260-6.
- Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J.J., Loir Y., Oliveira S.C., Langella P., Azevedo V. (2003) Oxidative stres in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 2 (4): 348-359.
- Nagayasu M., Wardani A.K., Nagahisa K., Shimizu H., Shioya S. (2007) Analysis of hemin effect on lactate reduction in *Lactococcus lactis*. *J Biosci Bioeng.* (6):529-53.
- Papagianni M., Avramidis N. (2012) Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: functional expression of the phosphofructokinase (*pfk*) and alternative oxidase (*aox1*) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditions. *Enzyme Microb Techn.* 51(3): 125–130.
- Pedersen M., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M., Gruss A. (2012) Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu Rev Food Sci Tech.* 3:37-58.
- Rezaiki L., Cesselin B., Yamamoto Y., Vido K. (2004) Respiration metabolism reduces oxidative and acid stres to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 53: 1331-42.
- Rezaiki L., Lamberet G., Derre A., Gruss A., Gaudu P. (2008) *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B *Streptococcus* to activate respiration growth. *Mol. Microb.* 67:947-57.
- Saarikangas J., Barral Y.(2016) Protein aggregation as a mechanism of adaptive cellular responses. *Curr Genet.* (Basım aşamasında).
- Sawai H., Yamanaka M., Sugimoto H., Shiro Y., Aono S. (2012) Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* 287(36): 30755–30768.
- Sijpestejn A.K. (1970) Induction of cytochrome formation and stimulation of oxidative dissimilation by hemin in *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *A van Leeuw.* 36:335-48.
- Şimşek Ö., Akkoç N., Çon A.H., Özçelik F., Saris P.E.J., Akçelik M. (2009) Continuous nisin production with bioengineered *Lactococcus lactis* strains. *J Ind Microbiol Biot.* 36 (6): 863-871.
- Warburg O.H. (2010) The classic: The chemical constitution of respiration ferment. *Clin Orthop Relat Res.* 468(11):2833-9.
- Wardani A.H., Egawa S., Nagahisa K., Shimizu H., Shioya S. (2006) Computational prediction of impact of rerouting the carbon flux in metabolic pathway on cell

- growth and nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biochem Eng J.* 28, 220-230.
- Watanabe M., van der Veen S., Nakajima H., Abee T. (2012) Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiol.*158:293–300.
- Yamamoto Y., Poyart C., Trieu-Cuot P., Lamberet G., Gruss A., Gaudu P. (2005) Respiration metabolism of Group B *Streptococcus* is activated by enviromental haem and quinone and contributes to virulence. *Mol. Microb.* 56:525-34.
- Zhao R., Zheng S., Duan C., Liu F., Yang L., Huo G. (2013) NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis*. *FEBS Open Bio.*19;3:379-86.



Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

Salih AKSAY¹

Abstract

Myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves and berries are consumed in therapeutic diet mainly in Mediterranean basin. In this study effect of water (W), hot water (W60), boiling water (W100) ethanol (E), methanol (M), ethanol/water (EW) and methanol/water (MW) mixture on the extraction of total phenolic content (TPC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of myrtle berries were determined. The highest phenolic content was extracted by EW solvent mixture with 41370 mg/kg on dry basis while the highest ferric reducing antioxidant power was measured on M extract. Fresh or processed myrtle berries can be recommended for diet because of its high phenolic content and ferric reducing antioxidant.

Keywords: Myrtle, *Myrtus communis* L., Total phenolic content (TPC), Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Murt (*Myrtus communis* L.) Meyvesinin Farklı Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan Özellikleri

Özet

Murt (*Myrtus communis* L.) meyvesi ve yaprağı Akdeniz havzası içinde terapötik diyetle tüketilmektedir. Bu çalışmada, üzerine su (W), sıcak su (W60), kaynar su (W100), etanol (E), metanol (M), etanol/su (EW), ve metanol/su (MW) çözümlerinin demir indirgeme antioksidan kapasitesi (FRAP) ve toplam fenolik madde (TPC) ekstraksiyonu üzerine etkisi incelenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde ekstraksiyonu 41370 mg/kg kuru madde olarak EW çözgen karışımında elde edilirken, en yüksek demir indirgeme antioksidan kapasitesi metanol ekstraktında gözlenmiştir. Yüksek fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesine sahip olduğundan murt meyvelerinin taze veya işlenmiş olarak tüketilmesi önerilir.

Anahtar kelimeler: Murt, *Myrtus communis* L., Toplam fenolik madde (TPC), Demir indirgeme antioksidan kapasite (FRAP)

Introduction

Myrtle (*Myrtus communis* L.) is an aromatic medicinal and evergreen shrub belonging to the family of Myrtaceae and is distributed in Mediterranean basin, Asia and America (Karamanoğlu, (1977): Baytop, T. (2013)). Myrtle is known as “Mersin” or “Murt” (1999); Özek et al. (2000); Wannes et al. (2010)). It grows spontaneously throughout the Mediterranean area. Myrtle is an annual endemic plant in the Mediterranean basin and has been used for medicinal purposes and as food and spice since ancient times (Mimica-Dukić et al. (2010); Ghnaya et al. (2013); Yıldırım et al. (2013)). Myrtle is known as “Mersin” or “Murt” (1999); Özek et al. (2000); Wannes et al. (2010)). It grows spontaneously throughout the Turkey (Aydın ve Özcan, (2007)). The plant is

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

traditionally used for treatment of some infections, digestive and bronchial problems, sinusitis, and dry coughs. The leaves have good aromatic, balsamic, hemostatic and tonic properties and are used for flavoring in preparing some foods. The fruit is carminative and is used in the treatment of dysentery, diarrhea, hemorrhoids, internal ulceration, and rheumatism and also to flavor sauces, syrups, etc (Amensour et al. (2009)).

In literature, many studies have indicated that myrtle plant could be used as a source of antioxidant and antibacterial properties. Ghnaya et al. (2013) has reported myrtle was also used as raw material for the cosmetic, pharmaceutical and food industries. Generally, these studies were mainly focused on the Myrtle leaves extracts (Özek et al. (2000); Hayder et al. (2004); Wannes et al. (2010)). The leaves contain tannins, flavonoids such as quercetin, catechin and myricetin derivatives and volatile oils. Myrtle berries are mostly composed of volatile oils, tannins, carbohydrates, flavonoids and organic acids such as citric acid and malic acid. Recently there is a great interest about myrtle fruit in various scientific field (Çakır, (2004); Aydın and Özcan, (2007); Tuberoso, et al. (2010)).

A considerable feature of medicinal and aromatic plants is excellent sources of phenolic compounds. The presence of phenolic compounds (phenolic acids, polyphenols and flavonoids) in plants, besides essential oils, is gaining increasing attention because of their antioxidant activity in food products and in therapeutic treatments (Chryssavgi et al. (2008)). Phenolic compounds might act as reducing substances, blocking free radicals, chelating metal ions, inhibitors of oxidation reaction, inhibitors of the activity of enzymes contributing to free radical creation. In addition, they may reduce reactive oxygen species to more stable forms (Kobus-Cisowska et al. (2013)). Thus antioxidant components like phenolic compounds can delay or inhibit oxidation reaction (Güngör ve Şengül (2008); Thabti et al. (2011)). and extend the shelf-life of food products.

In recent years, the increasing interest for human health, nutrition and the prevention from disease has driven the demand of the consumer to foods and quality raw material with high nutraceutical value (Contessa et al. (2013)). In epidemiological studies, diets rich in fruits and vegetables were correlated positively with reduced risk of heart disease, cancer and other chronic diseases (Koca (2008); Wang and Hu (2011)). It is generally believed that physiological function of fruits may be partly attributed to their antioxidant activity of phenolic compounds.

Antioxidant rich components of foods play a vital role in both food systems as well as in the human body to reduce stress-related diseases such as cancer and cardiovascular diseases. In food systems, retarding lipid peroxidation and formation of secondary lipid peroxidation product can be prevented by the use of nutritional antioxidants thereby helping to maintain flavour, texture, and the colour of the food product during storage. Use of dietary antioxidants has been recognized as potentially effective to promote human health. Dietary antioxidant supplements and functional foods containing antioxidants like a-tocopherol, vitamin C, or plant derived phytochemicals such as phenolics, lycopene, lutein, isoflavones, green tea extract, and grape seed extracts find a huge demand in the current marketplace (Sindhi (2013)).

In the extraction of phenolic compounds that contribute to antioxidant potential ethanol, methanol, acetone, ethyl acetate, water and various combination of these solvents have been used. To increase extraction yield sonication, enzymation, acidification and heating processes have been used. Extraction of phenolic compounds is also influenced by solvent polarity, extraction temperature, extraction time, sample/solvent ratio and sample particle size (Naczka and Shahidi (2006)).

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

Recent researches are generally focused on chemical composition, antioxidative properties of extracts from *Myrtus communis* leaves (Özek et al. (2000); Hayder et al. (2004); Wannas et al. (2010)). However, there is a few number of reports available on the antioxidant properties of myrtle berries antioxidant activity and total phenolic content (Tümen (2012); Yadegarinia (2006)). The aim of this research was to evaluate the antioxidant activity and total phenolic content of different extracts (methanol, ethanol, water, methanol/water, ethanol/water) of *Myrtus communis* L. berries as potential sources of natural antioxidants.

Materials and Methods

Chemicals

All solvents used in the experiments (ethanol and methanol with highest available purity) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Gallic acid, ferrous sulphate, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) and Folin-Ciocalteu's reagent was obtained from Sigma-Aldrich, Fluka (Milan, Italy). Glacial acetic acid, sodium carbonate, ferric chloride, sodium acetate and HCl were supplied by Carlo Erba (Milan, Italy). All chemicals and reagents used in this research were analytical grade.

Myrtle Fruits and Samples Preparation

White myrtle berries were purchased from local market in Mersin, Turkey. The berries were carried to the laboratory and cleaned manually from impurities and dried by a freeze drier (Telstar Crydos -50, Terresa, Spain) at -50 °C condenser temperature for 24 hours and then the berries of myrtle were separated and ground in a grinder.

Dried powders of myrtle berries were extracted with methanol (M), ethanol (E), water(W) and solvent mixtures methanol:water (MW, 50:50 volume ratio), ethanol:water (EW, 50:50 volume ratio). To determine effect of temperature on phenolic extraction, 2 g of dried sample was extracted by 100 ml of hot water at 60 °C (W60) and by 100 mL of boiling water (W100) by using a hot plate. For all extraction, an aliquot (2 g) of dried powder sample was extracted using 100 ml of solvent or solvent mixture (fruits:solvent ratio was 1:50) for 2 hours. All extractions were

replicated two times. At the end of extraction time, extracts were filtered through a filter paper Whatman No. 1 and were stored at 4 °C in the dark until use.

Total Phenolic Content

Total phenolic content was measured according to Velioglu et al. (1998), a method based on a colorimetric oxidation/reduction reaction. Folin-Ciocalteu reagent was used as an oxidizing agent. A 0.2 ml of extract, 1.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 10 times with water) was added. After 5 min, 1.5 ml of Na₂CO₃ (60 g/L) were added. The sample was incubated for 90 min at room temperature. After incubation period the absorbance was read at 725 nm against a blank. For a control sample, 0.2 ml of solvents were used. For quantitative measurements standard calibration curve of gallic acid in methanol was prepared. The mean results of samples analysed were expressed as mg/kg of gallic acid equivalents (GAE) in dry matter.

Ferric reducing antioxidant power

The ferric reducing antioxidant power activity was conducted according to Benzie and Strain (1996) method. Acetate buffer (0.3M, pH 3.6) was prepared by dissolving 40.8 g C₂H₃O₂Na₃H₂O in 1 L of distilled water and pH was adjusted 3.6 by acetic acid. 23.4 mg of TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazine) was dissolved in 7.5 ml of 40 mM HCl for preparing triazine solution. Ferric solution (20 mM) was prepared using FeCl₃·6H₂O. Acetate buffer, TPTZ and ferric solutions at a ratio of 10:1:1 were used for final FRAP reagent. FRAP reagent was prepared freshly and was warmed to 37 °C before use in a water bath. 200 µL of each extract and 1.8 ml of FRAP reagent were mixed and incubated at 37 °C for 10 minutes before measuring the absorbance of the reaction mixture at 593 nm. Aqueous standard solutions of FeSO₄·7H₂O (0-100 ppm) were used for the calibration curve. The results were expressed as ppm FeSO₄·7H₂O.

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

Results and Discussions

Total Phenolic Content

Figure 1 shows the total phenolic contents of myrtle berries as gallic acid equivalent. Extraction of total phenolic from myrtle berries is depended of solvent type and extraction temperature. EW extraction has higher in

phenolic content with 41370 ± 2906 mg/kg than the others while the lowest phenolic content was obtained by water extraction with 17763 ± 3064 and 18174 ± 2422 mg/kg dry basis at 60°C and ambient temperature, respectively. While M and MW extracts have similar phenolic content about 38000 mg/kg.

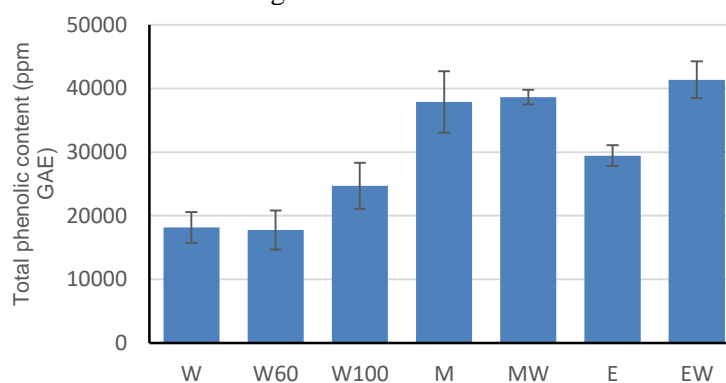


Figure 1. Total phenolic content of myrtle extracts (W:Water, W60: Water at 60°C , W100:Boiling water, M:Methanol, MW:Methanol/Water E:Ethanol, EW:Etahnol/Water).

Tuberoso et al. (2010). reported that the highest dry matter content (99 g/L) and total phenolic obtained by ethanol extract compare to water and ethyl acetate. Amensour et al. (2009) has found that berry extracts had been showed higher phenolic content in methanol>ethanol>water extracts. Phenolic content of While MW and EW solvent mixtures had similar phenolic content EW was slightly higher than MW. EW can be recommended for extraction of phenolic substances from myrtle berries.

EW extract have higher phenolic content than the phenolic content of myrtle leaf methanol extract with 33670 mg/kg dry leaves (Wannes et al. 2010). Phenolic content of EW extract of myrtle berries on dry basis is pretty much with compare to berry fruits like blackberry (4170-5550 mg/kg) and chocoberry (6625-6900 mg/kg) (Szajdek and Borowsk (2008)) and some astringent fruits like pomegranate (Tezcan et al. (2009)) and persimmon (Akyıldız et al. (2008)) with 2602-10086 mg/L and 467-7332 mg/kg phenolic content respectively.

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

Ferric Reducing Antioxidant Power

Ferric reducing antioxidant power of different myrtle extracts are shown in Figure 2. The highest antioxidant potentials were obtained M, MW and EW extracts of myrtle about

175x10³ mg/kg. The lowest antioxidant potential was obtained by W60 extract and W at ambient temperature. W100 extract had higher ferric reducing power than W and W60 but lower than E, EW, M and MW extracts.

