



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



Doktora Tezi

**FİTOPLAZMALARIN KANTİTATİF TESPİTİ İÇİN DROPLET
DİJİTAL PZR (ddPZR) TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Yiğit Sabri ÜNLÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Işıl TULUM**

Ağustos, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 6.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Işıl TULUM(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Can GERÇEK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. İbrahim Halil KAVAKLI
Koç Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. İbrahim BARIŞ
Koç Üniversite
Fakülte

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36601 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 118C290 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 223O519 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Tecrübelerini ve bilgi birikimlerini benimle her zaman paylaştığı ve desteklediği için Fitopatoloji Laboratuvarı sorumlusu ve danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Işıl TULUM'a,

Tez sürecim boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemediği yol gösteren Botanik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e

Fitoplazma çalışmalarının pozitif kontrol örneklerini ve fitopatoloji alanındaki engin tecrübelerini bizlerle paylaşarak çalışmalarımızı aydınlatan Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a

Uzun ve zorlu doktora sürecimde desteklerini eksik etmeyen Prof. Dr. Osman EROL ve ekibine,

Çalışma arkadaşlarım MSc. Barbaros MÜLAYİM'e, MSc. Kayhan DEREÇİK'e, MSc. Büşra KARA'ya ve ekibin diğer üyelerine yaşattıkları takım ruhu, akademik ve manevi tüm destekleri için ekip arkadaşlığından öte birer dost oldukları için,

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Can GERÇEK ve Öğr. Gör. Dr. Hande MORGİL GERÇEK'e ve Araş. Gör. Dr. Kadir BOZTAŞ'a koşulsuz destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Tüm tez çalışması sürecinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Selma YAVUZ'a, babam Ahmet ÜNLÜ'ye, ablam Hande ÜNLÜ'ye ve arkadaşım Bilge Saadet KALELİ'ye çok teşekkür ederim.

Temmuz 2024

Yiğit Sabri ÜNLÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. MOLLICUTES SINIFI VE MİNİMAL GENOM	3
2.2. CA. PHYTOPLASMA	5
2.3. CA. PHYTOPLASMA VEKTÖRLERİ	8
2.4. CA. PHYTOPLASMA HASTALIKLARI VE HASTALIK FAKTÖRLERİ.....	10
2.5. DÜNYADA FİTOPLAZMA	12
2.5.1 Tarımsal Ürünlerde Fitoplazma.....	13
2.5.1.1. Tarla Bitkilerinde Fitoplazma	13
2.5.1.2. Meyvelerde Fitoplazma	18
2.5.2. Süs Bitkilerinde Fitoplazma	20
2.5.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Fitoplazma	21
2.5.4. Kent ve Orman Ağaçlarında Fitoplazma.....	21
2.6. TÜRKİYE’DE FİTOPLAZMA	22
2.7. CA. PHYTOPLASMA TEŞHİSİ	23
2.7.1. Geleneksel Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
2.7.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR).....	26
2.7.3. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (Loop-Mediated Isothermal Amplification – LAMP)	31
2.7.4 Droplet Dijital PZR (ddPZR)	33
2.8. CA. PHYTOPLASMA SINIFLANDIRILMASI.....	35
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	39
3.1. MATERYAL TEMİNİ.....	39

3.2. DNA İZOLASYONU	39
3.3. FİTOPLAZMALARIN NESTED-PZR İLE TEŞHİSİ	40
3.4. FİTOPLAZMA ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI, AKTARIMI VE SEKANSLANMASI	41
3.5. DNA SEKANS ANALİZİ VE SANAL RFLP	42
3.6. FİTOPLAZMALARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) İLE TEŞHİSİ	42
3.7. FİTOPLAZMALARIN DROPLET DİJİTAL PZR (DDPZR) İLE TEŞHİSİ	43
4. BULGULAR.....	46
4.1. BİTKİ MATERYALİ VE SEMPTOMLARI.....	46
4.2. DNA İZOLASYONU VE NESTED-PZR SONUÇLARI	49
4.3. FİTOPLAZMA ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI, AKTARIMI VE SEKANSLANMASI	53
4.4. DNA SEKANS ANALİZİ VE SANAL RFLP	55
4.5. FİTOPLAZMALARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) İLE TEŞHİSİ	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
KAYNAKLAR.....	78
EKLER	98
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1: Fitoplazmaların yaşam döngüsü. (a) Böceğin hastalıklı bitkiden fitoplazmanın beslenmesi, (b) Fitoplazmanın böcek içerisinde çoğalması, (c) Hastalıklı böceğin sağlıklı bitkiden beslenerek bitkiyi enfekte etmesi, (d) Fitoplazmanın bitki içerisinde çoğalması (Sugio ve diğ., 2011). 6
- Şekil 2.2: Fitoplazma hastalığına dair en eski kayıt, sağ ortadaki çiçek viresens semptomları göstermektedir (Namba, 2019). 7
- Şekil 2.3: *Macrostes striifrons* vektöründe fitoplazmanın gün bazında dağılımı. Mavi sinyaller fitoplazma varlığını belirtmektedir. Ölçek, 1 mm. (Koinuma ve diğ., 2020). 8
- Şekil 2.4: Bazı fitoplazma vektörleri, (A). *Oncopsis alni*, (B). *Orientus ishidae*, (C). *Hyalesthes obsoletus*, (D). *Dictyophara europaea*, (E). *Reptalus panzeri*, (F). *Macrostes quadrilineatus* (G). *Scaphoideus titanus* (Alma ve diğ., 2019). 10
- Şekil 2.5: Bitkilerde fitoplazmalar kaynaklı meydana gelen tipik semptomlar, (A). Cadı süpürgesi, (B). Viresens, (C) filodi (Ermacora ve Osler, 2019; Maejima ve diğ., 2014; Zamharir, 2011). 11
- Şekil 2.6: Fitoplazmaların ve efektörlerin bitki içerisindeki sistemik hareketi (Sugio ve diğ., 2011). 12
- Şekil 2.7: Fitoplazmaların Dünyadaki genel dağılımı (Kumari ve diğ., 2019). 13
- Şekil 2.8: Tahıllarda fitoplazma semptomları, (A) arpa, (B) yulaf, (C) darı, (D) mısır, (E) buğday, (F) pirinç (de Oliveira ve diğ., 2018). 14
- Şekil 2.9: Sebze olarak tüketilen ve tipik semptom gösteren bazı bitkiler, (A) domates, (B) biber, (C) patlıcan (D) salatalık (E) soğan (F) havuç (Martini ve diğ., 2018; Zamharir ve Azimi, 2018, Jomantiene ve diğ., 2010; Rao ve Kumar, 2017). 15
- Şekil 2.10: Pamuk bitkisinde fitoplazma kaynaklı indirgenmiş yaprak semptomu (A) sağlıklı (B) hastalıklı (Kumar ve diğ., 2010B). 16
- Şekil 2.11: Şeker endüstrisinde kullanılan bitkilerde fitoplazma (A) şeker pancarı, (B) şeker kamışı (Rao ve diğ., 2018). 17
- Şekil 2.12: Tütün bitkisinde fitoplazma (Liao ve diğ., 2022). 18
- Şekil 2.13: Asma bitkisinde görülen fitoplazma hastalıkları, soldaki figür Flavescence dorée hastalığı, sağdaki figür Bois Noir hastalığı (CABI , 2024). 19

Şekil 2.14: Bazı meyve ağaçlarında fitoplazma hastalıkları, (A) Armut ağacında Pear Decline hastalığı, (B) Şeftali ağacında filodi, (C) Badem ağacında cadı süpürgesi (D) Erik ağacında European stone fruit yellow hastalığı (Fiore ve diğ., 2018; CABI 2024).....	20
Şekil 2.15: LAMP analizinin çalışma prensibi (NEB).	32
Şekil 2.16: ddPCR mutlak miktar tayini formülü.....	34
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan primerlerin hedefledikleri bölgeler ve uzunlukları.....	40
Şekil 3.2: Plazmid kopya sayısı hesaplama formülü.	43
şekil 3.3: ddPCR akış şeması (Bio-rad).....	44
Şekil 3.4: İdeal ddPCR amplifikasyon grafiği.....	45
Şekil 4.1: Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinde gözlemlenen filodi semptomu.	46
Şekil 4.2: Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinde gözlemlenen indirgenmiş çiçek yapısı.	47
Şekil 4.3 Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinde gözlemlenen gövdede tomurcuklanma.	47
Şekil 4.4: Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinde gözlemlenen morarma semptomu.	48
Şekil 4.5: Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinde gözlemlenen bozuk çiçek yapısı ve morarma semptomu.....	48
Şekil 4.6: Farklı fitoplazma DNA'larının <i>Taq</i> polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	49
şekil 4.7: Farklı fitoplazma DNA'larının <i>AmpliTaq</i> polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	49
şekil 4.8: Farklı fitoplazma DNA'larının <i>EpisoZyme Taq</i> polimeraz (KTK) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	50
şekil 4.9 Farklı fitoplazma DNA'larının <i>KOD</i> polimeraz (KTK) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	50
şekil 4.10: Farklı fitoplazma DNA'larının <i>Q5</i> polimeraz (NEB) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	51
şekil 4.11: Farklı fitoplazma DNA'larının <i>Phusion</i> polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü	51

şekil 4.12: R16F2n/R2 primeri ile yapılan nested-PCR analizi sonucu. L: ladder, 1: <i>S. lycopersicum</i> (1 saat), 2: <i>S. lycopersicum</i> (gece boyu), 3: Pozitif kontrol, 4: NTC (non-template kontrol).....	52
şekil 4.13: Aktarımı gerçekleşen <i>E. coli</i> dh5 α kolonileri	53
Şekil 4.14: R16F2n/R2 primeri ile yapılan PCR analizi sonucu. L: ladder, 1-5: Plazmid, 6: Pozitif kontrol, 7: NTC (non-template kontrol).	54
Şekil 4.15: Birleştirilmiş sekans verisinin haritası	56
Şekil 4.16: Birleştirilmiş sekansın BLAST analizi sonucu.	57
Şekil 4.17: Birleştirilmiş sekansın BLAST analizi sonucu.	58
şekil 4.18: pDRAW32 ile gerçekleştirilen sanal RFLP analizi. A. Yılmaz ve ark. (2019) MK209688.1; B. Domatesten elde edilen sekans; C. Referans sekans AY390261.	59
Şekil 4.19: SybrGreen tabanlı gerçekleştirilen analize ait amplifikasyon grafiği. PC, pozitif kontrol; NTC, non-template kontrol; NC, negatif kontrol.	59
Şekil 4.20: Probe tabanlı gerçekleştirilen analizlere ait amplifikasyon grafiği. A, Christensen ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu primer (16S); B, Hren ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu primer (UNI); PC, pozitif kontrol; NTC, non-template kontrol; NC, negatif kontrol.	60
Şekil 4.21: PCR ürünü kullanılarak hazırlanan standart eğri (n=6, p<0.05).	61
Şekil 4.22 Fitoplazma pozitif domates bitkisinden izole edilen ve ardışık seyreltme yapılarak DNA ile gerçekleştirilen qPCR’da elde edilen kopya sayısı grafiği (n=6, p<0.05)	61
şekil 4.23: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR amplifikasyon grafiği	62
Şekil 4.24: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR kopya sayısı grafiği.....	63
Şekil 4.25: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR droplet sayısı grafiği	63
Şekil 4.26: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR amplifikasyon grafiği	64
Şekil 4.27: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR kopya sayısı grafiği	65
Şekil 4.28: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR droplet sayısı grafiği.....	65
Şekil 4.29: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR amplifikasyon grafiği	66
Şekil: 4.30: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR kopya sayısı grafiği	67

Şekil 4.31: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR droplet sayısı grafiği	67
Şekil 4.32: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR amplifikasyon grafiği	68
Şekil 4.33: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR kopya sayısı grafiği	69
Şekil 4.34: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR droplet sayısı grafiği.....	69
Şekil 4.35: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR amplifikasyon grafiği	70
Şekil 4.36: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR kopya sayısı grafiği	70
şekil 4.37: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR analizi sonucu elde edilen mutlak kopya sayısı	71
şekil 5.1: ddPCR ve gzPCR’da elde edilen kopya sayılarının karşılaştırılması	76

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan evrensel nested-PCR primerleri.....	25
Tablo 2.2: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik nested-PCR primerleri.....	26
Tablo 2.3: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan evrensel gerçek zamanlı PCR primerleri.....	28
Tablo 2.4: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik gerçek zamanlı PCR primerleri.....	28
Tablo 3.1: Nested-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları.....	41
Tablo 3.2: Nested-PCR reaksiyon koşulları.....	41
Tablo 3.3: GZ-PCR ve ddPCR analizlerinde kullanılan primer/probe sekansları (Christensen ve diğ., 2004; Hren ve diğ., 2007).....	43
Tablo 3.4: GZ-PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	43
Tablo 3.5: ddPCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.....	45
Tablo 4.1: Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bitkisinden izole edilen DNA'nın NanoDrop sonuçları.....	52
Tablo 4.2: Aktarımı başarılı şekilde gerçekleşen plazmidlerin NanoDrop sonuçları.....	54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Santigrat
M	: Molar
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

EDTA	: Etilen diaminetetraasetik asit
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
UV	: Ultraviyole
TBE	: Tris-borate EDTA
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FİTOPLAZMALARIN KANTİTATİF TESPİTİ İÇİN DROPLET DİJİTAL PZR (ddPZR) TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yiğit Sabri ÜNLÜ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Işıl TULUM

Fitoplazmalar, zorunlu bitki patojeni olup, Mollicutes sınıfında yer alan hücre duvarı olmayan ve kültüre alınamayan Gram-pozitif bakterilerdir. Dünya genelinde 1000 kadar bitkiyi enfekte ederek önemli ölçüde verim kaybına ve ekonomik zararlara neden olmaktadır. Ayrıca fitoplazmalara karşı etkin bir tedavi mekanizması bulunmamakta olup hastalığın yayılmaması adına enfekte bitkiler sahadan uzaklaştırılmaktadır. Ancak fitoplazmaların tespiti hastalığın ileri aşamalarında mümkün olduğundan bu hastalığı erken evrelerinde tespit edebilecek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde fitoplazma semptomları 2021 yazında Erzincan bölgesinde gözlemlenmiştir. Bu semptomların fitoplazma ile ilişkisini belirlemek amacıyla 16S rDNA bölgeleri hedef alınarak moleküler analizler gerçekleştirilmiştir. Kısaca, semptomatik domates örneklerinden izole edilen DNA evrensel fitoplazma primerleri (P1/P7 ve R16F2n/R2) ile nested-PCR tekniği ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri sekanslanarak BLAST ve sanal RFLP analizlerine tabi tutulmuştur. Analiz sonuçlarına göre domates bitkisinin *Candidatus Phytoplasma trifolii* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda *Ca. P. trifolii* ile enfekte olmuş DNA örnekleri kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve droplet dijital PCR (ddPCR) analizleri gerçekleştirilerek mutlak miktar tayinleri yapılarak iki yöntem arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur. Sonuç olarak 16S rDNA bölgeleri hedef alınarak evrensel fitoplazma primerleri ile ilk defa ddPCR analizleri gerçekleştirilmiş olup fitoplazma gibi bitki içerisinde düşük titrelerle sahip organizmalar için ddPCR yönteminin daha ideal bir yöntem olduğu ve daha hassas mutlak miktar tayini yapabildiği belirlenmiştir. Böylece fitoplazma ile enfekte

olmuş bitkiler semptom göstermeden tespit edilerek hastalığın yayılmasının engellenmesi ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

Temmuz 2024, 116. sayfa.

Anahtar kelimeler: ddPCR, Mutlak miktar tayini, Fitoplazma, erken tespit, Ca. P. trifolii



SUMMARY

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT of DROPLET DIGITAL PCR (ddPCR) TECHNIC for QUANTITATIVE DETECTION of PHYTOPLASMAS

Yiğit Sabri ÜNLÜ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Işıl TULUM

Phytoplasmas are obligate plant pathogens which belonging to the class *Mollicutes* that are cell wall-less Gram positive bacteria and cannot be cultured. They infect over 1000 plants world-wide causing significant yield loss and economic losses. Moreover, there is no effective treatment against phytoplasmas and best countermeasures are removing infected plants to prevent further spreading of the disease. Unfortunately, phytoplasmas can only be detected in the late stages of the diseases, so there is a need for methods that can detect the disease in its early stages. Phytoplasma symptoms in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants were observed in Erzincan region in the summer of 2021. In order to determine the associations of these symptoms with phytoplasma, molecular analyses were performed by targeting 16S rDNA regions. Briefly, DNA isolated from symptomatic tomato samples was amplified by nested-PCR with universal phytoplasma primers (P1/P7 and R16F2n/R2). The PCR products were sequenced and subjected to BLAST and virtual RFLP analysis. Based on the results of the analysis, tomato plants were found to be infected with Candidatus Phytoplasma trifolii. In this study, Ca. P. trifolii-infected DNA samples were quantified using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and droplet digital PCR (ddPCR) and the differences between the two methods were demonstrated. As a result, ddPCR analyses were performed for the first time with universal phytoplasma primers targeting 16S rDNA regions and it was concluded that ddPCR method is a more suitable method for organisms with low titers in the plant such as phytoplasma and can make more precise absolute quantification. By this way, it is aimed to prevent the

spread of the disease and prevent economic losses by detecting plants infected with phytoplasma before they show symptoms.