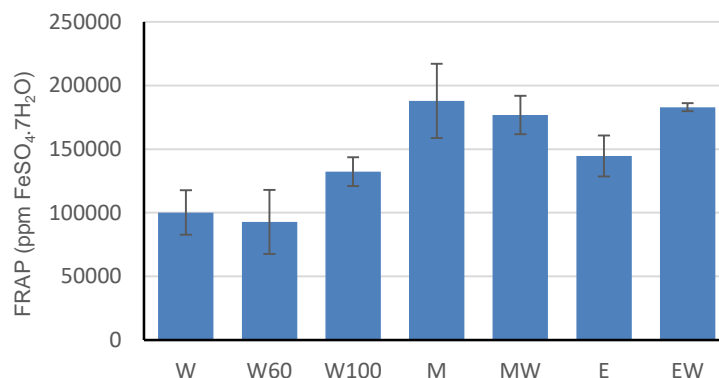


Figure 2. Ferric reducing antioxidant power of myrtle extracts (W:Water, W60: Water at 60 °C, W100:Boiling water, M:Methanol, MW:Methanol/Water E:Ethanol, EW:Etahnol/Water).

Figure 3. shows that there was a good correlation (R², 0,826) between phenolic content and antioxidant activity. While the highest phenolic content was obtained by EW extract, the highest antioxidant potential was extracted by M extract. Amensour et al. (2009) has reported similar results that methanol extracts of myrtle leaf had higher antioxidant activity than water and ethanol extracts. The ferric reducing power is

strongly contributed to the structure of phenolic constituents such as condensed tannins, anthocyanins and flavonoids (Juranic and Zizak (2005)). It is recommended to measure antioxidant potential by two or more methods such as free radical scavenging (DPPH) or Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) additional to ferric reducing antioxidant power (FRAP).

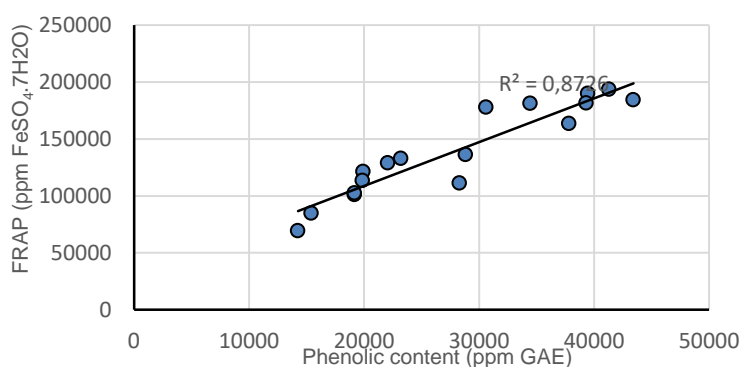


Figure 3. Correlation between total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of myrtle extracts.

Conclusion

Myrtle berries are good source of phenolic compounds with reasonable ferric reducing antioxidant power compare to other berry fruits and stringent fruits. The highest phenolic content was obtained by solvent mixture of ethanol and water while the highest ferric reducing antioxidant power was measured in methanol extract of myrtle berries. Total phenolic content

and FRAP values showed a good correlation but it is recommended to determine the structure of berry phenolics and to measure antioxidant potential by other methods. Because of its high phenolic content and ferric reducing antioxidant power fresh or processed myrtle berries can be recommended for diet. Myrtle berries can be a good source of phenolic rich constituents or enrichment additives for foods.

References

- Akyıldız, A.; Zorlugenç, F.; Benli, H.; Aksay, S.; Fenercioglu, H. (2008) Changes in Color and Total Phenolic Content of Different Cultivars of Persimmon During Dehydration. *International Journal of Food Engineering*, 4(7)1-14.
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid S., Perez-alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J. (2009) Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Myrtle (*Myrtus Communis*) Extracts. *Natural Product Communications* 4:819-824.
- Aydın, C., Özcan, M. M. (2007) Determination of Nutritional and Physical Properties of Myrtle(*Myrtus Communis* L.) Fruits Growing Wild in Turkey. *Journal of Food Engineering* 79:453–458.
- Baytop, T. (1999) Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., 2. Baskı. İstanbul.
- Benzie, I. F.F., Strain J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (Frap) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Michael, K. (2008) Essential Oil Composition of Pistacia Lentiscus L. and *Myrtus Communis* L.: Evaluation of Antioxidant Capacity of Methanolic Extracts. *Food Chemistry* 107:1120–113.
- Contessa, C., Mellano, M.G., Beccaro, G.L., Giusiano, A., Botta, R. (2013) Total Antioxidant Capacity and Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Fruit Species Grown in Northwest Italy. *Scientia Horticulturae* 160:351–357.
- Çakır, A. (2004) Essential Oil and Fatty Acid Composition of the Fruits of *Hippophae Rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus Communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 32:809-816.
- Ghnaya, A.B., Chograni, H., Messoud C., Boussaid, M. (2013) Comparative Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Myrtus Communis* L. Essential Oils Isolated from Tunisian and Algerian Population. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4(7)1-5.
- Güngör, N., Şengül, M. (2008) Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Selected Physicochemical Properties of White Mulberry (*Morus Alba* L.) Fruits. *International Journal of Food Properties*, 11: 44–52.
- Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2004) Anti-Genotoxic and Free-Radical Scavenging Activities of Extracts from (Tunisian) *Myrtus Communis*. *Mutation*

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 564:89–95.

- Juranic, Z., Zizak, Z. (2005) Biological Activities of Berries: From Antioxidant Capacity to Anti-Cancer Effects. *BioFactors* 23:207–211.
- Karamanoğlu, K. (1977) *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniv. Ecz. Fak.,Yay. No:4, Ankara.
- Kobus-Cisowska, J., Gramza-Michalowska, A., Kmiecik, D., Flaczyk, E., Korczak, J. (2013) Mulberry Fruit as an Antioxidant Component in Muesli. *Agricultural Sciences* 4:130-135.
- Koca, İ., Üstün, N.S., Koca, A.F., Karadeniz, B. (2008) Chemical Composition, Antioxidant Activity and Anthocyanin Profiles of Purple Mulberry (*Morus Rubra*) Fruits. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6:39-42.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbovic, S., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B., Orcic, D., Jovin, E., Couladis, M. (2010) Essential Oil of *Myrtus Communis* L. as a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents. *Molecules*, 15:2759-2770.
- Naczka, M. and Shahidi, F. (2006) Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1523–1542.
- Özek, T., Demirci, B., Baser, K. H.C. (2000) Chemical Composition of Turkish Myrtle Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 541-544.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N. (2013) Potential Applications of Antioxidants. *Journal of Pharmacy Research*, 7:828-835.
- Szajdek, A., Borowski, E.J. (2008) Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63:147–156.
- Tezcan, F., Özgüven, M.G., Diken T., Özçelik, B. Erim, F.B. (2009) Antioxidant Activity and Total Phenolic, Organic Acid and Sugar Content in Commercial Pomegranate Juices. *Food Chemistry* 115:873–877.
- Thabti, I., Marzougui, N., Elfalleh, W., Ferchichi, A. (2011) Antioxidant Composition and Antioxidant Activity of White (*Morus Alba* L.), Black (*Morus Nigra* L.) and Red (*Morus Rubra* L.) Mulberry Leaves. *Acta Botanica Gallica*, 158:205-214.
- Tuberoso, C.I.G., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M.P., Atzeri, A., Pirisi, F.M., Dessi, M.A. (2010) Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Myrtus Communis* L. Berries Extracts. *Food Chemistry* 123:1242-1251.
- Tümen, İ., Şenol, F.S., Orhan, İ.E. (2012) Inhibitory Potential of the Leaves and Berries of *Myrtus Communis* L. (Myrtle) Against Enzymes Linked to Neurodegenerative Diseases and Their Antioxidant Actions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63:387-392.
- Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah D. (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46:4113-4117.
- Wang, R.J., and Hu, M.L. (2011) Antioxidant Capacities of Fruit Extracts of Five Mulberry Genotypes with Different Assays and Principle Components Analysis. *International Journal of Food Properties*, 14:1–8.

Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries

- Wannes, W.A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B. (2010) Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts from Myrtle (*Myrtus Communis* Var. *Italica* L.) Leaf, Stem and Flower. *Food and Chemical Toxicology* 48:1362–1370.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2006) Biochemical Activities of Iranian *Mentha Piperita* L. and *Myrtus Communis* L. *Essential Oils. Phytochemistry*, 67:1249-1255.
- Yıldırım, H., Kargı, S.P., Karabıyık, Ş. (2013) Adana ve Mersin Ekolojik Koşullarında Doğal Olarak Yetişen Mersin (*Myrtus Communis* L.) Bitkileri Üzerinde Bir Araştırma. *Alatarım*, 12:1-9.



Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanılanması*

Abdulkadir BOZDOĞAN⁽¹⁾

Nüket ÖNELGE⁽²⁾

Özet

Bu çalışmada Turunçgil sarı damar açılması virüs (TSDAV) hastalığı; hastalık belirtilerinin gözlenebildiği limon ve turunç türleri ile belirtilerin görülmediği portakal, mandarin ve altıntop türlerinden alınan bitki dokularının, moleküler yöntemle (RT-PCR) varlığı araştırılmış; TSDAV hastalığı belirtilerini göstermeyen portakal, mandarin ve altıntop türlerinden alınan bitki dokuları ile, turunç bitkisine biyolojik indeksleme yapılarak hastalığın bu türlerdeki belirtileri ortaya konmaya çalışılmış ayrıca etmenin limon ve turunç meyve kabukları ile çiçeklerinde varlığı araştırılmış; elde edilen PCR ürününün nükleotid dizilimi belirlenerek etmenin filogenetik olarak diğer virüslerle akrabalığı belirlenmeye çalışılmıştır. RT-PCR işlemi sonucunda limon, turunç, portakal, mandarin ve altıntop türlerine ait yaprak ve sürgün örneklerinin tümünde ve meyve kabuğu ile çiçek örneklerinin tümünde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Tohum örneklerinin tümünde negatif sonuçlar elde edilmiştir. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin Pakistan, Çin Halk Cumhuriyeti ve ülkemizde daha önce limon örneklerinden yapılan etmen analizleri ile %97'nin üzerinde bir benzerlik gösterdiği belirlenmiş ayrıca farklı turunçgil türlerinin birbirileri ile olan benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu ortaya konmuş ve etmenin *Mandarivirus* cinsi içinde yer aldığı belirlenmiştir. Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda aşılama çalışmalarının yapıldığı tüm turunç indikatör bitkilerinde TSDAV hastalığının karakteristik belirtileri gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Turunçgil, TSDAV hastalığı, CYYCV, RT-PCR, indikatör bitki, *Mandarivirus*.

Identification of *Citrus Yellow Clearing Virus Disease Virus* (CYVCV) by Molecularly on Different Citrus Species

Abstract

In this study, the *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV) disease, first observed in Pakistan and India and then in our country is researched among the species of *Citrus* such as orange, mandarin and grapefruit which don't show the characteristic symptoms of the disease. Also, the CYVCV found in the fruit and flower of lemon and sour orange is researched in this study. In the researched of the CYVCV, molecular RT-PCR method and biological indexing method to justify the obtained findings are used. As a result of the study, in all of the examples of leaves and exile belonging to the species of lemon, sour orange, orange, mandarin and grapefruit, the existence of the virus on these species are identified by obtaining a band in the length of 479 bp and 921 bp. The existence of the disease on the species of orange, mandarin and grapefruit is first determined in this study. In the studies done by rind of fruit and flower tissue the existence of the virus on these tissues is determined. In all examples of seed it is identified as molecular that the disease factor of negative result doesn't exist in seed. As a result of the nucleotide analyses and phylogenetic studies it is identified that the examples taken from different *Citrus* species and analyses done previously on lemon examples showed up 97% similarly in Pakistan, China and in our country. During biological index studies, leaf deformations, pocket image of inward and outward on leaf tissues, recess in the shape of V in the edge of leaf, banding and yellow color fading on the main and edge veins of the leaf, gondol leaf, shape of wet water on the back side of the leaves are identified.

Keywords: *Citrus*, TSDAV disease, CYYCV, RT-PCR, indicator plant, *Mandarivirus*.

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 21.11.2016

*Yüksek Lisans Tezi

(1) T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İmamoğlu Tarım İlçe Müdürlüğü, İmamoğlu/ADANA

(2) Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sarıçam/ADANA

Giriş

Dünyada turunçgil üretimi yapılan bölgelerin tümünde, virüs, viroid ve virüs benzeri hastalıklar yaygın olarak bulunmaktadır. Virüs hastalıkları; ağaçlarda büyümenin yavaşlamasına, verim ve meyve kalitesinde büyük ölçüde düşüşe, ağaçlarda ekonomik ömrün azalmasına yol açmakta ve şiddetli hastalık durumlarında da ağaçların ölmesine neden olmaktadır. Dünyada şu ana kadar turunçgiller ile ilgili yaklaşık 70 farklı virüs, viroid ve virüs benzeri hastalık etmeni tespit edilmiştir. Çınar ve arkadaşlarının (1993) yapmış oldukları çalışmaya göre ülkemiz turunçgil yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına neden olan toplam 16 adet virüs, viroid ve virüs benzeri hastalık etmeni bulunmaktadır.

TSDAV hastalığı dünyada ilk kez Pakistan'da tespit edildikten (Catara ve ark., 1988) sonra, Hindistan'da (Ahlawat, 1997), Türkiye'de (Önelge, 2003) ve son olarak da Çin'de (Zhao ve ark., 2014) turunçgil yetiştiriciliği yapılan alanlarda limon ve Etrog citron'da rapor edilmiştir.

TSDAV etmeni Tymovirales takımı, *Alphaflexiviridae* familyası, *Mandarinivirus* cinsine dahil olan bir virüstür. Etmen 7.529 nükleotid uzunluğunda, esnek-ipliksi yapıda, tek sarmal +RNA genomuna sahiptir (Loconsole ve ark., 2013).

TSDAV hastalığı genel olarak limon (*C. limon*) ağaçlarında gözlenmektedir. Bitkide belirtiler; yapraklarda buruşukluk, sarı renklenmeler, ana ve yan damarlarda uzunlamasına renk açılmaları, yaprakta ve kenarlarında değişen şiddette kıvrılmalar, yaprağın alt kısmında damarlar boyunca hafif kahverengileşme ve yaprak boyutunda küçülme, meyve büyüklüğünde %50 oranında küçülme şeklindedir (Önelge, 2003). Bu duruma benzer belirtiler turunç (*C. aurantium*) bitkilerinde de gözlenmektedir (Önelge ve ark., 2007).

TSDAV hastalığının varlığı elektron mikroskopu, dsRNA analizi, RT-PCR analizi, Western blot analizi ve biyolojik indeksleme yöntemleri ile ortaya konulmuştur. RT-PCR yöntemi ise hastalığın rutin tanısında

kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Loconsole ve ark., 2013).

Bu çalışmada, dünyada ilk kez Pakistan ve Hindistan'da, ardından ülkemizde Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği turunçgil parselinde, limon ve turunçlarda gözlenen TSDAV hastalığı etmeninin, hastalık belirtilerinin gözlenebildiği limon ve turunç türleri ile belirtilerin görülmediği portakal, mandarin ve altıntop türlerindeki varlığı, RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. TSDAV hastalığı belirtilerini göstermeyen portakal, mandarin ve altıntop türlerinden alınan bitki dokuları ile turunç bitkisine biyolojik indeksleme yapılarak hastalığın bu türlerdeki belirtileri ortaya konulmaya çalışılmış; ayrıca etmenin limon ve turunç meyve kabukları ile çiçeklerinde varlığı araştırılmıştır. Belirtilen ve göstermeyen turunçgil türlerinden RT-PCR yöntemi sonucunda elde edilen cDNA'lardan nükleotid dizilim analizleri gerçekleştirilerek etmen moleküler olarak da araştırılmıştır. Nükleotid dizimleri NCBI veri tabanından elde edilen verilerle karşılaştırılarak etmenin farklı turunçgil türlerindeki soy ağacı belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bitkisel Materyaller

Araştırma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği turunçgil koleksiyonu parsellerinde, Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarı, bölüme ait araştırma seraları ve iklimlendirme odasında yürütülmüştür.