July 2024, 116. pages.

Keywords: ddPCR, Absolute quantification, Phytoplasma, Early detection, *Ca. P. trifolii*



1. GİRİŞ

Floem dokusu ile sınırlı bitki patojenleri iklim değışiklikleri ve giderek artan tarımsal ticaret sistemleri ile hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Potato leafroll virüsü, Citrus tristeza virüsü, *Candidatus Arsenophonus* sp. ve Mollicutes sınıfına dahil *Spiroplasma citri*, *Spiroplasma kunkeii* ve *Candidatus Phytoplasma* sp. floem dokusu ile sınırlı patojenler arasında yer alan bazı önemli patojenlerdir. Bu patojenlerin bitki içerisinde tespit edilmesinin zor olmasının yanı sıra enfekte olmuş bitkilerde değışken ve yavaş gelişen semptomlara sahip olması ayrı bir araştırma zorluğunu temsil etmektedir. Floem dokusu ile sınırlı bu bitki patojenleri için mevcut tedavi yöntemleri genellikle önleyici yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısı ile bu patojenlerin erken teşhisi oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca floem dokusundan beslenen böcekler aracılığı ile yayıldıklarından dolayı bitki ve böceğı kapsayan karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptirler.

Candidatus Phytoplasma türleri *Mollicutes* sınıfına dahil olan, hücre duvarı bulunmayan, gram pozitif ve minimal genoma sahip bakterilerdir. Enfekte ettikleri bitkilerde cücelik, kısırlık, sarılık, viresens, cadı süpürgesi, filodi gibi çeşitli semptomlara neden olarak önemli ölçüde ürün kayıplarına yol açmaktadırlar. Özellikle tarımsal bitkiler olmakla birlikte 1000’den fazla bitkiyi enfekte eden bu organizmalara dair ilk kayıtlar 1000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Ancak bilimsel anlamda varlıkları 1967 yılında kanıtlanmıştır. Günümüzde hala başarılı bir şekilde kültüre alınamayan bu organizmaların tespiti gelişen moleküler teknikler yardımıyla yapılmaktadır. Diğer bakterilerde olduğu gibi geleneksel sınıflandırma sistemi kültüre alınamayan organizmalarda geçerli olmamaktadır. Dolayısı ile bu bakterilerin sınıflandırılması ribozomal DNA sekansına ve bu bölgenin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi’ne göre yapılmaktadır.

Fitoplazmaların teşhisi günümüzde ağırlıklı olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı olup güncel teknikler ile desteklenmektedir. Her ne kadar moleküler teşhiste PCR altın standart olarak kabul edilse de fitoplazmaların konukçu içerisindeki titresinin düşük olması sebebiyle fitoplazmalar için hassasiyeti oldukça düşüktür. Dolayısı ile Droplet Dijital PCR (ddPCR) gibi keskinliği ve hassasiyeti yüksek yeni nesil PCR sistemleri ile desteklenmeleri önem arz etmektedir. Diğer dijital PCR sistemlerinden farklı olarak reaksiyon karışımını 20.000

parçacığa bölerek analiz eden bu sistem çok düşük titrasyonda bile fitoplazmaları tespit edebilecek kapasitededir. Ayrıca herhangi bir harici standarda ihtiyaç duymadan poisson istatistiğinden faydalanarak miktar analizi de yapabilmektedir. Dolayısı ile hastalığın erken evrelerinde, semptomlar tam anlamıyla belirginleşmeden bile enfekte olmuş bitkiler tespit edilebilecek ve sahadan uzaklaştırılarak hastalık kontrolüne katkı sağlayacaktır. Yukarıda bahsedildiği üzere floem dokusu ile sınırlı bitki patojenleri için etkin bir tedavi mekanizması olmadığından dolayı erken teşhis bu patojenler ile mücadelede kilit rol oynamaktadır.

ddPCR sistemleri kullanılarak fitoplazmaların teşhisine dair raporlar oldukça az olup tüm fitoplazmaları tespit edebilecek evrensel bir metot henüz oluşturulmamıştır. Dolayısı ile tez çalışması kapsamında fitoplazmaların tespitinde kullanılan evrensel primerler ddPCR analizlerine entegre edilerek evrensel bir metot oluşturulması hedeflenmiş ve güncel olarak kullanılan gerçek zamanlı PCR ile kıyaslanmıştır. Elde edilen veriler ışığında; mevcut literatüre katkıda bulunmak ve ülkemiz için de önem arz eden tarım sektörünün fitoplazma kaynaklı ekonomik kayıplara uğramaması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MOLLICUTES SINIFI VE MİNİMAL GENOM

Mollicutes sınıfı, dört takım, beş aile, sekiz cins ve yaklaşık 200 türle temsil edilmektedir. Mollicutes sınıfının üyeleri, mikoplazmalar, spiroplazmalar, fitoplazmalar, akeloplazmalar, üreaplazmalar, mezoplazmalar, entoplazmalar, asteroplazmalar ve anaeroplazmalardır. Bu organizmalar doğada yaygın olarak insanlarda, memelilerde, sürüngenlerde, balıklarda, eklembacaklılarda ve bitkilerde parazit olarak yaşamlarını sürdürürler. Mollicutes sınıfı, gen silinmesi yoluyla clostridial benzeri Gram-pozitif hücrelerden evrimleşmiştir. Bu sınıfın karakteristik özelliklerinden biri de genomları Adenin-Timin (A-T) açısından zengin olmalarıdır (Waites ve Xiao, 2015).

Ökaryotik konakçılarıyla birlikte evrimleşmeleri sırasında Mollicutes üyeleri, hücre duvarı sentez enzimlerini, amino asitler, nükleotidler ve lipidler gibi küçük metabolitlerin sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genleri aşamalı olarak kaybetmişler, bu durum indirgeyici evrim (reductive evolution) olarak da adlandırılmaktadır (Grosjean ve ark., 2014).

Yaklaşık 605 milyon yıl önce indirgeyici evrim ile ayrılmaya başlayan mollicutes sınıfı zaman içinde kendi aralarında da ayrılmaya başlamışlardır. Mollicutes sınıfının atasal üyeleri büyük ihtimalle zorunlu parazit olmamakla birlikte 470 milyon önce *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Phytoplasma* (AAP) ve *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* (SEM) olmak üzere filogenetik olarak iki klada ayrılmıştır. Günümüzde ise bu sınıfın üyelerinin büyük çoğunluğu zorunlu parazit olarak yaşamlarını sürdürmektedirler (Sasaki, 2006). Bunun sonucunda 580-1,840 Kbp uzunluğunda genoma sahip olarak bilinen en küçük genomlu canlılar arasında yerlerini almışlardır. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* gibi model organizmalarda ise sırasıyla 4,639 ve 4,215 Kbp büyüklüğünde genoma sahiptirler. Bu nedenlerden dolayı bazı Mollicutes üyeleri, bir hücrenin temel işleyişini daha iyi anlamak için minimal genoma sahip sentetik hücrelerin geliştirilmesine ön ayak olmuştur (Grosjean ve ark., 2014).

Venter ve ekibi 1995 yılında *Mycoplasma genitalium*'un tüm genomunu yayınlamışlardır. 2010 yılında ise Craig Venter enstitüsü tarafından JCV-syn1.0 adı ile *Mycoplasma mycoides* genomu baz alınarak sentetik hücre geliştirilmiştir. JCV-syn1.0 ile yapılan çalışmalar neticesinde

2016'da JCV-syn3.0, 2019'da JCV-syn3A ve 2022'de JCVI-syn3B geliştirilmiştir (de C. Bittencourt ve ark., 2022; Perez, 2019). Sentetik hücrelerin kullanım alanları ve potansiyelleri oldukça geniştir. Temel bilim araştırmalarının yanı sıra yapay hücre üretimi, biyosensör, ilaç keşif deneyleri, ilaç iletim sistemleri çalışmalarında kullanılmaktadır (Sato ve ark., 2019; Gupta ve ark., 2019; Edmondson ve ark., 2014; Hammer ve Kamat, 2012). Gelecekte ise biyoremediyasyon gibi çevre uygulamalarında veya biyoyakıt üretimi için materyal olarak kullanılması da söz konusudur. Ayrıca fitoplazma gibi kültüre alınamayan ve zorunlu parazit olan organizmaların hastalık mekanizmalarının, konukçu-patojen etkileşiminin aydınlatılabilmesi ve etkin bir tedavi mekanizmasının geliştirilmesinde önemli bir role sahiptirler.