Araştırmalar için kullanılan bitkiler Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği turunçgil parsellerinden toplanan portakal, mandarin, altıntop, limon ve turunç bitkilerine ait örnekler olmuştur. TSDAV hastalığı limon ve turunç bitkilerinde belirtiler göstermekte, portakal, altıntop ve mandarin bitkilerinde ise bir belirtiler oluşumu göstermemektedir. Araştırma parselinde bulunan, belirtiler gösteren 10'ar adet limon ve turunç ağaçları ile belirtiler göstermeyen ancak hastalığın varlığından şüphelenilen 10'ar adet portakal, altıntop ve mandarin ağaçlarından toplanan

Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanınması

yaprak, genç sürgün, çiçek ve meyve örnekleri toplandıktan sonra numaralandırılarak buz kutusu içinde bölüm laboratuvarına getirilmiştir.

Biyolojik Tanı Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

Araziden limon, turunç, portakal, altıntop ve mandarin türlerinden 3'er adet ağaçtan bitki örnekleri alınmış, her bir ağacın örneği tohumdan yetiştirilmiş olan 3'er adet turunç indikatör bitkisine aşılanarak aktarılmıştır. Aşılama işleminde bitki dokularının çıkarılması için sterilize edilmiş bisturi ve aşı bıçağı kullanılmıştır.

Total RNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyaller

TSDAV hastalığının moleküler düzeyde araştırılması amacıyla Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği turunçgil parsellerinden alınan limon, turunç, portakal, altıntop ve mandarin bitkilerine ait yaprak, genç sürgün, çiçek ve meyve örnekleri RNA ekstraksiyonunun materyalini oluşturmuştur.

Yöntem

Biyolojik Tanı Çalışmaları

Biyolojik indekisleme çalışmalarında göz ve kabuk dokularından yararlanılmıştır. Belirlenen her turunçgil türünden 3'er örneğin aşılandığı, her tür için toplam 9 turunç fidanı aşılama işleminden sonra tekrar sera koşullarına alınarak semptom gelişimleri takip edilmiştir. 3 adet turunç fidanı ise bir işlem yapılmaksızın negatif kontrol olarak bırakılmıştır.

Biyolojik indekisleme çalışmalarında etmenin bulaşık ağaçlarda oluşturduğu damar bantlaşması semptomu, yaprak deformasyonları, yaprağın alt yüzeylerinde su emgisi şeklinde beliren lekeler, hastalık etmeni belirtisi olarak değerlendirilmiştir.

Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu Çalışmaları

CTAB temelli total nükleik asit ekstraksiyonu için Murray ve Thompson'un (1980) tanımladığı yöntem kullanılmıştır. Çalışmalar Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvarında yürütülmüştür.

RT-PCR Çalışmaları

RT-PCR; total RNA çalışması sonucunda elde edilen virüs nükleik asidi üzerindeki belirli bölgelerin, spesifik primerler kullanarak uygun koşullarda çoğaltılması, böylelikle TSDAV'nin moleküler tanısı amacı ile yapılmıştır.

Bu çalışmada Loconsole ve ark. (2013) tarafından belirlenen primerler kullanılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve tanılama bölgeleri ise Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. TSDAV için RT-PCR çalışmalarında

	Primer	PCR Ürün Boyu (bp)
Genom Sıralama		
7081fw 7560rev	ACCTCACGATGGACCACGTT CAGAAAATGGAAACTGAAAGCCTG	479
Algılama		
1fw 921rev	GAAAAGCAAACAGTAACAAACACACCC GGGCAAGAGCATTGGGTATCT	921
391fw 449rev	CGAATCCGCTGCGAGCTA GGGAGTGCTTGGACAGGAGAT	59

kullanılan primerler.

Sekans Analizleri ve Verilerin Karşılaştırılması

RT-PCR ve agaroz jel elektroforezi sonucunda bulaşık bulunan örnekler, saflaştırma ve nükleotid dizilimlerinin belirlenmesi amacı ile Adana ilindeki "Molgentek" firmasına gönderilmiştir.

Sekanslama işlemleri tamamlanan bulaşık örneklerin baz dizilimleri "Finch TV" programı aracılığıyla görüntülenip, NCBI gen bankasında yer alan bazı verilerle "BLAST" yönteminde karşılaştırılmıştır.

Yapılan filogenetik analiz çalışmalarında bulaşık örneklere ait DNA dizileri, "Mega 6" programı ile "Neighbour Joining" yönteminde sınıflandırılmıştır.

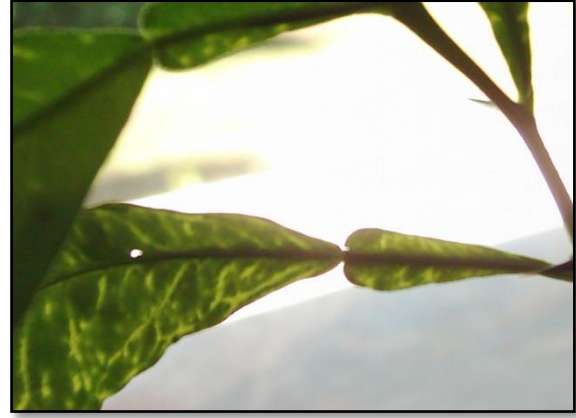
Bulgular ve Tartışma
TSDAV Hastalığının Biyolojik
İndeksleme Yöntemi ile Tanınmasına Ait
Bulgular

Göz dokusu ve kabuk dokusu olarak gerçekleştirilen aşılama çalışmalarının yapıldığı bütün turunç indikatör bitkilerinde, TSDAV hastalığının karakteristik belirtileri olan yaprak kenarlarında kıvrılmalar şeklinde gelişen düzensiz deformasyonlar (Şekil 1) ile yaprak ana ve yan damarlarında, hastalığın ismini aldığı çizgi halindeki sarı renk açılmaları gözlemlenmiştir.

Bu renk açılmalarının tüm damar boyunca uzunlamasına ilerlediği (Şekil 2) ve bazen de yapraklarda kesik kesik bantlaşma geliştiği gözlemlenmiştir. Yapraklarda dışa ve içe doğru cep oluşumu, gondol şeklinde yaprak oluşumu gibi yaprak deformasyonlarını tüm turunçgil çeşitlerinden alınan örnekler geliştirmiştir. Yaprak kenarlarında "V" şeklinde girinti oluşumu ve yaprak arka damarlarında su emgisi şeklinde ıslak görünüm, indeksleme sonucunda gözlenen bazı belirtilerden olmuştur. Kontrol bitkileri olan tohumdan yetişmiş sağlıklı turunç fidanlarında ise herhangi bir TSDAV hastalık belirtimine rastlanılmamıştır.



Şekil 1. TSDAV hastalığı etmeninin, biyolojik indeksleme sonucunda turunç yaprak kenarlarında oluşturduğu kıvrılmalar şeklinde gelişen düzensiz deformasyonlar.



Şekil 2. TSDAV hastalığı etmeninin, biyolojik indeksleme sonucunda turunç bitkisinin yapraklarında ana ve yan damarlarda oluşturduğu çizgi halinde sarı renk açılmaları.

TSDAV hastalığı etmeninin turunç çöğürlerinde geliştirdiği bazı belirtiler, bölgemizde yaygın olarak bulunan Turunçgil klorotik cüceleşme virüsü (TKCV) ile benzerdir. Her iki hastalık da turunç yapraklarında yaprak deformasyonlarına neden olmakta ancak TSDAV hastalığı damarlar üzerinde sarı renkli bantlaşma geliştirirken TKCV hastalığı turunç yapraklarında özellikle orta damar çevresinde, düzensiz klorotik lekeler ve beneklemeler geliştirmektedir. Her iki hastalıkta turunç yapraklarında "V" şeklinde girintiler ve yaprak arka damarında su emgisi şeklinde gelişen lekelenmeler geliştirmektedir. Gondol yaprak oluşumu her iki hastalık içinde karakteristiktir. Hastalık belirtileri arazi şartlarında zaman zaman karışmakla birlikte, yapılan çalışmalarda (Korkmaz, 1997) TKCV hastalığının portakal, altıntop ve mandarin ağaçlarında da belirtiyi oluşturduğu bu çalışmada ortaya konduğu gibi, TSDAV hastalığının bu çeşitlerde latent kaldığı ancak turunç gibi duyarlı bir indikatör bitkiye aktarıldığında belirtilerini geliştirebildiği belirlenmiştir.

Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanınması

RT-PCR Çalışmaları ile İlgili Bulgular

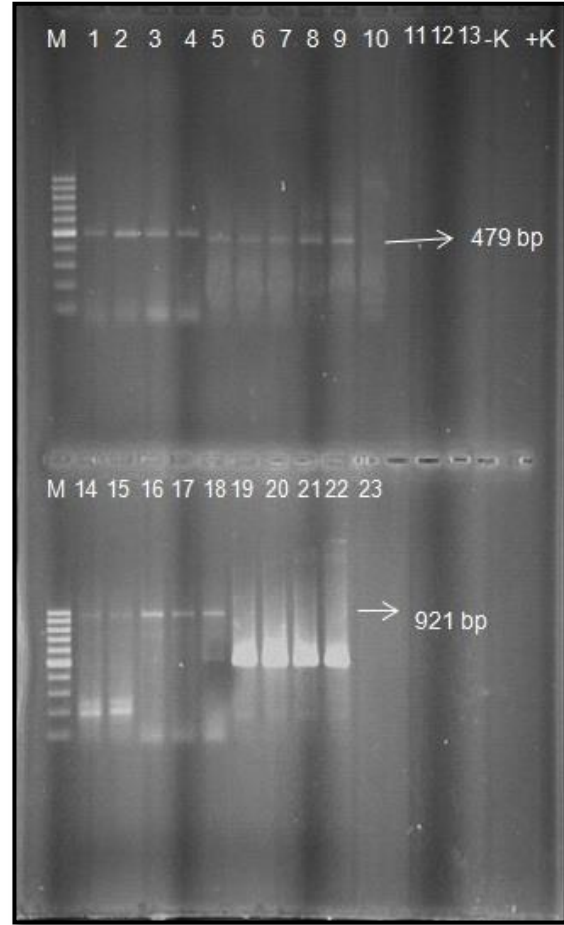
RT-PCR çalışmalarında 7081fw/7560rev primer çifti ile çoğaltılan tüm örneklerde 479 bp'lik bant oluşumu gözlemlenmiştir. 391fw/449rev primer çifti ile çoğaltılan tüm örneklerde 59 bp'lik bant oluşumu gözlenirken 1fw/921rev primer çifti ile 921 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Her üç primer çiftiyle çoğaltılan tüm örneklerde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiş ve örnekler TSDAV ile bulaşık olarak kabul edilmiştir (Çizelge 2).

İzolat ve Sayı	Primer Çifti		
	7081fw/ 7560rev (479 bp)	391fw/ 449rev (59 bp)	1fw/ 921rev (921 bp)
Limon (10)	+	+	+
Turunç (10)	+	+	+
Portakal (10)	+	+	+
Mandarin (10)	+	+	+
Altıntop (10)	+	+	+
Çiçek (5)	+	+	+
Meyve Kabuğu (5)	+	+	+
Tohum (5)	-	-	-
Negatif Kontrol (5)	-	-	-

Çizelge 2. RT-PCR çalışmaları ile elde edilen cDNA'ların, agaroz jel elektroforez işlemi sonucu oluşan görüntülerdeki bant oluşumu.

RT-PCR çalışmaları sonucunda TSDAV hastalığının farklı turunçgil türlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 3'te yer almaktadır.

Bu çalışmada, Ç.Ü. turunçgil parseline yapraklarında simptom bulunan limon ve turunç ağaçlarından alınan bitki örnekleri ile yapılan RT-PCR çalışmalarında, örnek alınan ağaçların tamamının TSDAV etmeni ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Herhangi bir yaprak simptomu gözlemlenmeyen portakal, mandarin ve altıntop ağaçlarından alınan örneklerle gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları sonucunda da, örnek alınan ağaçların TSDAV etmeni ile bulaşık olduğu ve 479 bp'da virüs bantlarının mevcut olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. Altıntop ve limon örneklerine ait jel görüntüsü. %1,5'lük agar jelde 479 bp ve 921 bp primerleri ile altıntop ve limon örneklerinde TSDAV'ne ait bant oluşumları. 1-10 portakal örnekleri, 14-22 altıntop örnekleri, M: Markör.

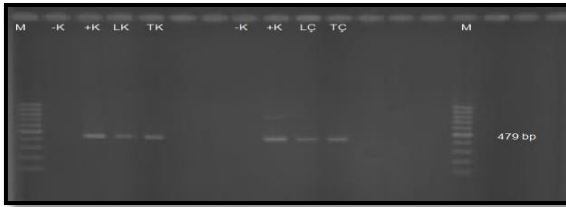
Çalışma sonucunda TSDAV'nün limon ve turunç ağaçlarında simptom oluşturduğu, ancak portakal, mandarin ve altıntop ağaçlarında latent olarak bulunduğu ortaya konulmuştur.

Loconsole ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada, etmenin moleküler yapısını tamamen ortaya koymuş ve RT-PCR ile farklı primerler kullanarak etmenin tanısını gerçekleştirmiştir. Primer çiftleri ile yürütülen

Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanınması

bu çalışma da Loconsole ve ark.'nın sonuçları ile uyumludur. Her iki çalışmada kullanılan primer çiftleri ile, virüsün manto protein yapısı moleküler olarak tanımlanmıştır. Çin'de Zhao ve ark. (2014) tarafından yürütülen çalışmada da bu çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiş ve TSDAV hastalığı RT-PCR çalışmaları ile aynı primer çiftleri kullanılıp moleküler olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada TSDAV ile enfekteli limon ve turunç ağaçlarından alınan meyve kabuğu ve çiçek örnekleri de RT-PCR yöntemi ile virüs açısından araştırılmıştır. Çalışma sonucunda (Şekil 4) enfekteli limon ve turunç ağaçlarından alınan meyve kabuğu ve çiçek örneklerinin, virüs etmeni tanısı bakımından kullanılabileceği ve bu dokuların TSDAV ile enfekteli olduğu elirlenmiştir. Bu dokulardaki virüs varlığı ilk olarak bu çalışma ile ortaya konulmuştur. RT-PCR çalışmalarında kullanılan üç primer çifti de pozitif sonuç vermiştir. Ancak bu primer çiftlerinden 59 bp olan çift, jel üzerinde primer kalıntısı gibi görüntü oluşturmuştur. Bu nedenle 479 bp ve 921 bp primer çiftlerinin daha ayırıcı özellikte olduğu belirlenmiştir.

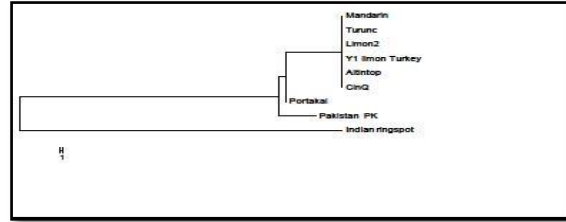


Şekil 4. Limon ve turunç bitkisine ait meyve kabuğu ve çiçek doku örnekleri ile yapılan RT-PCR sonucu elde edilmiş 479 bp DNA'ların jel görüntüsü. M: Markör, LK: Limon meyvesi kabuğu, TK: Turunç meyvesi kabuğu, LÇ: Limon çiçeği, TÇ: Turunç çiçeği, -K: Negatif kontrol, +K: Pozitif kontrol.

Yürütülen bu çalışmada tohum ve negatif kontrol örnekleri, her üç primer çiftinde de bant oluşumu göstermemiştir. Daha önce Gök (2010) tarafından yapılan çalışmada, TSDAV'ünün tohum ile taşınmadığı belirlenmiştir. Tohum örneklerinin bir bant oluşumu göstermemesi, TSDAV etmeninin tohuma geçmemesinden kaynaklanmaktadır.

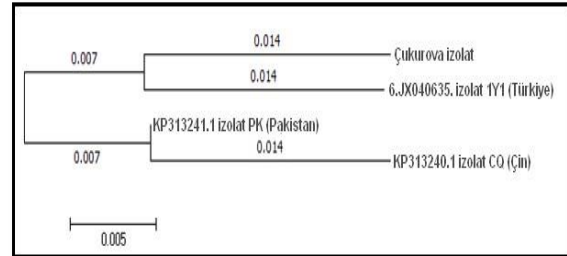
Nükleotid Dizilimi ve Filogenetik Analiz ile İlgili Bulgular

Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin Pakistan, Çin Halk Cumhuriyeti ve ülkemizde daha önce limon örneklerinden yapılan etmen analizleri ile %97'inin üzerinde bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin Pakistan, Çin Halk Cumhuriyeti ve ülkemizde daha önce limon örneklerinden yapılan etmen analizleri ile kıyaslanması.

Çalışmada farklı turunçgil türlerinin birbirleriyle olan benzerliğinin %98'in üzerinde olduğu da ortaya konulmuştur (Şekil 6).



Şekil 6. Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin birbirleriyle karşılaştırılması.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Loconsole ve ark. (2013) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyum içerisindedir. Araştırmacılar saflaştırılmış viral RNA'ları ve 7081fw/7560rev primer çifti ile 391fw/449rev primer çiftini kullanarak yaptıkları RT-PCR çalışmasında, TSDAV etmeninin varlığını saptamışlar ve sırasıyla 479 bp'lik ve

Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanınması

59 bp'lik bantları gözlemlenmişlerdir. Yine bu çalışmada yapılan nükleotid dizilimi ve filogenetik analizler ile ilgili sonuçlar, aynı araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermiş ve TSDAV etmeninin, ICRSV (*Indian citrus ring spot mandarivirus*) ile filogenetik olarak aynı şubede yer aldığını belirlemiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ayrıca Zhen ve ark. (2015) tarafından bildirilen araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Araştırmacılar saflaştırılmış olan viral RNA'ları ve spesifik CY27SF/CY25TR primer çiftini kullanarak yapmış oldukları RT-PCR işlemi sonucunda TSDAV'ün varlığını saptamışlar ve yapılan filogenetik analiz çalışması sonucunda da örneklerinin, Türkiye kaynaklı bir ırk olan CYVCV-Y1 ırkı ile %97.1 oranında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Sonuçlar

Farklı turunçgil türlerinden göz dokusu ve kabuk dokusu olarak gerçekleştirilen aşılama çalışmalarının yapıldığı tüm turunç indikatör bitkilerinde, TSDAV hastalığının karakteristik semptomları belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışma arazi koşullarında herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen, limon ve turunç ağaçlarında görülen yaprak damarlarının bantlaşması, yaprak yapısının deformasyonu gibi semptomlar oluşturmayan portakal, mandarin ve altıntop ağaçlarından turunç çöğürlerinde geliştirdiği hastalık etmeni belirtileri, bu ağaçların hastalığın semptomsuz (latent) taşıyıcısı olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur.

TSDAV hastalık etmenini moleküler olarak tanılama çalışmalarında mevcut etmen limon, turunç, mandarin, portakal, altıntop ağaçlarından izole edilmiş ve RT-PCR yöntemi ile bu ağaçların bulaşık olduğu ortaya konulmuştur.

Limon ve turunç meyve kabuklarından ve çiçeklerinden yapılan tanılamalarda pozitif sonuçlar elde edilmiş, etmenin bu kısımlardaki varlığı da ortaya konmuştur.

Nükleotid dizilim analizleri ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan örneklerin, Pakistan, Çin Halk Cumhuriyeti ve ülkemizde daha önce limon örneklerinden yapılan etmen analizleri ile %97'inin üzerinde bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca farklı turunçgil türlerinin birbirileri ile olan benzerliklerinin %98'in üzerinde olduğu da ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

- Ahlawat, Y. S. (1997) Virus, greening bacterium and viroids associated with citrus (Citrus species) decline in India. *Indian J. Agric. Sci.* 67:51-57.
- Catara, A., Azzaro, A., Moghal, S. M. and Khan, D. A. (1988) Virus, viroid and prokaryotic diseases of *Citrus* in Pakistan. *Proc. 6th. Int. Citrus Congr.* 3:957-963.
- Çınar, A., Kersting, U., Önelge, N., Korkmaz, S. and Şaş, G. (1993) Citrus virus and virus-like diseases in the East Mediterranean region of Turkey. In: P. Moreno, J. V. da Graça, L. W. Timer and J. A. Doods (eds.), *Proc. 12th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. Calif. Pres, Riverside, USA.*
- Korkmaz, S. (1997) Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgillerinde vektör ile taşınan virüs benzeri bir hastalığın yayılması, taşınması, duyarlı tür ve çeşitlerin belirlenmesi ve tanınması üzerine araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana.

Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanınması

- Loconsole, G., Önelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R. K. and Saponari, M. (2013) Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, A Putative New Member of the Genus *Mandarivirus*. *Phytopathology*, 102:1168-1175.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8:19.
- Önelge, N. (2003) Türkiye’de Limonlarda Sarı Damar Açılması İle İlgili İlk Rapor. *J. Turk. Phytopath.* 32:1, 53–55.
- Önelge, N., Bozan, O., Gök, M. and Satar, S. (2007) Yellow vein clearing of lemons in Turkey. 17th Conf. IOCV, p. 176.
- Zhao, X. Y., Chen, H. M., Li, Z. A., Wang, X. F., Zhou, Y. K., Tang, Z. C. and Zhou, Y. (2014) First report of *Citrus yellow vein clearing virus* on Lemon in Yunnan, China. *Plant Disease*, 98:12-747.
- Zhen, S., Kurth, E. G., Peremyslov, V. V., Changyong, Z., Dolja, V. V (2015) Molecular characterization of a *Citrus yellow vein clearing virus* strain from China. *Archives of Virology*, 160(7):1811-1813.



Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanınması

Ali ENDES ⁽¹⁾

Mukaddes KAYIM ⁽¹⁾

Özet

Adana, Mersin illerinde yetiştiriciliği yapılan kayısı ağaçlarında hastalığa neden olan *Phytophthium* türlerinin morfolojik ve kültürel özelliklerinin yanı sıra moleküler karakterizasyonlarını saptamak amacı ile 2010-2012 yılları arasında farklı bölgelerden *Phytophthium* spp. ile infekteli olduğundan şüphelenilen bitki örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatların tamamı ITS gen dizisine göre *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 olarak saptanmıştır. İzolatların koloni deseni ve radyal gelişimi farklı ortamlarda çalışılmış ve mikroskopik yapıları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturduğu, kayısı bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: ITS bölgesi, Patojenisite, PCR, *Phytophthium* spp., Radyal Gelişim

Identification of *Phytophthium vexans* Causing Wilting and Trunk Rot of Apricot Trees in Çukurova Region

Abstract

Suspicious plant materials with infected *Phytophthium* spp. were collected from apricot trees causing disease in different countrysides and locations of Adana and Mersin provinces for morphological and cultural features as well as molecular characterization of *Phytophthium* species during 2010-2012. All five isolates used throughout this study were identified as *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 based on ITS gen sequences. Colony patterns and radial growth study of isolates were performed on different media and subsequently their microscobic structures were identified. It was determined that *Phytophthium vexans* could cause wilting canopy, rotting of root and crown of apricot trees, which was the reason for economic damage in apricot orchards.

Keywords: ITS Region, Pathogenicity, PCR, *Phytophthium* spp. Radial Growth

Giriş

Bodur ve yarı bodur meyve yetiştiriciliğinin Türkiye genelinde artması, Çukurova Bölgesi'nde erkenci meyve yetiştiriciliğini ön plana getirmiştir. 2015 yılında üretimi yapılan kayısı meyvelerinin toplam üretim miktarı, Adana ve Mersin illerinde sırasıyla 5001 ve 107922 ton (Anonim, 2016) olup, bu illerde nisbi nem oranının yüksek olması ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğindeki kültürel uygulama hataları fungal hastalıkların zararını ekonomik boyuta ulaştırmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden *Phytophthora* ve *Phytophythium* cinsleri *Chromista* alemi içerisinde çift kamçıya sahip heterokont grupları kapsayan *Oomycota* şubesinin, *Oomycetes* sınıfı *Peronosporales* takımı, *Pythiaceae* familyası içerisinde yerleştirilmiştir (de Cock ve ark., 2015). Toprak kökenli bu hastalık etmenleri, meyve ağaçları, turuncgil, orman, park ve sebze türlerini kapsayan dünya genelinde geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Hendrix ve Campbell, 1973; Erwin ve Riberio, 1996; Tewoldemedhin ve ark., 2011). Bu cinslerin virüent türleri tarımsal üretim alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Duncan ve Cooke, 2002; Hendrix ve Campbell, 1973).

de Cock ve ark. (2015) *Phytophythium* cinsini *Phytophthora* ve *Pythium* arasında yeni bir cins olarak tanılamışlardır. Bu cinsin türleri genelde hif üzerinde sporangioforsuz terminal, interkalari ve yanal olarak oluşan ve internal olarak çoğalan papillalı oval, elips ya da limon şekilli sporangiumlar oluşturmaktadır (Uzuhashi ve ark., 2010; de Cock ve ark., 2015). *Phytophythium* türlerinin oluşturduğu özellikle papillalı ve oval ya da limon şekilli sporangiumlar *Phytophthora* cinsinde görülen sporangiumlar ile oldukça benzerdir. Fakat *Phytophthora* cinsinde hiçbir zaman internal çoğalan sporangium belirlenmemiştir (de Cock ve ark., 2015). *Phytophythium*'un *Phytophthora* ile bir diğer farkı zoosporlar sporangiumlardan *Pythium* benzeri zoospor çıkışı yapmaktadır. *Phytophythium*'un özgün karakterlerden biri de türlerin ince uzun, silindirik anteridium oluşturmalarıdır. Örneğin *Phytophythium vexans* (Basionym: *Pythium vexans* de Bary)'ın

anteridiumları genelde oogoniumlar üzerine geniş bir lop şeklinde yapışmaktadır. Internal olarak çoğalan papillalı sporangium oluşturan *Pythium* cinsi funguslar bulunmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark., 2010). de Cock ve ark., (2015) *P. helicandrum*, *P. marsipium* ve *P. grandisporangium* hariç diğer *Pythium* türlerinin ince uzun, silindirik ve lob şekilli anteridium oluşturmadıklarını bildirmiş ve bu üç türden ilki olan *P. helicandrum*'un *Phytophythium* türlerinden daha büyük sporangiumlara ve desenli oogoniumlara sahip olduğunu; *P. marsipium*, *Phytophythium vexans* gibi çan şekilli anteridiumlara sahip olmasına rağmen oval sporangium yerine şişe şekilli sporangiumlar oluşturduğu ve üçüncü tür olan *P. grandisporangium*'un ise lop şekilli anteridium oluşturduğu fakat bu türün genelde sucul habitatlarda yaşadığı ve papilla yerine giderek daralan boyuna sahip oldukça büyük sporangium oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında toprak kökenli etmenlerden *Phytophthora* ve *Fusarium* türleri ilk sıralarda yer almalarına rağmen *Phytophythium* türleri fideliklerde çıkış öncesi veya çıkış sonrası, tek yıllık otsu bitkilerde çökertene neden olmaktadır. Son yıllarda meyve bahçelerinde yapılan çalışmalar, bazı *Phytophythium* türlerinin çok yıllık odunsu bitkilerde de patojen olduklarını göstermiştir (Nakova, 2010; Spies ve ark., 2011; Tewoldemedhin ve ark., 2011). *Phytophythium* türlerinin çoğu rizosfer ve sucul ortamlarda saprofit ya da fakültatif patojen olarak, elma ve şeftali meyve ağaçlarında fidan yetiştiriciliğinde ciddi sorunlar yaratmaktadır (Mircetich, 1970; Souli ve ark., 2011; Yang ve ark., 2012). Bitki patojeni *Phytophythium* türlerinin çoğu belirli bir konukçu dizinine sahip olmadığı gibi tipik hastalık belirtileri de oluşturmamaktadır (Hendrix ve Campbell, 1973). Kaynaklara göre *Pythiaceae* türlerinin oluşturduğu belirtiler gelişmede gerileme, solma, geriye ölüm, kuruma, zamklanma, kök ve kök boğazı çürüklüğü olarak bilinmektedir. (Hendrix ve Campbell, 1973; Mazzola ve ark., 2002; Nakova, 2010; Souli ve ark., 2011). Bu

simptomlar diğer toprak kökenli bitki patojeni funguslar ve abiyotik (asfeksi) faktörlerin neden olduğu belirtilerle benzerlik gösterdiğinden *Phytophthium* türlerinin neden olduğu hastalıklar çoğunlukla gözden kaçmaktadır.

Hastalığın kontrol altına alınması ve uygun mücadele stratejilerinin oluşturulması için eski ve yeni kurulan meyve bahçelerindeki ağaçlardan ve topraktan patojenin doğru olarak tanılanması son derece önem arz etmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Phytophthium* cinslerine ait türlerin tanılanması morfolojik karakterlerin mikroskopik gözlemine, seçici agar ortamında patojenin izolasyonuna ve fiziksel özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak bazı türlerde güvenilir morfolojik belirtilerin yetersiz olması, önemli oranda morfolojik yapıda şekil değişimi, şekillerin stabil olmaması, genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark., 2010; Schroeder ve ark., 2013). Günümüzde bu tür olumsuzlukları aşmada tanıyı desteklemek için moleküler biyolojiye dayalı PCR-temelli yöntemler kullanılmaktadır. *Phytophthium* cinsi de dahil olmak üzere ökaryotlarda sırasıyla 18S, 5.8S ve 28S ribozomal DNA (rDNA) kodlayan genlerde tandem denilen çok sayıda tekrar eden nükleotid birimleri, diğer bir ifade ile transkripsiyonu yapılmayan ITS bölgeleri bulunmaktadır (White ve ark., 1990). Bu nedenle, *Phytophthium* türlerinin morfolojik karakterlerine göre yapılan tür tanısını desteklemek için rDNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilimlerinden yararlanılmaktadır (Paul, 2000; Lévesque ve de Cock, 2004; Zeng ve ark., 2005; Mcleod ve ark., 2009; Tao ve ark., 2011; Dervis ve ark., 2014). ITS bölgelerine ait baz dizileri çok yakın akraba türlerde son derece değişken olduğu için, *Phytophthium* türlerini ayırt etmede veya sınıflandırılmasında oldukça kullanışlı ve güvenilir markörler sunmaktadır. (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark. 2009; Uzuhashi ve ark. 2010).

Bu çalışma, Çukurova bölgesinde kayısı meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, kayısı ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne bazı *Phytophthium* türlerinin de neden olabileceğini göstermek amacı ile yapılmıştır.