Günümüzde hastalık açısından en sık karşılaşılan ve risk faktörü en yüksek Mollicutes üyeleri mikoplazmalar, spiroplazmalar ve fitoplazmalardır. Bu üç cins ait olduklarını sınıfın karakteristik özelliklerini taşımaktadırlar. Genomları A-T açısından zengin, gram-pozitif ve hücre duvarsız organizmalardır.

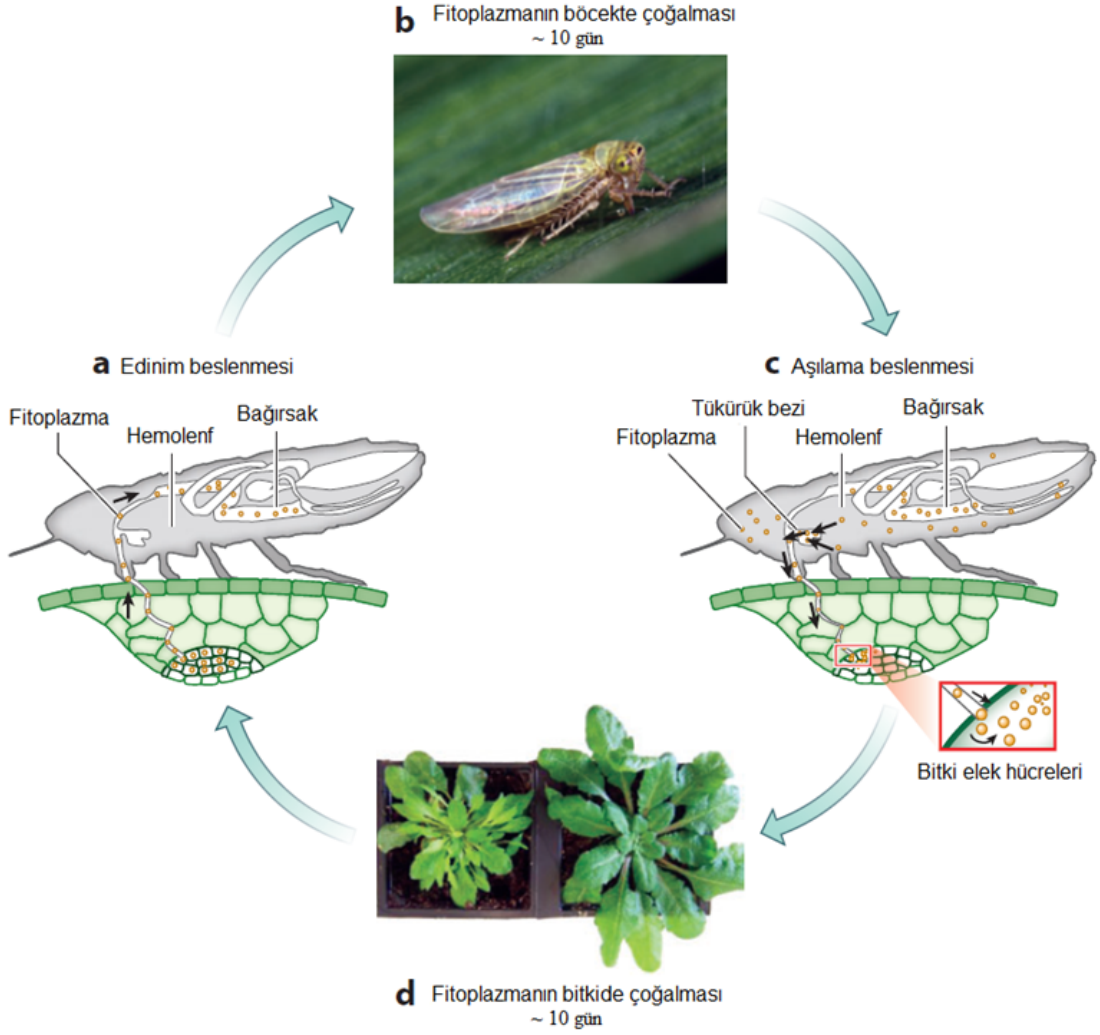
Mikoplazmalar geniş çapta semptomlara ve hastalıklara sebep olan zorunlu parazitlerdir (Lanao ve diğ., 2019). 100'den fazla mikoplazma türü tanımlanmış olup insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedirler (Citti ve Blanchard, 2013). *Mycoplasma gallisepticum* kuşlarda, *M. pulmonis* kemirgenlerde, *M. bovis* sığırlarda, *M. capricolum* keçi ve koyunlarda, *M. hyopneumoniae* domuzlarda, *M. mobile* balıklarda, *M. penetrans* ve *M. genitalium* insanlarda, *M. pneumoniae* insanlarda ve hayvanlarda hastalık yapmaktadır (Saraya ve ark., 2014; Sasaki, 2006; Jensen ve ark., 2022; Sasaki ve ark., 2002; Adan-Kubo ve ark., 2012).

Spiroplazmalar ise mikoplazmalardan biraz daha farklı olarak bazı bitki türlerini de enfekte etmektedirler. Bazı türleri heliks şeklindedir ve spiralin adı verilen bir gene sahiptir (Bové ve diğ., 1993). Heliks şekli spiralin geni ile ilişkilendirilse de spiralin mutanti suşlarda gelişiminde, hareket yeteneğinde ve heliks yapısında herhangi bir değişiklik gözlenmemekle birlikte bu genin patojenite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Duret ve diğ., 2003). Günümüzde tanımlanmış 38 spiroplazma türü tanımlanmış olup en yaygın olanları şu şekildedir; *Spiroplasma citri* turuncgillerde, *S. phoeniceum* menekeşede ve *S. kunkeii* mısırdaki, *S. eriocheiris* yengeçlerde, *S. apis* ve *S. melliferum* bal arılarında hastalık yapmaktadır (Santa Olga Cacciola ve ark., 2017).

Mollicutes sınıfının sebep olduğu hastalık etmenlerinden en sık karşılaşılan bir diğerk organizma ise fitoplazmalardır. Fitoplazmalar sadece bitkilerde hastalık yapan bir organizma cinsi olup 1000’den fazla bitkiyi enfekte etmektedirler. Kùltùre alınamayan organizmalar için “Candidatus” terimi kullanılmaktadır. Fitoplazmalar da kùltùre alınamayan organizmalar arasında yer aldığından dolayı literatürde “*Candidatus Phytoplasma*” (*Ca. P.*) olarak geçmektedirler (Murray ve Schleifer, 1994).

2.2. CA. PHYTOPLASMA

Fitoplazmalar mollicutes sınıfına dahil, boyutları 200-800 nanometre (nm) arasında, hücre duvarsız ve polimorfik şekilde, bitki floem ve böcek hemolenf dokusunun sağladığı izotonik ortamda çoğalan ve yaşayan, 680-1600 kb arasında oldukça düşük ve genoma sahip organizmalardır (Bertaccini, 2014). Zorunlu parazit olan fitoplazmalar yüzlerce bitkide, birçoğı öldürücü olan hastalıklara sebep olarak Hemiptera takımına dahil vektör adı verilen floemden beslenen böcekler aracılığı ile yayılmaktadırlar (Kube ve diğ., 2014; Weintraub ve Beanland, 2006). Bu beslenme aracılığıyla fitoplazma, sağlıklı bitki ve hastalıklı bitki ile böcek arasında döngüsel bir yayılım göstermektedir (Şekil 2.1) (Sugio ve diğ., 2011).



Şekil 2.1: Fitoplazmaların yaşam döngüsü. (a) Böceğin hastalıklı bitkiden fitoplazmanın beslenmesi, (b) Fitoplazmanın böcek içerisinde çoğalması, (c) Hastalıklı böceğin sağlıklı bitkiden beslenerek bitkiyi enfekte etmesi, (d) Fitoplazmanın bitki içerisinde çoğalması (Sugio ve diğ., 2011).