Materyal Ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Çalışmaları

2010-2012 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar aylarında, Adana'nın Seyhan, Yüreğir ve Pozantı, Mersin'nin Tarsus ve Akdeniz ilçelerinde kayısı meyve bahçelerinden örnekler toplanmıştır. Her bölge için beş meyve bahçesinde sörvey çalışması yapılmıştır. Gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök ve kök boğazı çürüklüğü gösteren meyve ağaçlarının kök ve kök boğazından infekteli bitki doku örnekleri toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir. İnfekteli dokulardan yaralı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde 5-8mm uzunluğunda parçalar kesilmiştir. Bu infekteli parçalar % 70 etil alkol içerisinde 10-15 sn. bekletildikten sonra iki kez steril sudan geçirilmiş ve filtre kağıtları üzerinde kurulanmıştır. Küçük infekteli doku parçaları % 0.01 streptomisin içeren patates dekstroz agar (PDA, Merck; 1.10130) ortamı üzerinde 24±2°C'de karanlıkta 3-4 gün inkübe edilmiştir. Ayrıca, infekteli bitki örneklerinin yüzeyindeki kaba artıkları temizlendikten sonra, yüzey dezenfeksiyon yapılmadan, 17g/L Mısır Unu Agar (MUA) (Sigma; C1176) kullanılarak hazırlanan PARB (10 µg pimaricin, 10 µg rifampicin ve 250 µg ampicillin, 100 µg PCNB, 10 µg benomyl) ortamı üzerinde yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarında patojen izolasyonları için de kültüre alınmıştır (Jeffers ve Martin, 1986;). İzolatların saf kültürleri, kolonilerin kenar uçlarından miselyum parçalarının PDA ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında PDA ve PARB; morfolojik ve kültürel özelliklerin belirlenmesi için mısır unu agar (MUA), kenevir tohumu agar (KTA), havuç agar (HA) ve yulaf unu agar (YUA) kullanılmıştır. KTA ortamı, Paul (2000); diğer tüm agar ortamları Erwin ve Ribeiro (1996) tarafından belirtilen özellikler dikkate alınarak hazırlanmıştır.

DNA İzolasyonu, PCR Çoğaltımı ve Sekans Analizi

Genomik DNA, PDA ortamında 10 günlük kültürlerin taze misellerden izole edilmiştir. DNA izolasyonu DNeasy Plant Kit'i (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar ITS primerleri ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ve ITS5 (5-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG-3') kullanılarak, rDNA'nın ITS1, 5.8S ve ITSII gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (White ve ark., 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu her bir örnek için toplam 25µL hacimde gerçekleşen PCR kokteyli: 10X PCR bafırdan 2,5µL, 25mM'lık MgCl₂'den 2µL, 2mM'lık dNTP (Fermantas)'den 2,5µL, 10µM'lık ileri (ITS5) ve geri (ITS4) primerlerden 0,5µL, 1U'luk (1U/1µL) Taq polimeraz (Fermantas)'dan 0.25µL, 1-2µL patojen DNA'sı ve 25µl'ye tamamlayacak kadar sQH₂O içermektedir. PCR sentez ürünü için başlangıçta 96 °C'de 2 dak., ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 1 dak., 55 °C'de 1 dak., 72 °C'de 2 dak. ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri, TAE (Tris glasiyal asetik asit, Etilen diamin tetra asetik asit) tampon çözeltisi ile %1,5 agaroz (TipI, Sigma) jelde 50 Volta 3 saat elektroforez yapılmıştır. Jeller 0,5µg/mL'lik etidyum bromidle boyanarak UV transillimünatör (BioRAD-VERSADOC 4000MP) üzerinde görülebilir duruma getirilmiştir. Agaroz jelden ITS bölgelerine ait DNA fragmenti QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen, USA.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak saflaştırılmıştır. Saf PCR ürünlerinin sekans analizleri Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside' da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ITS baz dizileri Blastn programı kullanılarak NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki diğer *Phytophthium* izolatlarının ITS genine ait baz dizileri ile karşılaştırılarak tür tanıları yapılmıştır.

İzolatların Tanınması

Patojenik izolatlar, sporangium, oogonium, oospore, klamidiospor ve koloni

morfolojisi ve rDNA'nın bazı dizi analizleri temel alınarak tanılanmıştır. İzolatların besi ortamlarında oluşturduğu sporangium, oogonium, oospore ve anteridium içeren karakteristik özellikler belirlenmiş ve morfolojiye dayalı tanılama çalışmalarının tamamında, her bir izolat için kullanılan karakterlerin her biri için 50 konidi ölçümün ortalama değeri hesaplanmıştır. Farklı ortamlarda koloni desenlerini belirlemeye yönelik ve daha sonraki çalışmalar için 5 izolat (PvAsk1, PvAyk1, PvApk1, PvMtk1, PvMakk1) kullanılmıştır. Bu izolatların, PDA ortamında 25±1°C'de karanlıkta 10 gün geliştirilen kültürlerinden, 4 mm çapındaki miselyum diskleri, PDA, MUA, KTA, HA ve YUA ortamları üzerine aktarılmıştır. İzolatlar 28±1°C'de karanlıkta bir ay inkübe edilerek, izolatların 48 saat içerisindeki miselyal gelişimleri çapraz kesişen doğru yöntemi ile belirlenmiş ve izolatların oluşturdukları koloni desenleri bu süre içerisinde belirlenmiştir (Paul, 2000; Zeng ve ark., 2005; Tao ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011).

Patojenisite testi

Kayısı ağaçlarının infekteli bitki dokularından izole edilen *P. vexans* izolatlarının patojenisite testinde Myrabolan 29C ve Tyrinthe sırasıyla Kayısı anaç ve çeşiti kullanılmış ve inokulasyon çalışmaları için beş *Phytophthium vexans* izolatı (PvAsk1, PvAyk1, PvApk1, PvMtk1, PvMakk1) seçilmiştir. Tesadüf deneme desenine göre 5 tekerrür (her tekerrür 1 fidan)'lü deneme dizayn edilmiştir. Anaçlar kök boğazının 10 cm; kalemler aşı noktasının 15 cm üst kısmından kabuk dokusu 4mm çaplı mantar delici ile çıkarılmıştır. Bu bölgelere, PDA ortamında 5 günlük izolat kültürlerinden aynı büyüklükte miselyal diskler yerleştirilerek izolatların odun dokusuyla direk teması sağlanmıştır. Daha sonra inokulasyon alanına birkaç damla steril su damlatılmış ve parafilm ile tamamen kaplanmıştır. Klima odasında 25±1°C derecede, ilk 24 saat için steril su püskürtülmüş, şeffaf plastik torbalar içerisinde daha sonraki günler için plastik torbalar kullanılmadan fidanlar 60 gün bekletilmiştir. Kontrol olarak her meyve türü için 5 fidan kullanılmıştır. Anaçlar ve kalemler

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında *Phytophthora* Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthora vexans*'ın Tanınması

için yukarıda açıklanan yöntem takip edilmiş ancak 4mm çaplı misel diskleri yerine sadece PDA ortamı yerleştirilmiştir.

İstatistik analiz

İzolatların patojenite ve radyal misel gelişim denemelerinde elde edilen verilere normalite testi için Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Radyal misel gelişim denemesinde ve patojenite verileri normal dağılım göstermiştir. Daha sonra, patojenite ve radyal misel gelişim denemelerinde varyansların homojenlik testi Levene's testi ile yapılmış ve verilerin varyansları arasında heterojenlik bulunmamıştır (anaç ve çeşit patojenite için sırasıyla; $P=0.310$ ve $P=0.20$; radyal misel gelişimi için $P=0.777$). Veriler varyans analizi için SAS 9.0 ve SPSS 20.0 istatistik yazılım programları kullanılmıştır. Verilerin ortalamaları %5 önem seviyesinde Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD ($\alpha=0.05$)] testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Phytophthora spp.'nin Hastalık Belirtileri ve Meyve Bahçelerinden İzolasyonu

Hastalık belirtileri, ilkbahar başlangıcında, genç meyve fidanlarının habitusunda ve ağaçların genç sürgün uçlarında solgunluk olarak görülmüştür. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, fidan ve genç ağaçlar apoplektik bir şekilde solgunluk ve ani çöküş göstermiştir. Hasta ağaçlar küçük ve pörsümüş meyveler ile kök boğazının kabuk dokusunda çatlak ve sulu siyahımsı kahverengi renkte bölgeler oluşturmuştur. Bu bölgelerin kabuk dokusu kaldırıldığında, Odun dokularında, koyu kahverengi ve kırmızımsı renkte nekrotik bölgeler görülmüştür. Odun dokusunda bu infekteli ve sağlıklı dokular bir birlerinden keskin bir sınır ile ayrılmıştır. Nitekim, Nakova (2010) yılında yapmış olduğu çalışmada, *Phytophthora* ve *Phytophthora* türlerinin bazı meyve ağaçlarının taç ve kök boğazında neden olduğu hastalık belirtileri ile bizim bulgularımız oldukça benzer bulunmuştur. Ayrıca, 2011 yılında Souli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *P. indigoferae* ve *P. irregulare* türleri elma ağaçlarının taç ve kök boğazında

yukarıda bahsedilen hastalık belirtilerini oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Phytophthora spp. Adana (Seyhan, Yüreğir, Pozantı) ve Mersin (Tarsus, Akdeniz) illerinde sörveylenen 25 kayısı bahçesinden elde edilmiştir. Bu bahçelerden, Adana ve Mersin için sırasıyla 38 ve 19 izolat olmak üzere toplam 57 *Phytophthora* spp. izole edilmiştir. İzolatlar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre *Phytophthora* cinsi olarak tanımlanmıştır.

İzolatların Morfolojik ve Moleküler Tanınması

Farklı *Phytophthora* izolatlarının PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA ortamlarında oluşturdukları koloni desenlerinin ve $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda radyal misel gelişimleri belirlenmiştir. YUA ortamın diğer agar ortamlarla ($F_{(4-100, 0.05)}=24.4$, $P<0.0001$), PvAsk1 izolatın diğer izolatlarla ($F_{(4-100, 0.05)}=84.4$, $P<0.0001$) ve ortam x izolat etkileşimi ($F_{(16-100, 0.05)}=4.5$, $P<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık göstermiştir. Çizelge 1'de PvAsk1 izolatı hariç diğer izolatlar YUA ortamında üzerinde istatistiksel olarak en iyi radyal misel oluşturduğu görülmektedir. Çizelge 1'de görüldüğü üzere, PvMtk1 izolatı diğer izolatlarla göre istatistiksel olarak üç farklı sınıf oluşturmuş ve en iyi radyal misel gelişimi YUA ortamı üzerinde 61.6 mm olarak gerçekleşmiştir. Ortam x izolat arasındaki etkileşim sonucu en iyi radyal misel gelişimi PDA ortamı üzerinde PvAsk1 izolatı göstermiştir (Çizelge 1).

***Phytophthora vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014:** İzolatlar ortamlarda krem ya da beyaz renkli krizantemi koloni desenini PDA, YUA ve HA; homojen koloni desenini MUA ve KTA; pamuksu koloni desenini PDA ve YUA ortamları üzerinde oluşturmuştur. Fakat, Tao ve ark. (2011) *Phytophthora vexans* izolatlarının PDA ortamı üzerinde pamuksu koloni deseninin

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanınması

yanı sıra gül koloni desenini de oluşturduğunu bildirmiştir. Hifler 5 ± 0.8 μm genişliğinde ölçülmüştür. İzolatlar HA ve YUA ortamlarında bol miktarda sporangium oluşturmuştur (Şekil 2). Sporangiumlar küresel, oval ve papillasız olup, hif uçlarında ve arasında (Şekil 2A) sporangiofordan kopmuş (Şekil 2B) ya da çok kısa pedisellere (Şekil 2C) sahip olarak oluşmuştur. Oysa Zeng ve ark. (2005) *Phytophthium vexans* izolatlarının agar ortamlarında sporangium oluşturmadıklarını bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalarda PDA ortamı hariç diğer ortamlarda *Phytophthium vexans* izolatlarının sporangium oluşturdukları bildirilmiştir (Erwin ve Riberio 1996; Paul, 2000; Dervis ve ark. 2014). Sporangiumların çapı ortalama $20.4\pm 3.2\mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. HA ortamı diğer agar ortamlarına göre daha fazla miktarda izolatların oogonium ve oospor oluşturmasını teşvik etmiştir. Küresel, pürüzsüz

ve terminal formda oluşan oogoniumlar ortalama 19.9 ± 1.3 μm çapında ölçülmüştür. Oosporlar genelde küresel ve aplerotik formda olup $15.8\pm 1.5\mu\text{m}$ çapındadır (Şekil 2D-F). Paragynous özellik gösteren anteridiumlar; genelde her bir oogonium için 1 adet oluşmuştur.

Morfolojik tanılamalar, moleküler çalışmalar ile desteklenmiştir. Moleküler çalışmalar için seçilen izolatların ITS gen bölgesinin baz dizileri, Gen bankasındaki diğer *Phytophthium* izolatlarının baz dizileri Blastn analizi ile karşılaştırılmıştır. Blastn analizi sonucunda *Phytophthium vexans* izolatları, yeni adlandırmaya göre *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 olarak LM651012.1 ve LM651011.1 izolatları ile %99 benzerlik göstermiştir.

Çizelge 1. Farklı kültür ortamlarında sabit sıcaklık ($28\pm 1^\circ\text{C}$) ve karanlıkta *Phytophthium* izolatlarının iki gün inkübasyon periyodu sonunda oluşturduğu radyal misel gelişimi

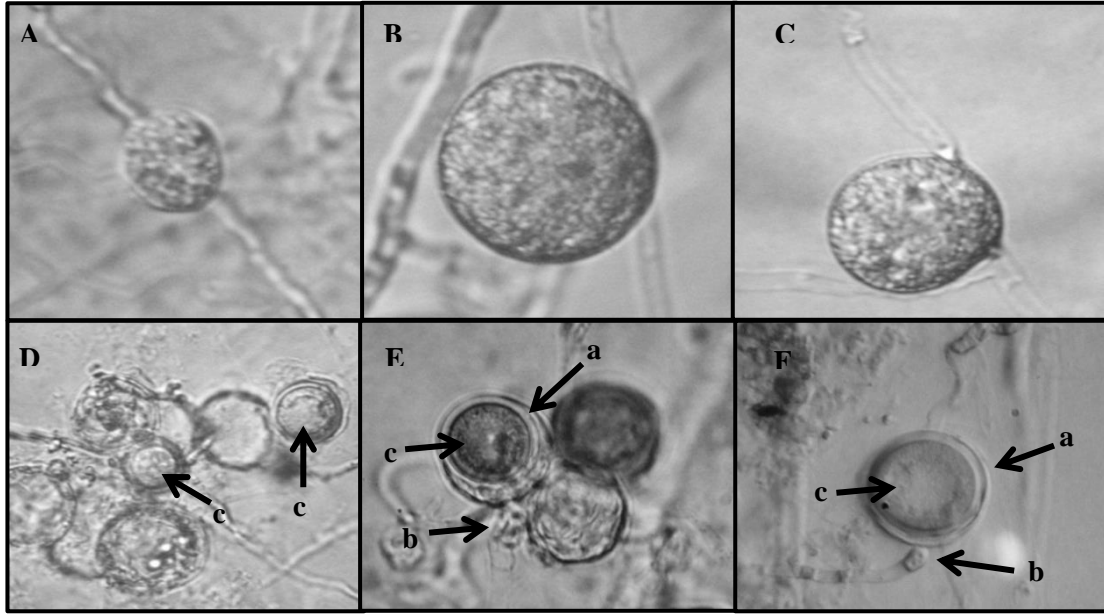
Ortam ¹	Radyal Misel Gelişimi (mm±S. H. ²)				
	İzolat				
	PvAsk1	PvAyk1	PvApk1	PvMtk1	PvMakk1
PDA	70.2±1.1 a ³	51.4±1.3 a	52.4±1.6 ab	54.6±1.6 b	61.0±2.3 a
MUA	62.8±1.2 b	44.8±1.4 b	47.6±2.3 b	47.0±1.2 c	50.2±2.3 b
YUA	64.2±1.0 b	50.8±1.0 a	56.8±1.1 a	61.6±1.3 a	60.8±0.8 a
KTA	64.4±1.2 b	48.8±1.4 a	54.8±1.7 a	47.4±1.5 c	48.6±1.3 b
HA	65.6±1.2 b	43.4±1.2 b	52.2±2.0 ab	56.6±1.9 b	56.6±1.9 a
LSD(0.05)	3.5	3.9	5.3	4.6	5.4

¹ PDA= Patates Dekstroz Agar; MUA= Mısır Unu Agar; YUA= Yulaf Unu Agar; KTA= Kenevir Tohumu Agar; HA= Havuç Agar

² S.H.= Standart Hata

³ Değerler denemeden elde edilen verilerin ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'ın En Küçük Önemli Fark (LSD) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması



Şeki 1. *Phytophthium vexans*'ın morfolojik karakterleri. (A) interkalari, (B) küresel, (C) oval sporangium. (D-F) a: oogonium, b: paragynous anteridium, c: oospor

Patojenisite testi

Phytophthium vexans izolatlarının patojenisite çalışmaları iklim odalarında yapılmış ve virülenslikleri arasındaki farklılıklar varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Tyrinthe [$F_{(5-24, 0.05)} = 17.7$; $P < 0.0001$] ve Myrabolan 29C [$F_{(5-24, 0.05)} = 77.0$; $P < 0.0001$] kontrollerine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Çizelge 2'de *Phytophthium vexans* izolatlarının kayısı anacı olarak kullanılan Myrabolan 29C'nin odun dokusunda oluşturduğu lezyonlar bakımından birbirleriyle benzer özellikte olduğu görülmektedir. Fakat *Phytophthium vexans* izolatları Tyrinthe kayısı çeşitinde virülenslikleri arasında birbirlerinden farklı olduğu ve en virulent izolatın PvMakk1 olup, bu izolatın istatistiksel olarak PvAsk1 ve PvAykl izolatları ile aynı önem seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Nitekim, Hendrix ve Campbell 1973'te odunsu ve otsu bitkilerin besleyici köklerindeki çürümelere *Phytophthium* türlerinin neden olduğunu bildirmiştir. Dahası son yıllardaki çalışmalar, özellikle elma gibi odunsu bitkilerde, virulens *Phytophthium* türleri odunsu bitkilerin kök

ve kök boğazının yanı sıra besleciyi köklerinde oluşturduğu infeksiyonlardan dolayı bahçelerdeki ağaç kayıplarının nedeni olarak gösterilmiştir. (McLeod ve ark., 2009; Nakova, 2010). Myrabolan 29C'nin odun dokusunda oluşan lezyon uzunluğu, Tyrinthe'nin odun dokusunda oluşan lezyon uzunluğundan daha kısa olarak oluşmuştur. Lezyon alanları sörvey çalışmalarında kayısı bahçelerinde belirlenen hastalık belirtileri ile benzer olarak odun dokularında kahverengi ve kırmızımsı renkte nekrotik bölgeler şeklinde oluşmuştur. Bu infekteli alanlarından gerçekleştirilen re-izolasyon çalışmalarında izolatların tamamı tekrar elde edilmiştir. Kontrollerde lezyon veya herhangi bir hastalık belirtisi oluşmamıştır. Çalışma sonunda, Koch postülatları tamamen gerçekleşmiş olmasından dolayı; *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında patojen olduğu belirlenmiş ve dünya genelinde, tarımsal üretim alanlarında *Phytophthium* türlerinin elmada (Mazzola ve ark., 2002; Tewoldemedhin ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011), kauçuk ağacında (Zeng ve ark. 2005), şeftalide (Mircetich, 1970; Yang ve ark., 2012),

bağda (Spies ve ark. 2011), orkide (Tao ve ark. 2011) ve Gölevez (Devis ve ark. 2014) bitkilerinde hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 2. *Phytophthium vexans* izolatlarının iki yaşındaki kayısı çeşiti (Tyrinthe) ve anaç (Myrabolan 29C) odun dokuda oluşturduğu lezyon uzunluğu

İzolat	Tyrinthe (mm±S.H. ¹)	Myrabolan 29C (mm±S.H. ¹)
PvMakk1	70.0±1.7 a ²	20.6±1.2 a
PvAsk1	68.8±0.7 a	24.2±2.0 a
PvAyk1	63.2±3.1 ab	23.0±1.6 a
PvMtk1	60.0±2.8 b	21.8±1.4 a
PvApk1	57.6±4.4 b	21.0±1.3 a
Kontrol	7.6±1.2 c	7.8±0.8 b
LSD (0.05)	7.8	4.1

¹ S.H.= Standart Hata

² Değerler denemeden elde edilen verilerin ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'ın En Küçük Önemli Fark (LSD) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Sonuçlar

Bu çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde izolatların agar ortamları üzerinde oluşturduğu koloni desenleri oldukça değişken olmasından dolayı herhangi bir agar ortamında *Phytophthium vexans*'a ait belirgin bir koloni deseni saptanamamıştır. Ayrıca izolatların aseksüel ve seksüel yapıları oldukça değişken olarak belirlenmiştir. Bu nedenden dolayı, tanılama çalışmaları morfolojik ve kültürel özelliklerin yanı sıra moleküler yöntemler temel alınarak gerçekleştirilmelidir. Ayrıca bu çalışma *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturarak, kayısı bahçelerinde ağaç kayıplarının nedensel etmenleri arasında olduğunu ve uygun koşullarda *Phytophthora*, *Fusarium* ve *Verticillium* spp. gibi etmenlerle birlikte meyve bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceklerini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ZF2010YL95 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, (2016) Türkiye İstatistik Kurumu (Erişim tarihi: 17.06.2016, 20:43)
- Cooke, D.E.L., Dreth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K., (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 562s.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S., and Levesque, C.A. (2014) *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25-39.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması

- Dervis, S., Soyulu, S., Serce, C. (2014) Corm and root rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ovatisporangium vesans* and *Rhizoctonia solani*. *Romanian Biotechnological Letters* 19(6):9868–9874.
- Duncan, J. ve Cooke, D. (2002) Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist* 16:59–66.
- Hendrix, F. F. ve Campbell, W. A. (1973) *Phytophthiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 11: 77–98.
- Jeffers, S. N., Martin, S. B. (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Phytophthium* species. *Plant Disease* 70(11): 1038–1043.
- Levesque, C. A. and De Cock, W. A. M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Phytophthium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363–1383.
- Mazzola, M., Andrews, P. K., Reganold, J. P., Lévesque, C. A. (2002). Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Phytophthium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675.
- McLeod, A. I., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., Mostert, L. (2009) Morphological and phylogenetic analyses of *Phytophthium* species in South Africa. *Mycological Research* 113:933–951.
- Mircetich, S. M. (1970) The Role of *Phytophthium* in Feeder Roots of Diseased and Symptomless Peach Trees and in Orchard Soils in Peach Tree Decline. *Phytopathology* 61:357-360.
- Nakova, M. (2010) Monitoring of *Phytophthora* species on fruit trees in Bulgaria. *European Journal of Plant Pathology* 128:517-525
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A., Paulitz, T. C. (2013) Molecular Detection and Quantification of *Phytophthium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease* 97(1): 4–20.
- Souli, M., Boughalleb, N., Campo, P. A., Alvarez, L. A., Sierr, A. P., Armengol, J., Jimé'nez, J. G. (2011) First Report of *Phytophthium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *J. Phytopathology* 159:352–357.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M., McLeod, A. (2011) Characterisation and detection of *Phytophthium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 131:103–119.
- Paul, B. (2000) ITS1 region of the rDNA of *Phytophthium megacarpum* sp. nov., its taxonomy, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 186: 229–233.
- Tao, Y., Zeng, F., Ho, H., Wei, J., Wu, Y., Yang, L., He, Y. (2011) *Phytophthium vexans* Causing Stem Rot of Dendrobium in Yunnan Province, China. *J. Phytopathology* 159:255–259.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Botha, W. J., Spies, C. J., McLeod, A. (2011) Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Phytophthium*) associated with apple orchards in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 130:215–229.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M. (2010) Phylogeny of the genus *Phytophthium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337–365.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editörler). Academic Press, New York, USA:315–322.
- Yang, J., Ruegger, P. M., McKenry, M. V., Becker, J. O., Borneman, J. (2012) Correlations between Root-Associated Microorganisms and Peach Replant Disease Symptoms in a California Soil. *Plos One* 7(10):1–10.
- Zeng, H. C., Ho, H. H., Zheng, F. C. (2005) *Phytophthium vexans* causing patch canker of rubber trees on Hainan Island, China. *Mycopathologia* 159: 601–606.



Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

Ali ENDES ⁽¹⁾

Mukaddes KAYIM ⁽¹⁾

Özet

Adana ve Mersin meyve bahçelerinde elma ve şeftali ağaçlarında hastalık etmeni *Pythium* türlerinin morfolojik, kültürel ve moleküler karakterizasyonlarını belirlemek amacı ile 2010-2012 yılları arasında farklı bölgelerden *Pythium* spp. ile infekteli olduğundan şüphe edilen bitki örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatların tamamı ITS gen dizisine göre *Pythium nodosum* voucher olarak saptanmıştır. İzolatların koloni deseni ve radyal gelişimi beş farklı agar ortamlarında çalışılmış ve mikroskopik yapıları belirlenmiştir. İzolatlar genel olarak agar ortamlarında krizantemi koloni deseni oluşturmuş ve en iyi radyal misel gelişimi kenevir tohumu ve patates dekstroz agar ortamlarında gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Pythium nodosum*'un meyve bahçelerinde ekonomik düzeyde elma ve şeftali ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Besi Ortamları, ITS bölgesi, Patojenisite, PCR, Radyal Gelişim

Identification and Pathogenicity of *Pythium nodosum* Causing Wilting and Crown Rot of Apple and Peach Trees in Cukurova Region

Abstract

Plant materials infected with *Pythium* spp. were collected from apple and peach trees causing disease in different countrysides and locations of Adana and Mersin provinces for morphological and cultural features, and molecular characterization of *Pythium* species during 2010-2012. All five isolates used throughout this study were identified as *Pythium nodosum* based on ITS gen sequences. Colony patterns and radial growth study of isolates were performed on different media and subsequently their microscobic structures were identified. Isolates were generally formed chrysanthemum colony pattern on agar media and developed the best radial mycelial growth on hemp seed and potatoes dextrose agar media. It was determined that *Pythium nodosum* could cause wilting canopy, rotting of root and crown of apple and peach trees, which was the reason for economic damage in fruit orchards.

Keywords: Culture media, ITS Region, Pathogenicity, PCR, Radial Growth

Giriş

Bodur ve yarı bodur meyve yetiştiriciliğinin Türkiye genelinde artması, Çukurova Bölgesi'nde erkenci meyve yetiştiriciliğini ön plana getirmiştir. Elma ve şeftali meyvelerinin 2015 yılında toplam üretim miktarı, Adana için sırasıyla 29.667 ve 41.849 ton, Mersin için sırasıyla 42.869 ve 53.162 ton (Anonim, 2016) olup, bu illerde nisbi nem oranının yüksek olması ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğindeki kültürel uygulama hataları fungal hastalıkların infeksiyonlarını arttırmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden

Phytophthora ve *Pythium* cinsleri *Chromista* alemi içerisinde çift kamçıya sahip heterokont grupları kapsayan *Oomycota* şubesinin (*Oomycetes*) *Pythiales* takımı içerisine yerleştirilmiştir (Cooke ve ark., 2000; Webster ve Weber, 2007; Tewoldemedhin ve ark., 2011). Toprak kökenli bu hastalık etmenleri, meyve ağaçları, turuncgil, orman, park ve sebze türlerini kapsayan dünya genelinde geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Hendrix ve Campbell, 1973; Erwin ve Riberio, 1996;). Bu cinslerin virüent türleri tarımsal üretim

alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Duncan ve Cooke, 2002; Hendrix ve Campbell, 1973).

Yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında toprak kökenli etmenlerden *Phytophthora* ve *Fusarium* türleri ilk sıralarda yer almalarına rağmen *Pythium* türleri fideliklerde çıkış öncesi veya çıkış sonrası, tek yıllık otsu bitkilerde çökertene neden olmaktadır. Son yıllarda meyve bahçelerinde yapılan çalışmalar, bazı *Pythium* türlerinin çok yıllık odunsu bitkilerde de patojen olduklarını göstermiştir (Nakova, 2010; Souli ve ark., 2011; Spies ve ark., 2011; Tewoldemedhin ve ark., 2011). *Pythium* türlerinin çoğu rizosfer ve sucul ortamlarda saprofit ya da fakültatif parazit olarak, elma ve şeftali meyve ağaçlarında fidan yetiştiriciliğinde ciddi sorunlar yaratmaktadır (Mircetich, 1970; Souli ve ark., 2011; Yang ve ark., 2012; Schroeder ve ark., 2013). Bitki patojeni *Pythium* türlerinin çoğu belirli bir konukçu dizinine sahip olmadığı gibi tipik hastalık belirtileri de oluşturmamaktadır (Hendrix ve Campbell, 1973; Mcleod ve ark., 2009; Yang ve ark., 2012). Kaynaklara göre *Pythiaceae* türlerinin oluşturduğu semptomlar gelişmede gerileme, solma, geriye ölüm, kuruma, zamklanma, kök ve kök boğazı çürüklüğü olarak bilinmektedir. (Hendrix ve Campbell, 1973; Mircetich, 1970; Erwin ve Riberio, 1996; Mazzola ve ark., 2002; Nakova, 2010; Souli ve ark., 2011;). Bu semptomlar diğer toprak kökenli bitki patojeni funguslar ve abiyotik (asfeksi) faktörlerin neden olduğu semptomlar ile benzerlik gösterdiğinden *Pythium* türlerinin neden olduğu hastalıklar çoğunlukla gözden kaçmaktadır (Mircetich, 1970).

Hastalığın kontrol altına alınması ve uygun mücadele stratejilerinin oluşturulması için eski ve yeni kurulan meyve bahçelerindeki ağaçlardan ve topraktan patojenin doğru olarak tanılanması son derece önem arz etmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Pythium* cinslerine ait türlerin tanılanması morfolojik karakterlerin mikroskopik gözlemine, seçici agar ortamında patojenin izolasyonuna ve fiziksel özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak bazı türlerde güvenilir morfolojik belirtilerin yetersiz olması,

önemli oranda morfolojik yapıda şekil değişimi, şekillerin stabil olmaması, genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark., 2010; Schroeder ve ark., 2013). Günümüzde bu tür olumsuzlukları aşmada tanıyı desteklemek için moleküler biyolojiye dayalı PCR-temelli yöntemler kullanılmaktadır. *Pythium* cinsi de dahil olmak üzere ökaryotlarda sırasıyla 18S, 5.8S ve 28S ribozomal DNA (rDNA) kodlayan genlerde tandem denilen çok sayıda tekrar eden nükleotid birimleri, diğer bir ifade ile transkripsiyonu yapılmayan ITS bölgeleri bulunmaktadır (White ve ark., 1990). Bu nedenle, *Pythium* türlerinin morfolojik karakterlerine göre yapılan tür tanısını desteklemek için rDNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilimlerinden yararlanılmaktadır (Chen, 1992; Paul , 2000; Lévesque ve Cock, 2004; Zeng ve ark., 2005; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark. 2010; Tao ve ark., 2011; Dervis ve ark., 2014; de Cock ve ark., 2015). ITS bölgelerine ait baz dizileri çok yakın akraba türlerde son derece değişken olduğu için, *Pythium* türlerini ayırt etmede veya sınıflandırılmasında oldukça kullanışlı ve güvenilir markörler sunmaktadır. (Lévesque ve Cock, 2004; Villa ve ark., 2006; Mcleod ve ark. 2009; Uzuhashi ve ark. 2010).