Tarihte fitoplazmaların varlığına dair ilk kanıtlar milattan önce 1000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Antik Çin'in Song Hanedanlığı döneminde yeşil çiçeklere sahip şakayık bitkisi imparatorluğun en değerli ve en güzel çiçeği olarak kabul edilmekteydi (Şekil.2.2) (Namba, 2019). Ancak fitoplazmalara dair ilk bilimsel kanıtlar 1967 yılında Doi ve arkadaşlarının elektron mikroskopunda mikoplazma benzeri organizmalar keşfetmesiyle gerçekleşmiştir (Doi ve diğ., 1967). O tarihlerde bu organizmalar "Mikoplazma Benzeri Organizma" (MLO) olarak adlandırılmaya başlamıştır (Bertaccini, 2022). 1993 yılına gelindiğinde ise Uluslararası

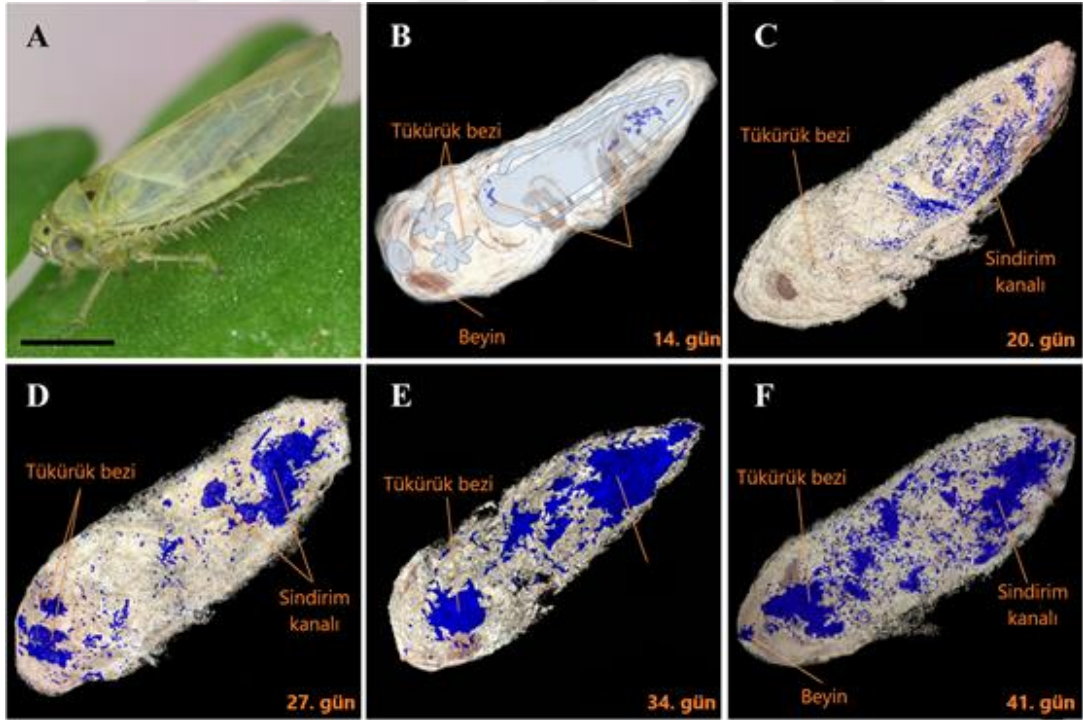
Sistematik Bakteriyoloji Komitesi (ICSB) tarafından ilk isimlendirilmesi yapılarak “Phytoplasma” olarak kayıtlara geçmeye başlamıştır (ICSB, 1993). Ancak fitoplazmalar kültüre alınamayan bakterilerdir ve kültüre alınamayan bakteriler için “candidatus” terimi ortaya atılarak fitoplazmalar “Candidatus Phytoplasma” olarak isimlendirilmişlerdir (Murray ve Schleifer, 1994).



Şekil 2.2: Fitoplazma hastalığına dair en eski kayıt, sağ ortadaki çiçek viresens semptomları göstermektedir (Namba, 2019).

2.3. CA. PHYTOPLASMA VEKTÖRLERİ

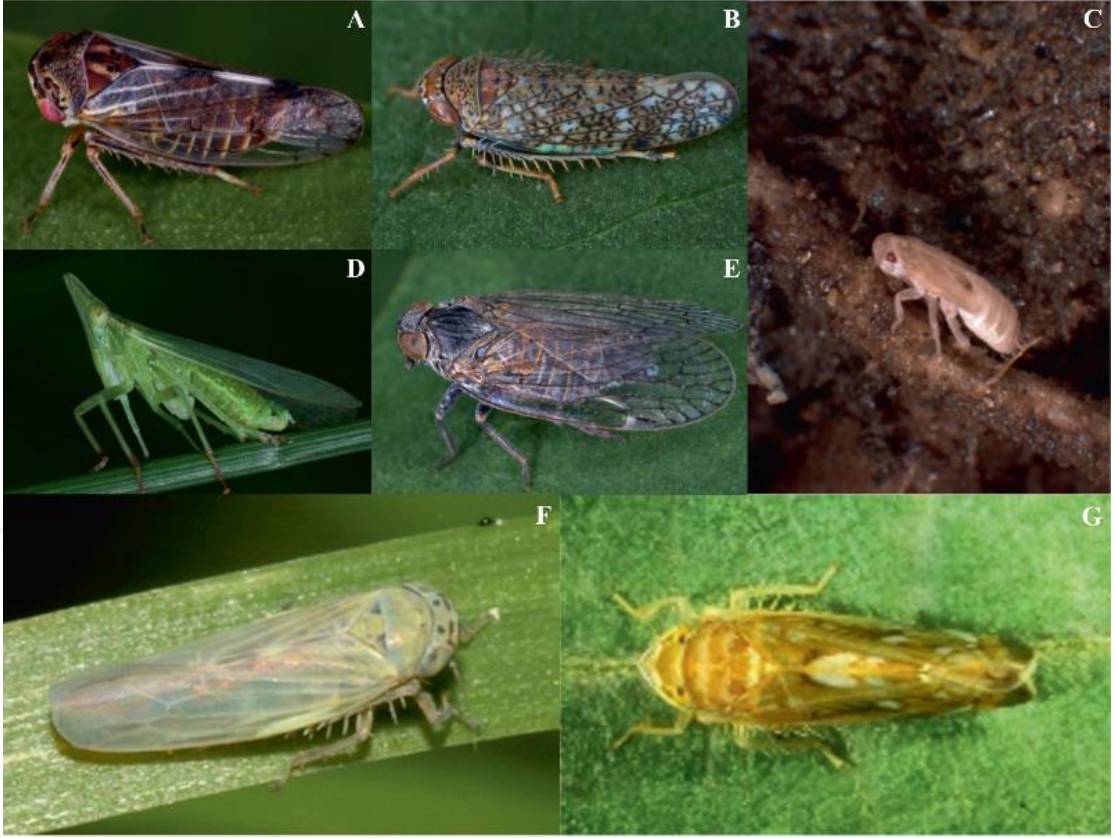
Günümüzde toplamda 37 gruba ayrılmış fitoplazmalar olmasına karşın 37 gruptan sadece 16 adet grup fitoplazma vektörleri ile ilişkilendirilebilmiştir. Fitoplazmalar bitki floem dokusu ile sınırlı olduklarından yayılımları ve ikincil konukçuları da floem dokusu ile beslenen bu böcekler aracılığı ile olmaktadır ve vektör olarak anılmaktadırlar. Hemiptera takımına dahil olan bu vektörler Aphrophoridae, Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Derbidae, Dictyopharidae, Flatidae, Issidae, Lophopidae, Nogodinidae, Ricaniidae, Psyllidae ve Triozidae familyalarına ait üyelerden oluşmaktadır (Trivellone ve Dietrich, 2021). Koinuma ve meslektaşlarının (2020) yapmış olduğu çalışmada fitoplazmaların vektör içerisinde hastalıklı bitkiden edinim beslenmesini gerçekleştirmesini takiben sindirim kanalından 7 gün içinde bağırsağa geçtiğini ve burada çoğaldığını, akabinde hemolenf dokusuna ve tükürük bezlerine yayılarak 28 içinde vektörün içinde yayılmaya devam ettiğini 41. günde beyin dokusuna kadar ilerlediği immühistokimyasal boyama yöntemi ile gösterilmiştir (şekil 2.3)(Koinuma ve diğ., 2020).



Şekil 2.3: *Macrosteles striifrons* vektöründe fitoplazmanın gün bazında dağılımı. Mavi sinyaller fitoplazma varlığını belirtmektedir. Ölçek, 1mm. (Koinuma ve diğ., 2020).

Fitoplazmalar bitkidekinin aksine vektör konukçularında olumsuz etkileri yok denecek kadar azdır. Bazı yaprak bitlerinde ölümcül olmakla birlikte diğer konukçularında herhangi bir etki yaratmamaktadır. Hatta bazı durumlarda vektör yararına olmaktadır. Yaşam süresinin uzaması, yumurta sayısının fazlalaşması, açlığa ve olumsuz sıcaklıklara toleras geliştirmesi bu faydalardan bazılarıdır. Bir başka örnek ise mısır zararlısı olan *Dalbulus maidis*'in fitoplazma ile enfekte olduktan sonra beslenme alışkanlığında değişikliğe giderek mısır dışında kabak gibi diğer bitkiler ile de beslenmeye başlamasıdır. Benzer şekilde 9 farklı vektörün de beslenme alışkanlığını değiştirdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Hogenhout ve diğ., 2008).

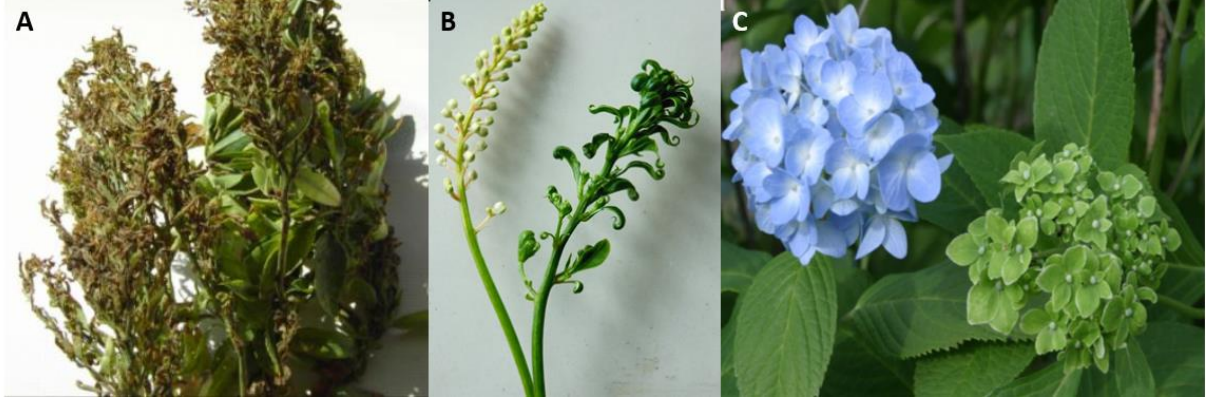
Fitoplazmaların yayılmasında ana etken vektör olmasına karşın vejetatif çoğaltma ya da hastalıklı dokudan aşılama, vasküler dokuya erişimi olan küsküt otu (*Cuscuta europaea*) gibi parazit bitkiler aracılığı ile de yayılmaktadırlar (Weintraub ve Beanland, 2006; (Rid ve diğ., 2016). Küresel anlamada yayılmaları ise bazı durumlarda ise ithalat-ihracat yolu ile olmaktadır. 1958 yılında Kuzey Amerika'dan ithal edilen asmalarda *Scaphoideus titanus* larvaları ile birlikte Flavescence Dorée hastalığı Avrupa'ya tanıtılmış oldu (Chuche ve Thiéry, 2014). Yaygın olan vektörlere baktığımızda ise *Scaphoideus titanus*, *Oncopsis alni*, *Dictyophara europaea*, *Orientus ishidae*, *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus panzeri*, *Macrosteles quadrilineatus* görülmektedir (Şekil 2.4) (Alma ve diğ., 2019).



Şekil 2.4: Bazı fitoplazma vektörleri, (A). *Oncopsis alni*, (B). *Orientus ishidae*, (C). *Hyalesthes obsoletus*, (D). *Dictyophara europaea*, (E). *Reptalus panzeri*, (F). *Macrosteles quadrilineatus* (G). *Scaphoideus titanus* (Alma ve diğ., 2019).

2.4. CA. PHYTOPLASMA HASTALIKLARI VE HASTALIK FAKTÖRLERİ

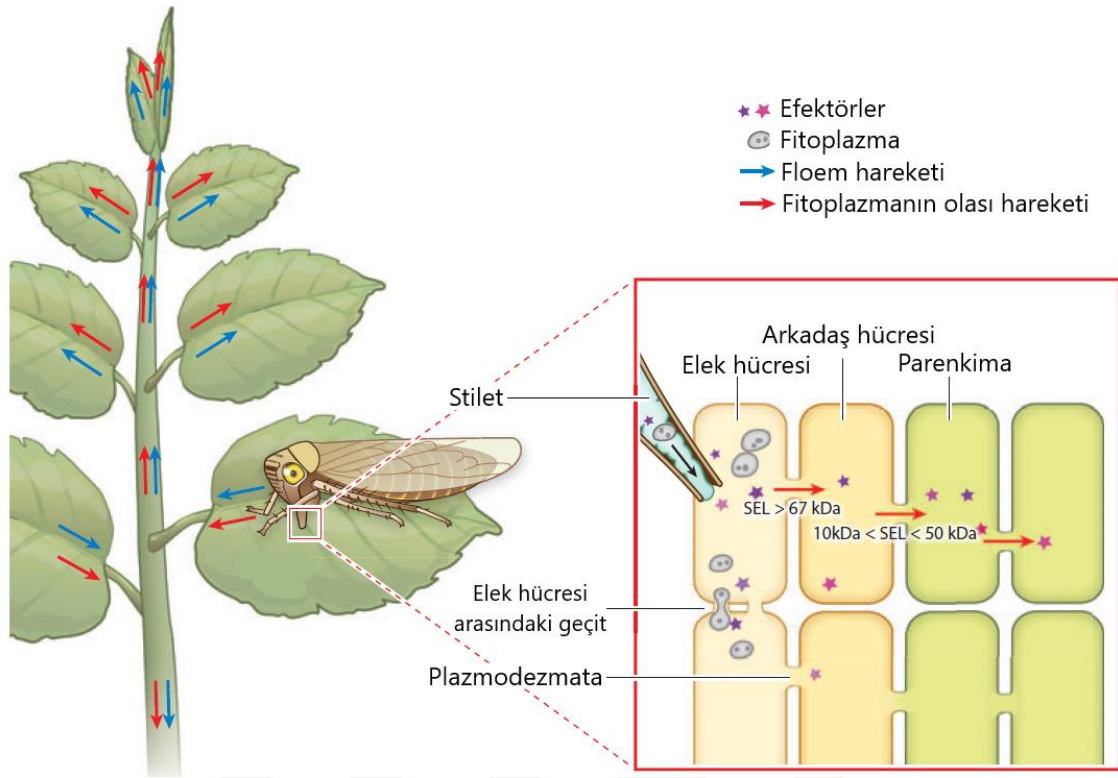
Fitoplazmalar bitki içerisinde floem dokusunda lokalize olmaktadır ve bitki içerisindeki miktarları oldukça düşüktür ve bu miktar odunsu bitkilerde daha da düşüktür (Berges ve diğ., 2000). Ancak bu kadar düşük miktarlarda bile bitkilerde ölümle sonuçlanan ciddi semptomlara ve hastalıklara sebep olmaktadır. Bu semptomlar; yaprak sarılığı (yellowing disease), fillodi (phyllody), viresens (virescence), cadı süpürgesi (witches-broom), yüksek miktarda karbonhidrat içeren olgun, kalın, kırılğan ve kıvrık yapraklar, küçük ve buruşuk yapraklar, kalınlaşmış odun dokusu, floem veya damar nekrozu, soluk veya mor renkli damar yapısı, normalden daha kısa ve kalın yaprak sapları, indirgenmiş meyve yapısı, apikal meristemlerde oluşan rozet yapısı, cücelik şeklinde sıralanabilir (Ermacora ve Osler, 2019). Bitkilerde fitoplazma kaynaklı meydana gelen tipik semptomlar Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5: Bitkilerde fitoplazmalar kaynaklı meydana gelen tipik semptomlar, (A). Cadı süpürgesi, (B). Viresens, (C) filodi (Ermacora ve Osler, 2019; Maejima ve diğ., 2014; Zamharir, 2011).

Bu semptomlarla birlikte fitoplazmalar aynı zamanda bitkilerde bir takım fizyolojik değişikliklere de neden olmaktadır. Bunlar arasında protein ve şeker miktarında, sekonder metabolitlerde ve büyüme düzenleyicilerinde artış sayılabilir (Musetti, 2010). Tüm bu değişiklikler fitoplazmanın yararına olmakla beraber bitkinin yaşam süresini uzatır, Jasmonik asit gibi bitki savunma mekanizmasında rol oynayan moleküllerin sentezini azaltır ve bitkilerin böcekleri çekmesi artar (Minato ve diğ., 2014; Du Toit, 2014; Wei ve diğ., 2022).