Bu çalışma, Çukurova bölgesinde elma ve şeftali meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, elma ve şeftali ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne bazı *Pythium* türlerinin de neden olabileceğini göstermek amacı ile yapılmıştır.

Materyal Ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Çalışmaları

2010-2012 yılları arasında ilk ve sonbahar aylarında, Adana ili Seyhan, Yüreğir ve Pozantı, Mersin ili Tarsus ve Akdeniz ilçelerinde elma ve şeftali meyve bahçelerinden örnekler toplanmıştır. Her bölge için beş meyve bahçesinde sörvey çalışması yapılmıştır. Gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök ve kök boğazı çürüklüğü gösteren meyve ağaçlarının kök ve kök boğazından infekteli bitki doku örnekleri toplanmış ve laboratuvara

getirilmiştir. İnfekteli dokulardan yaralı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde 5-8mm uzunluğunda parçalar kesilmiştir. Bu infekteli parçalar % 70 etil alkol içerisinde 10-15 sn bekletildikten sonra iki kez steril sudan geçirilmiş ve filtre kağıtları üzerinde kurulanmıştır. Küçük infekteli doku parçaları % 0.01 streptomisin içeren patates dekstroz agar (PDA, Merck; 1.10130) ortamı üzerinde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 3-4 gün inkübe edilmiştir. Ayrıca, infekteli bitki örneklerinin yüzeyindeki kaba artıkları temizlendikten sonra, yüzey dezenfeksiyon yapılmadan, 17g/L Mısır Unu Agar (MUA) (Sigma; C1176) kullanılarak hazırlanan PARB (10 µg pimarin, 10 µg rifampicin ve 250 µg ampicillin, 100 µg PCNB, 10 µg benomyl) ortamı üzerinde yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarında patojen izolasyonları için de kültüre alınmıştır (Jeffers ve Martin, 1986; Erwin ve Ribeiro, 1996). İzolatların saf kültürleri, kolonilerin kenar uçlarından miselyum parçalarının PDA ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında PDA ve PARB; morfolojik ve kültürel özelliklerin belirlenmesi için mısır unu agar (MUA), kenevir tohumu agar (KTA), havuç agar (HA) ve yulaf unu agar (YUA) kullanılmıştır. KTA ortamı, Paul (2000); diğer tüm agar ortamları Erwin ve Ribeiro (1996) tarafından belirtilen özellikler dikkate alınarak hazırlanmıştır.

DNA İzolasyonu, PCR Çoğaltımı ve Sekans Analizi

Genomik DNA, PDA ortamında 10 günlük kültürlerin taze misellerden izole edilmiştir. DNA izolasyonu DNeasy Plant Kit'i (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar ITS primerleri ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ve ITS5 (5'-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG-3') kullanılarak, rDNA'nın ITS I, 5.8S ve ITS II gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (White ve ark, 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu her bir örnek için toplam 25µL hacimde gerçekleşen PCR kokteyli: 10xPCR tampondan 2,5µL, 25mM'lık MgCl₂'den 2µL, 2mM'lık dNTP (Fermantas)'den 2,5µL, 10µM'lık ileri (ITS5) ve geri (ITS4) primerlerden 0,5µL, 1U'luk

(1U/1µL) Taq polimeraz (Fermantas)'dan 0,25µL, 1-2µL patojen DNA'sı ve 25µl'ye tamamlayacak kadar sQH₂O içermektedir. PCR sentez ürünü için başlangıçta 96 °C'de 2 dk ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 1 dak., 55 °C'de 1 dak., 72 °C'de 2 dak. ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmıştır (Ristaino ve ark, 1998). PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri, TAE (Tris glasiyal asetik asit, Etilen diamin tetra asetik asit) tampon çözeltisi ile %1,5 agaroz (TipI, Sigma) jelde 50 Volta 3 saat elektroforez yapılmıştır. Jeller 0,5µg/mL'lık etidyum bromidle boyanarak UV transillimünatör (BioRAD-VERSADOC 4000MP) üzerinde görülebilir duruma getirilmiştir. Agaroz jelden ITS bölgelerine ait DNA fragmenti QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen, USA.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak saflaştırılmıştır. Saf PCR ürünlerinin sekans analizleri Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside' da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ITS baz dizileri Blastn programı kullanılarak NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki diğer *Pythium* izolatlarının ITS genine ait baz dizileri ile karşılaştırılarak tür tanıları yapılmıştır.

İzolatların Tanınması

Patojenik izolatlar, sporangium, ogonium, oospore, klamidiospor ve koloni morfolojisi ve rDNA'nın bazı dizi analizleri temel alınarak tanılanmıştır. İzolatların besi ortamlarında oluşturduğu sporangium, oogonium, oospor ve antheridium içeren karakteristik özellikler belirlenmiş ve morfolojiye dayalı tanılama çalışmalarının tamamında, her bir izolat için kullanılan karakterlerin her biri için 50 konidi ölçümün ortalama değeri hesaplanmıştır. Farklı ortamlarda morfolojik ve kültürel özellikleri belirlemeye yönelik 6 izolat kullanılmıştır. Bu izolatların, PDA ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 10 gün geliştirilen kültürlerinden, 4 mm çapındaki miselyum diskleri, PDA, MUA, KTA, HA ve YUA ortamları üzerine aktarılmıştır. İzolatlar $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta bir ay inkübe edilerek, izolatların 48 saat içerisindeki miselyal gelişimleri çapraz kesişen doğru yöntemi ile belirlenmiş ve izolatların

oluşturdukları koloni desenleri bu süre içerisinde belirlenmiştir (Paul ve ark., 1998; Paul, 2001; Zeng ve ark., 2005; Tao ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011).

Patojenisite testi

Elma ve şeftali ağaçlarının infekteli bitki dokularından izole edilen *Pythium nodosum* izolatlarının patojenisite testinde MM106 , GF-677 anaç; Gala (elma) ve Honey Blush (peach) çeşitleri kullanılmış ve inokulasyon çalışmaları için altı *Pythium nodosum* izolatı seçilmiştir. Tesadüf deneme desenine göre 5 tekerrür (her tekerrür 1 fidan)'lü deneme dizayn edilmiştir. Anaçlar kök boğazının 10 cm; kalemler aşu noktasının 15 cm üst kısmından kabuk dokusu 4mm çaplı mantar delici ile çıkarılmıştır. Bu bölgelere, PDA ortamında 5 gün inkübasyon periyodu sonunda gelişen izolat kültürlerinden aynı büyüklükte miselyal diskler yerleştirilerek izolatların odun dokusuyla direk teması sağlanmıştır. Daha sonra inokulasyon alanına birkaç damla steril su damlatılmış ve parafilm ile tamamen kaplanmıştır. Klima odasında 25±1°C derecede, ilk 24 saat için steril su püskürtülmüş, şeffaf plastik torbalar içerisinde daha sonraki günler için plastik torbalar kullanılmadan fidanlar 60 gün bekletilmiştir. Kontrol olarak her meyve türü için 5 fidan kullanılmıştır. Anaçlar ve kalemler için yukarıda açıklanan yöntem takip edilmiş ancak 4mm çaplı misel diskleri yerine sadece PDA ortamı yerleştirilmiştir.

İstatistik analiz

İzolatların patojenisite ve radyal misel gelişim denemelerinde elde edilen verilere normalite testi için Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Radyal misel gelişim denemesinde ve patojenisite verileri normal dağılım göstermiştir. Daha sonra, patojenisite ve radyal misel gelişim denemelerinde varyansların homojenlik testi Levene's testi ile yapılmış ve verilerin varyansları arasında heterojenlik bulunmamıştır (Radyal gelişim ve patojenisite için sırasıyla; P= 0.468 ve P= 0.200). Veriler varyans analizi için SAS 9.0 istatistik yazılım programı kullanılmıştır. Verilerin ortalamaları %5 önem seviyesinde Fisher'in En

Küçük Önemli Fark [LSD ($\alpha = 0.05$)] testi ile karşılaştırılmıştır

Bulgular ve Tartışma

***Pythium* spp.'nin Hastalık Belirtileri ve Meyve Bahçelerinden İzolasyonu**

Hastalık belirtileri, ilkbahar başlangıcında, genç meyve fidanlarının habitusunda ve ağaçların genç sürgün uçlarında solgunluk olarak görülmüştür. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, fidan ve genç ağaçlar apoplektik bir şekilde solgunluk ve ani çöküş göstermiştir (Şekil 1A). Hasta ağaçlar küçük ve pörsümüş meyveler ile kök boğazının kabuk dokusunda çatlak ve sulu siyahımsı kahverengi renkte bölgeler oluşturmuştur. Bu bölgelerin kabuk dokusu kaldırıldığında, odun dokularında, koyu kahverengi ve kırmızımsı renkte nekrotik bölgeler görülmüştür (Şekil 1B). Odun dokusunda infekteli ve sağlıklı dokular bir birlerinden keskin bir sınır ile ayrılmıştır. Nitekim, Nakova (2010) yılında yapmış olduğu çalışmada, *Phytophthora* ve *Pythium* türlerinin bazı meyve ağaçlarının taç ve kök boğazında neden olduğu hastalık belirtileri ile bizim bulgularımız oldukça benzer bulunmuştur. Ayrıca, 2011 yılında Souli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *P. indigoferae* ve *P. irregulare* türleri elma ağaçlarının taç ve kök boğazında yukarıda bahsedilen hastalık belirtilerini oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Pythium spp. Adana (Seyhan, Yüreğir, Pozantı) ve Mersin (Tarsus, Akdeniz) illerinde sörvey yapılan toplam 50 meyve bahçesinden, Adana ve Mersin için sırasıyla 42 ve 21 izolat olmak üzere toplam 63 *Pythium* spp. izole edilmiştir. İzolatlar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre *Pythium* cinsi olarak tanılanmıştır.

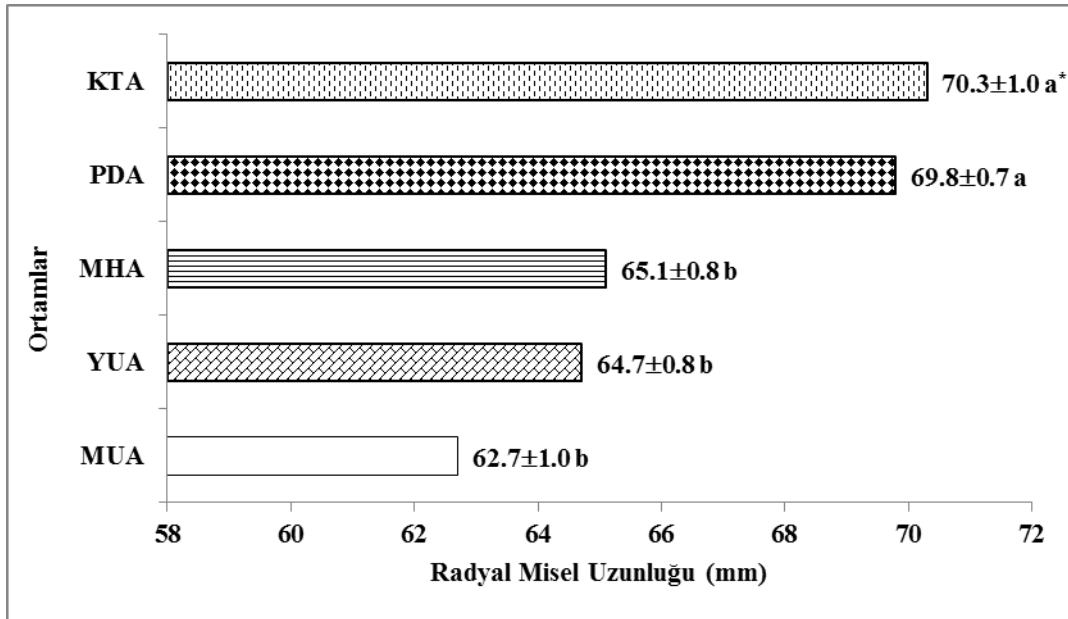
İzolatların Morfolojik ve Moleküler Tanılanması

Pythium sp. İzolatları PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA ortamlarında oluşturdukları koloni desenlerinin ve 28±1°C'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda radyal misel gelişimleri belirlenmiştir. KTA ve PDA ortamın diğer agar ortamlarıyla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı bulunurken (F (4-120, 0.05)=13.0, P<0.0001), izolat (F (5-120,

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi



Şekil 1. *Pythium nodosum*'un elma ağacında oluşturduğu apoplektik simptom (A) ve şeftali ağacının kök boğazında oluşturduğu karakteristik simptom (B)



Şekil 2. *Pythium nodosum*'un 28±1°C'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda KTA, PDA, MHA, YUA ve MUA'da geliştirdiği radyal misel gelişimi (mm)

*Değerler denemeden elde edilen, her bir ortamda 6 izolatın oluşturduğu radyal misel uzunluk ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD (%5) = 2.6] testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

0.05)=0.09, $P>0.05$), ortam x izolat (F (20-120, 0.05)=0.15, $P>0.05$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık göstermemiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi agar ortamları istatistiksel olarak iki farklı sınıf ve *Pythium* sp. izolatları en iyi radyal misel gelişimini 70.3 ve 69.8 mm olarak sırasıyla KTA ve PDA ortamları üzerinde oluşturmuştur. *Pythium* türlerinin morfolojik ve kültürel özelliklerini belirlemeye yönelik önceki çalışmalar değerlendirildiğinde, Ribeiro (1978), *Pythium* türlerinin çim bitkileri ile elde edilen agar ortamlarında daha iyi morfolojik ve kültürel karakter oluşturduklarını bildirmiştir. Fakat, Paul ve ark. (1998)'nin yapmış olduğu çalışma *Pythium* türlerinin KTA agar ortamları üzerinde daha yoğun miselyumun yanı sıra sporangium oluşturduğunu bildirmişlerdir.

***Pythium nodosum*:** İzolatlar ortamlarda krem (suda ıslatılmış gibi) ve krizantemi koloni desenlerini HA, YUA, KTA ve PDA; beyaz renkli pamuksu krizantemi koloni desenlerini PDA ve MUA ortamlarında oluşturmuştur. Hifler, girintili çıkıntılı mercanimsi gibi gelişim göstermiş ve 5.9 ± 0.8 μm genişliğinde ölçülmüş olmasının yanı sıra yaşlı hiflerde bölmeler görülmüştür. Sporangiumlar HA ve YUA ortamlarında kolaylıkla oluşmuştur. Sporangiumlar çoğu kez hif uçlarında (Şekil 3A) ve arasında (Şekil 3B) küresel şekilde oluşmuştur. İzolatlar 19.8 ± 4.6 μm çaplı sporangium ve kist şeklinde zoospor oluşturmuştur (Şekil 3C). Eşeyli üreme organı olan oogonium ve oospor küresel, düz duvarlı ve hif uçlarında sırasıyla 20.9 ± 4.7 ve 16.1 ± 3.6 μm çapında oluşmuştur (Şekil 3D-F). Oosporlar aploeritik biçimde oluşmuştur. Antheridiumlar genelde belirgin bir biçimde oogonium yüzeyine genişleyerek temas etmiştir. Çoğu kez bu şekilde genişleyen antheridiumlar, antheridium çeşidinin belirlenmesini zorlaştırmıştır. Döllenen sonra antheridiumlar çan-şeklinde oogonium yüzeyine temas da bulunduğu görülmüştür.

Morfolojik tanılamalar moleküler çalışmalar ile desteklenmiştir. Moleküler çalışmalar için seçilen izolatların ITS gen bölgesinin baz dizileri, Gen bankasındaki diğer *Pythium* izolatlarının baz dizileri Blast analizi

ile karşılaştırılmıştır. Blast analizi sonucunda *Pythium nodosum* izolatları, *Pythium nodosum* izolatları, HQ643709.1 ve HQ643708.1 izolatları ile %100 benzerlik göstermiştir.