Fitoplazmalar efektör adı verilen proteinler salgılayarak yukarıda bahsettiğimiz semptomlara ve hastalıklara neden olmaktadır. Bu efektörler fitoplazma genomu içinde bulunan PMU (potential mobile unit) adı verilen ve transpozon aktivitesi gösteren bölgelerden sentezlenmektedirler (Sugio ve Hogenhout, 2012). Örneğin Aster Yellow Witches-broom (AY-WB) fitoplazması için 56 adet efektör protein olduğu düşünülmektedir (Bai ve diğ., 2009). Ancak günümüzde 4 adet efektör protein deneysel olarak kanıtlanmıştır. SAP11 adı verilen efektör protein cadı süpürgesi ile ilişkilendirilirken (Sugio ve diğ., 2011); SAP54, çiçek gelişimini etkileyerek virescence ve phyllody (MacLean ve diğ., 2011); TENGU, cücelik ve cadı süpürgesi (Hoshi ve diğ., 2009); PHYL1, phyllody ile ilişkilendirilmiştir (Maejima ve diğ., 2014). Salgılanan bu efektörlerin ve fitoplazmaların bitki içerisindeki sistemik hareketi ise Şekil 2.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 2.6: Fitoplazmaların ve efektörlerin bitki içerisindeki sistemik hareketi (Sugio ve diğ., 2011).

2.5. DÜNYADA FİTOPLAZMA

Fitoplazmalar Dünya çapında 1000'den fazla bitkiyi enfekte etmektedirler (Namba, 2019). Her ne kadar floem ile sınırlı olsalar da efektör adı verilen proteinler aracılığı ile çeşitli semptomlara sebep olmaktadır. Fitoplazmalar farklı bitki türlerinde benzer semptomlarla ilişkili olabilirken aynı fitoplazma farklı bitki türlerinde farklı semptomlara neden olabilmektedir (Kumari ve diğ., 2019). Ancak genel olarak bu semptomlar, yapraklarda sarılık, kızarıklık, kıvrılma, indirgenme, damarlarda şeffaflaşma, meyve yapısında bozulma, gövdede düzleşme, büyük başak yapısı, bitkide cücelik, viresens, filoidi ve cadı süpürgesi şeklinde sıralanabilir. Coğrafik olarak yayılımlarına baktığımızda ise fitoplazmalar 5 kıtada 47 ülkede rapor edilmiştir (Şekil 2.7).

Bu yayılımları incelediğimizde fitoplazma 16SrI, 16SrII, 16SrIV ve 16SrXII grupları Dünya'da en sık rapor edilen grup olmuştur. Fitoplazmaların enfekte ettikleri bitkileri; tarımsal ürünler (tahıllar, sebzeler, meyveler ve tütün, pamuk gibi bazı endüstriyel amaçlı kullanılan bitkiler), süs bitkileri, tıbbi ve aromatik bitkiler ve orman ağaçları olarak sınıflandırabiliriz.



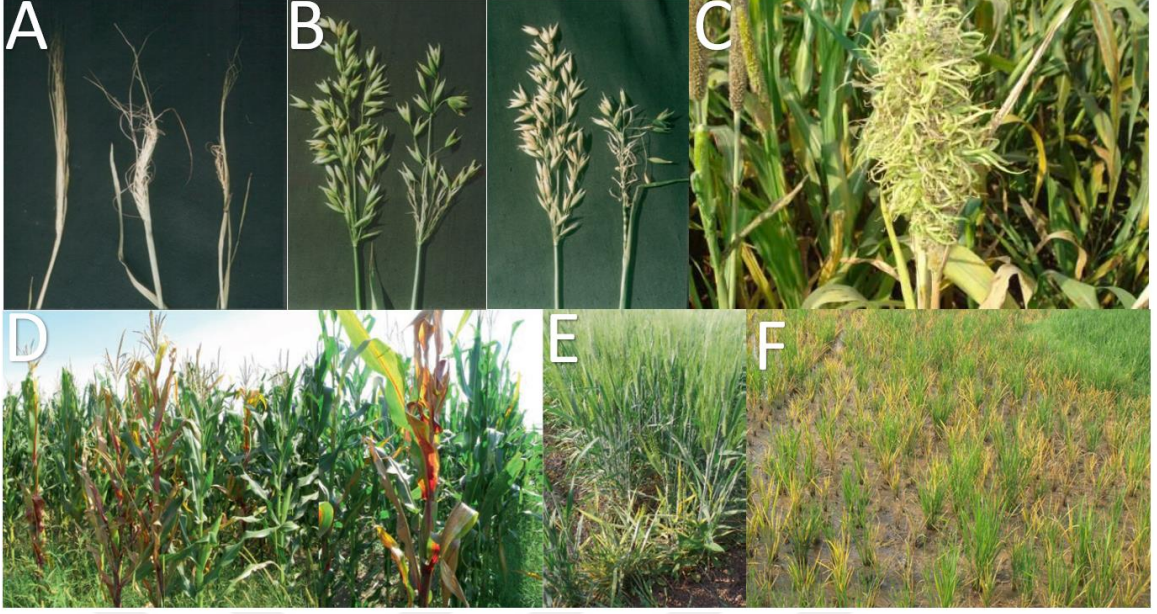
Şekil 2.7: Fitoplazmaların Dünyadaki genel dağılımı (Kumari ve diğ., 2019).

2.5.1 Tarımsal Ürünlerde Fitoplazma

Tarımsal ürünlerde fitoplazma hastalıkları dünya çapında görülmektedir. Bu raporların büyük bir bölümü Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya ülkelerinden gelmektedir. Çoğunlukla Poaceae, Apiaceae, Rosaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae familyalarına ait olmakla birlikte coğrafi dağılımları ve fitoplazma grupları büyük ölçüde farklılık göstermektedir (Martini ve diğ., 2018).

2.5.1.1. Tarla Bitkilerinde Fitoplazma

Ekonomik olarak önemli tarımsal ürünlerin başında tahıllar gelmektedir. Fitoplazma hastalığı rapor edilmiş tahıllar arasında arpa (Urbanaviciene ve diğ., 2005), mısır (de Oliveira ve diğ., 2018), darı (Kumar ve diğ., 2010), yulaf (Jomantiene ve diğ., 2002), pirinç (Pandian ve diğ., 2015) ve buğday (Rao ve diğ., 2017) gelmektedir (Şekil 2.8). Tahıllarda hastalık yapan fitoplazma gruplarının başında 16SrI grubu gelmektedir. Ancak 16SrI grubunun yanı sıra mısır bitkisinde 16SrXII-A, pirinç bitkisinde 16SrXI grubu fitoplazmalar da rapor edilmiştir.



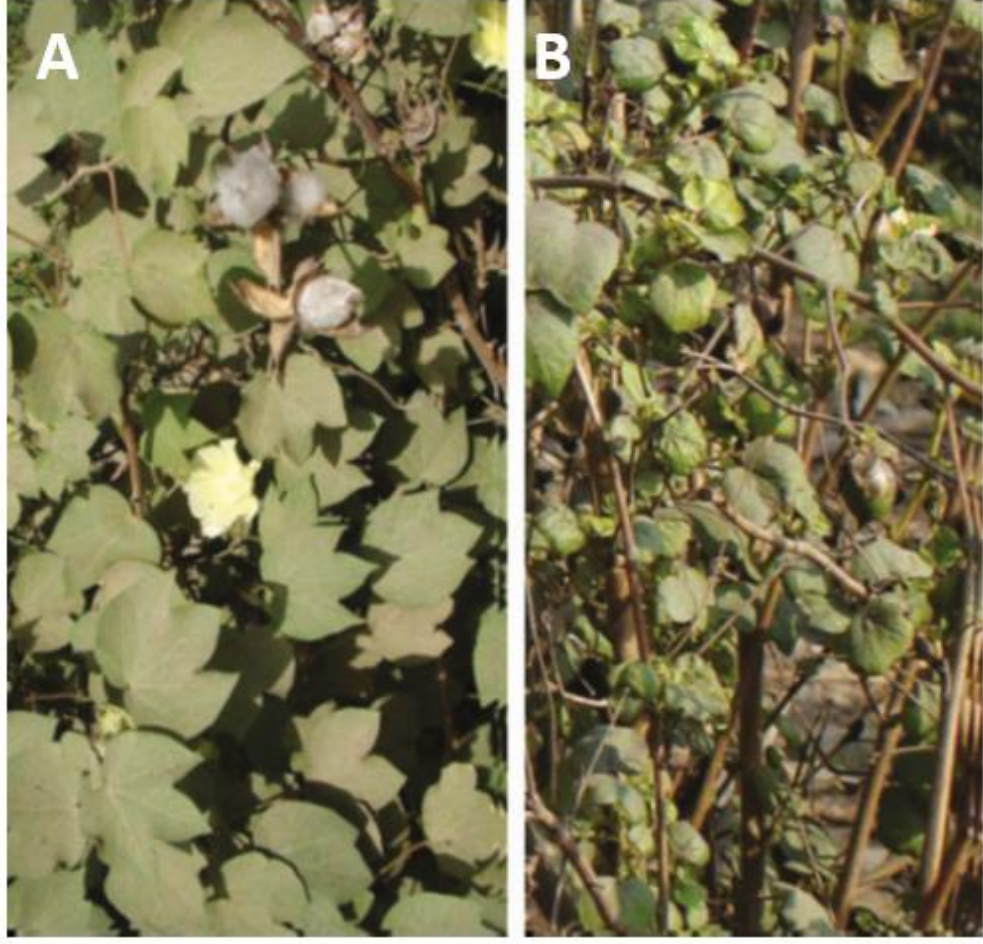
Şekil 2.8: Tahıllarda fitoplazma semptomları, (A) arpa, (B) yulaf, (C) darı, (D) mısır, (E) buğday, (F) pirinç (de Oliveira ve diğ., 2018).