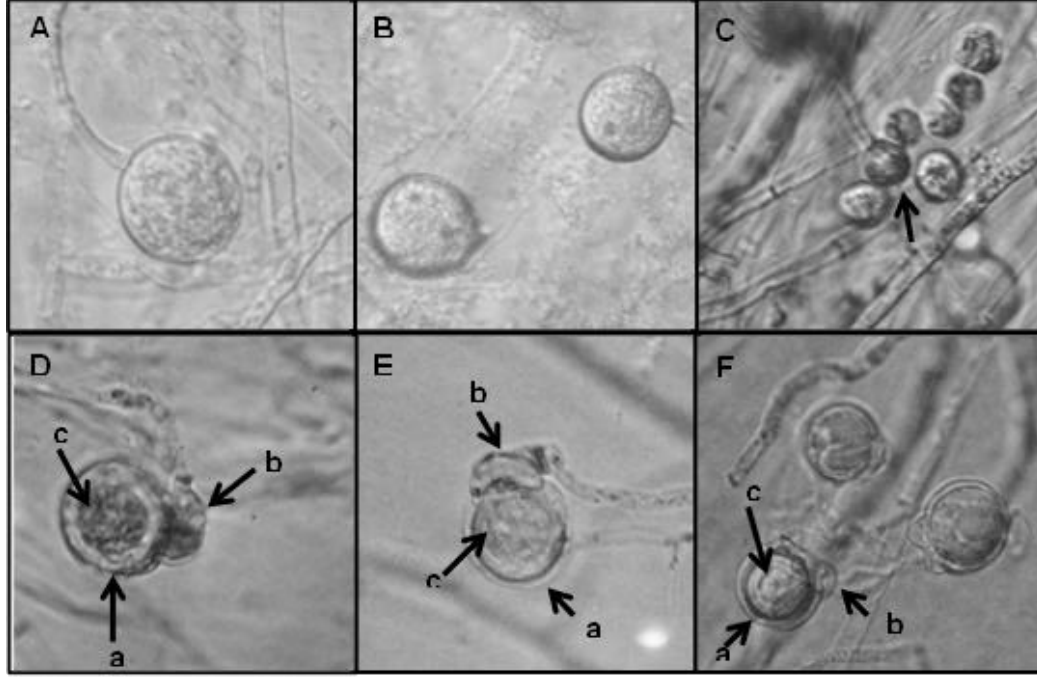
Patojenisite testi

Pythium nodosum izolatlarının patojenisite çalışmaları iklim odalarında yapılmış ve virülenslikleri arasındaki farklılıklar varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. İzolaların virülenslikleri arasında herhangi bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). Fakat izolatlar kontrollere göre (F(6-112, 0.05)=267.2; $P<0.0001$), fidanların hem anaç hem de çeşitleri (F(3-112, 0.05)=280.2; $P<0.0001$) ve fidan x izolat etkileşimi (F(18-112, 0.05)=8.0; $P<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur. Şekil 4'de görüldüğü gibi 60 gün inkübasyon periyodu sonunda *Pythium nodosum* izolatlarının elma ve şeftali meyve fidanlarının anaç ve çeşitlerinde oluşan lezyon uzunlukları içinde en uzun lezyon uzunluğu MM106 (53.7 mm) elma anacında olduğu saptanmıştır. Bunu elma çeşiti olan Gala (44.1 mm) izlemiştir. Nitekim yapılan sorveylerde ve çiftçiler tarafından getirilen infekteli bitki dokularında gözlemlenen semptomlarda bu sonucu doğrular niteliktedir. Fakat *Pythium* türlerinin toprak kaynaklı patojen grubu içerisinde yer alması, toprak altı organını oluşturan anaçlarının, gövdeyi oluşturan kalemlere göre daha dayanıklı olarak seçilmelerini gerektirmektedir. Bu genel yargı ve elde ettiğimiz sonuç bir biriyle tam olarak uyuşmamaktadır. Bu nedenle konu ile ilgili önceki çalışmalar daha detaylı incelendiğinde, Souli ve ark. (2011), *Pythium* türlerine karşı Anna ve Meski elma çeşitlerinin MM106 anacına göre daha tolerant olduğunu belirlemiştir. Diğer taraftan şeftali anacı ve çeşiti olan sırasıyla GF-677 ve H.Blush, elma anacı ve çeşitinde belirlenenin aksine, GF-677 (26.5 mm) anacı H. Blush (36.0 mm) çeşidine göre daha tolerant olduğu saptanmıştır (Şekil 4). Nitekim, Hendrix ve Campbell 1973'te odunsu ve otsu bitkilerin besleyici köklerindeki çürümelere *Pythium* türlerinin neden olduğunu bildirmiştir. Son yıllardaki çalışmalar, özellikle elma ve şeftali gibi odunsu bitkilerde, virulens *Pythium* türleri odunsu bitkilerin kök ve kök

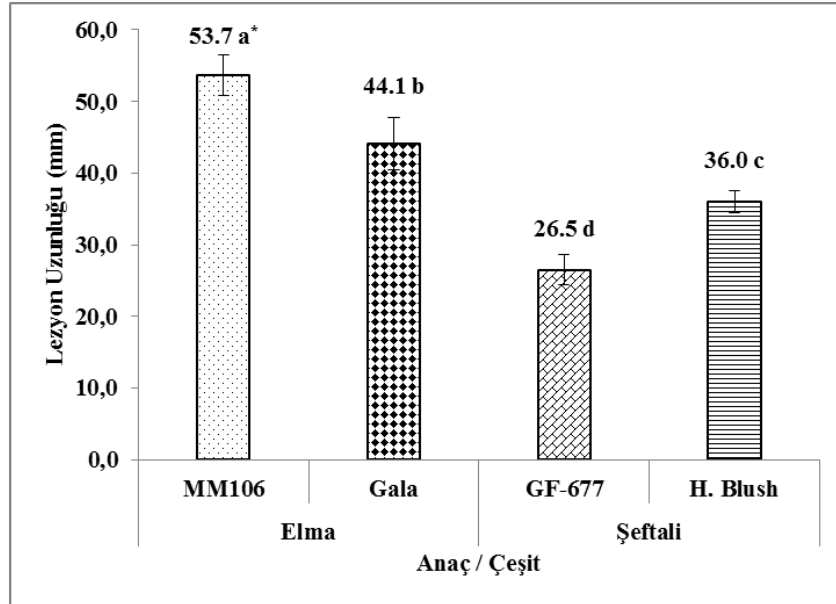
Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

boğazı ve besleciyi köklerinde oluşturduğu enfeksiyonlardan dolayı bahçelerdeki ağaç

kayıplarının nedeni olarak gösterilmiştir



Şekil 3. *Pythium nodosum*'un morfolojik karakterleri. (A) terminal ve (B) interkalari sporangium, (C) kist şeklinde zoospor. (D-F) a: oogonium, b: çan şekilli antheridium, c: oospor



Şekil 4. Patojenisite testinde *Pythium nodosum*'un anaç ve çeşitlerde oluşturduğu ortalama lezyon uzunluğu.

*Değerler denemeden elde edilen, her bir anaç ve çeşit için 6 izolatin odun dokusunda oluşturduğu lezyon uzunluklarının ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD (%5) = 1.9] testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

(Mircetich, 1970; Mcleod ve ark., 2009; Nakova, 2010). Lezyon alanları sörvey çalışmalarında elma ve şeftali bahçelerinde belirlenen hastalık belirtileri ile benzer olarak odun dokularında kahverengi ve kırmızımsı nekrotik bölgeler şeklinde oluşmuştur. Bu infekteli alanlardan gerçekleştirilen rezolasyon çalışmalarında izolatların tamamı tekrar elde edilmiştir. Kontrollerde lezyon veya herhangi bir hastalık belirtisi oluşmamıştır. Çalışma sonunda, Koch postülatları tamamen gerçekleşmiş olmasından dolayı; *Pythium nodosum*'un elma ve şeftali ağaçlarında patojen olduğu belirlenmiş ve dünya genelinde, tarımsal üretim alanlarında *Pythium* türlerinin elma (Mazzola ve ark., 2002; Tewoldemedhin ve ark., 2011 Souli ve ark., 2011), kauçuk ağacı (Zeng ve ark. 2005), şeftali (Mircetich, 1970; Yang ve ark., 2012), bağ (Spies ve ark. 2011), orkide (Tao ve ark. 2011) ve Gölevez (Devis ve ark. 2014) bitkilerinde hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir.

Sonuçlar

Bu çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde izolatların agar ortamları üzerinde oluşturduğu koloni desenleri oldukça değişken olmasından dolayı herhangi bir agar ortamında *Pythium nodosum*'a ait belirgin bir koloni deseni saptanmamıştır. Ayrıca izolatların aseksüel ve seksüel yapıları oldukça değişken olarak belirlenmiştir. Bu nedenle tanılama çalışmaları patojen etmeni tür düzeyinde morfolojik ve kültürel özelliklerine göre saptamak son derece zor olup, yanımlara neden olmaktadır. Moleküler yöntemler bu tip patojenleri tür düzeyinde tanılamada büyük avantaj sağlamaktadır. Etmenin herhangi bir aseksüel somatik yapısına ait DNA, moleküler teşhis için yeterli bir gen kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma *Pythium nodosum*'un elma ve şeftali ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturarak meyve bahçelerinde ağaç kayıplarının nedenleri arasında olduğunu ve uygun koşullarda *Phytophthora*, *Fusarium* ve *Verticillium* spp. gibi etmenlerle birlikte meyve

bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceklerini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ZF2010YL95 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, (2016) Türkiye İstatistik Kurumu (Erişim tarihi: 17.06.2016, 20:43)
- Chen, W. (1992) Restriction Fragment length Polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species *Phytopathology* 82:1467-1472
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S., and Lévesque, C.A. (2015) *PhytoPythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25-39.
- Dervis, S., Soylu, S., Serce, C. (2014) Corn and root rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ovatisporangium vesans* and *Rhizoctonia solani*. *Romanian Biotechnological Letters* 19(6):9868–9874.
- Erwin, D. C. ve Ribeiro, O. K., (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 562s.
- Duncan, J. ve Cooke, D. (2002) Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist* 16:59-66.
- Hendrix, F. F. ve Campbell, W. A. (1973) *Pythiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 11: 77–98.
- Jeffers, S. N. ve Martin, S. B. (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70(11): 1038–1043.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

- Lévesque, C. A. ve De Cock, W. A. M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363–1383.
- Mazzola, M., Andrews, P. K., Reganold, J. P., Lévesque, C. A. (2002). Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675.
- McLeod, A. I., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., Mostert, L. (2009) Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113:933–951.
- Mircetich, S. M. (1970) The Role of *Pythium* in Feeder Roots of Diseased and Symptomless Peach Trees and in Orchard Soils in Peach Tree Decline. *Phytopathology* 61:357-360.
- Nakova, M. (2010) Monitoring of *Phytophthora* species on fruit trees in Bulgaria. *European Journal of Plant Pathology* 128:517-525
- Paul, B., Galland, D., Bhatnagar, T., Dullieu, H. (1998) A new species of *Pythium* isolated from the Burgundy region in France. *FEMS Microbiology Letters* 158: 207-213
- Paul, B. (2000) ITS1 region of the rDNA of *Pythium megacarpum* sp. nov., its taxonomy, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 186: 229–233.
- Paul, B. (2001) ITS region of the rDNA of *Pythium longandrum*, a new species; its taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 202:239–242.
- Ribeiro, O. K. (1978). A Source Book of the Genus *Phytophthora*. Vaduz
- Ristaino, J.B., Madritch, M., Trout, C.L., Parra, G., 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3):948-954.
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A., Paulitz, T. C. (2013) Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease* 97(1): 4–20.
- Souli, M., Boughalleb, N., Campo, P. A., Alvarez, L. A., Sierr, A. P., Armengol, J., Jimenez, J. G. (2011) First Report of *Pythium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *J. Phytopathology* 159:352–357.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M., McLeod, A. (2011) Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 131:103–119.
- Tao, Y., Zeng, F., Ho, H., Wei, J., Wu, Y., Yang, L., He, Y. (2011) *Pythium vexans* Causing Stem Rot of *Dendrobium* in Yunnan Province, China. *J. Phytopathology* 159:255–259.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Botha, W. J., Spies, C. J., McLeod, A. (2011) Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 130:215–229.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M. (2010) Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337–365.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T., Suga, H., 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences *Mycologia* 98(3):410-422.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

- Webster, J. ve Weber, R.W.S. (2007) Introduction to Fungi. Cambridge University Press. New York
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editörler). Academic Press, New York, USA:315–322.
- Yang, J., Ruegger, P. M., McKenry, M. V., Becker, J. O., Borneman, J. (2012) Correlations between Root-Associated Microorganisms and Peach Replant Disease Symptoms in a California Soil. *Plos One* 7(10):1–10.
- Zeng, H. C., Ho, H. H., Zheng, F. C. (2005) *Pythium vexans* causing patch canker of rubber trees on Hainan Island, China. *Mycopathologia* 159: 601–606.

İçindekiler (devamı) - Contents (continuing)

- Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni Pythium nodosum'un Tanılanması ve Patojenisitesi**
Identification and Pathogenicity of Pythium nodosum Causing Wilting and Crown Rot of Apple and Peach Trees in Cukurova Region
A. Endes, M. Kayım **69-78**
- Coğrafi Bilgi Sistemleri Ortamında Standardize Yağış İndeksi Yöntemiyle Olasılıklı Meteorolojik Kuraklık Analizi: Seyhan Havzası**
Meteorological Drought Analysis With Different Return Periods by Using Standardized Precipitation Index In Geographic Information Systems Environment: A Case Study In The Seyhan River Basin
A.D. Keskiner, M. Çetin, M. Uçan, M. Şimşek **79-90**



İçindekiler - Contents

- Transformation of NHX-1 Gene into Some Melon Varieties**
Bazı Kavun Çeşitlerine NHX-1 Geninin Transformasyonu
T. İzgü, B. Sevindik, Ö. Şimşek, Y.Y. Mendi 1-8
- Üzüm Çekirdeklerinin Temel Biyoaktif Bileşenleri**
Main Bioactive Compounds of Grape Seeds
O. Sevindik, S. Selli 9-16
- Kırsal Yerleşmelerde Konut ve Yeni Konut İnşası**
Housing in Rural Settlements and Construction of New Housing
Ö Güğercin, A.N. Torun 17-26
- Domates Bitkisinde Pospiviroid Cinsi Viroid Etmenlerinin Varlığının Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu**
Investigation and Molecular Characterization of Viroid Agents Existence at Pospiviroid Genus on Tomato Plant
R. Kışlak, N. Önelge 27-34
- Hemin İlavésinin Laktik Asit Bakterilerinde Oksidatif Stres Üzerine Etkisi**
Influence of Hemin Addition on Oxidative Stressin Lactic Acid Bacteria
B. Özel, Ö. Şimşek, H. Erten 35-42
- Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (Myrtus communis L.) Berries**
Murt (Myrtus communis L.) Meyvesinin Farklı Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan Özellikleri
S. Aksay 43-50
- Turunçgil Sarı Damar Açılması Virüs (TSDAV) Hastalığının Farklı Turunçgil Türlerinde Moleküler Olarak Tanılanması**
Identification of Citrus Yellow Clearing Virus Disease Virus (CYVCV) by Molecularly on Different Citrus Species
A. Bozdoğan, N. Önelge 51-58
- Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni Phytophythium vexans'ın Tanılanması**
Identification of Phytophythium vexans Causing Wilting and Trunk Rot of Apricot Trees in Çukurova Region
A. Endes, M. Kayım 59-68