Sebzeler olarak tüketilen bitkilerde özellikle 16SrXII grubu fitoplazmalar patates, biber, patlıcan ve domates gibi Solanaceae familyasına ait bitki türlerinde ciddi verim kayıpları ve zarara sebep olmaktadır (Iriti ve diğ., 2008). Ayrıca havuç, kabak, bal kabağı, salatalık, kereviz, lahana, karnabahar, marul, soya, soğan, hardal, nohut ve bakla bitkisi fitoplazma kaynaklı hastalıklardan etkilenmiş ve dünyanın her yerinden rapor edilmiş diğer tarımsal ürünler arasında yer almaktadır). Rapor edilen tipik semptomatik bitkiler ise şekil 2.9’da verilmiştir. Bu raporlarda bildirilen en yaygın diğer gruplar ise 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI’dır. Nadiren veya bitki özelinde diğer gruplar ise 16SrVIII, 16SrIV, 16SrXXXI olarak karşımız çıkmaktadır (Martini ve diğ., 2018).



Şekil 2.9: Sebze olarak tüketilen ve tipik semptom gösteren bazı bitkiler, (A) domates, (B) biber, (C) patlıcan (D) salatalık (E) soğanl (F) havuç (Martini ve diğ., 2018; Zamharir ve Azimi, 2018, Jomantiene ve diğ., 2010; Rao ve Kumar, 2017).

Pamuk bitkisi (*Gossypium hirsutum* L.) pamuk üretiminde kullanılan ekonomik değeri yüksek bir bitki olmakla birlikte fitoplazma hastalığına duyarlı bitkiler arasında yer almaktadır. Pamuk bitkisinde özellikle Hindistanda SrI grubu fitoplazma yaygın olmakla birlikte (Şekil 2.10) (Kumar ve diğ., 2010B), Mali ve Burkina Faso'da 16SrII-C ve 16SrII-F grubu fitoplazmalar rapor edilmiştir (Martini ve diğ., 2007; Marzachi ve diğ., 2009).



Şekil 2.10: Pamuk bitkisinde fitoplazma kaynaklı indirgenmiş yaprak semptomu (A) sağlıklı (B) hastalıklı (Kumar ve diğ., 2010B).

Şeker endüstrisinin ana hammadde kaynaklarından olan şeker pancarı (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *Altissima*) ve şeker kamışı (*Saccharum spp.*) bitkilerine ciddi tehdit oluşturmaktadır. Şeker üretimi endüstrisinde şeker pancarı bitkisi küresel anlamda talebin %40'ını tek başına karşılamaktadır (Leilah ve diğ., 2005). Yukarıda da bahsedildiği üzere Güney Amerika'da tarımsal ürünlerde fitoplazma kaynaklı hastalıkların ana etmeni ağırlıklı olarak SrIII grubu fitoplazmalardır ve bu grup kaynaklı şeker pancarı bitkisinde Şili'de 2001-2012 yılları arası fitoplazma kaynaklı %100'e kadar verim kaybı yaşanmıştır (Rao ve diğ., 2018). Şeker pancarında rapor edilen diğer fitoplazma grupları ise Asya'da (İran ve Hindistan) SrII grubu (Salehi ve Izadpanah, 2005; Thilagavathi ve diğ., 2011), Avrupa'da 16SrXII-A ve 16SrXII-P (Ćurčić ve diğ., 2021; Duduk ve diğ., 2003) şeklindedir. Şeker kamışı bitkisinde fitoplazma kaynaklı raporlar ise daha geniş çaptadır; birçok Asya, Amerika, Afrika ülkesi ve

Avustralya’da 16SrI, 16SrIII, 16SrXI ve 16SrXII grubu fitoplazmalar kaynaklı raporlar mevcuttur (Rao ve diğ., 2012). Semptomatik şeker pancarı ve şeker kamışı şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2.11: Şeker endüstrisinde kullanılan bitkilerde fitoplazma (A) şeker pancarı, (B) şeker kamışı (Rao ve diğ., 2018).

Her ne kadar tütün bitkisi fitoplazmaların doğal konukçusu olmasa da Liao ve arkadaşları (2022) Tayvanda filodi, viresens ve cadı süpürgesi semptomları gösteren bir *Nicotiana plumbaginifolia* bitkisine rastlamışlardır (Şekil 2.12). Yapılan moleküler teşhislere göre pozitif sonuç veren bu fitoplazmanın grubu 16SrII-V olduğu bildirilmiştir (Liao ve diğ., 2022).



Şekil 2.12: Tütün bitkisinde fitoplazma (Liao ve diğ., 2022).

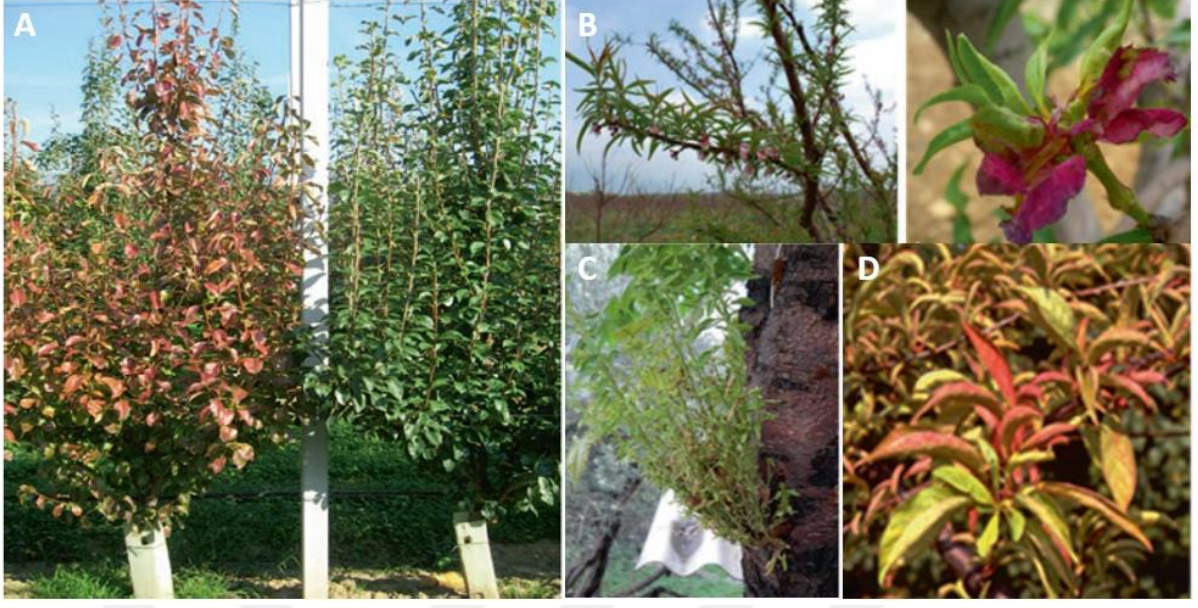
2.5.1.2. Meyvelerde Fitoplazma

Sofralık, meyve suyu ve şarap yapımında kullanılan ve dünyada oldukça önemli bir yere sahip olan asma bitkisinde de 16SrXII grubu üyesi *Ca. P. solani* Bois Noir adı verilen hastalığa sebep olmaktadır (Gruenwald ve diğ., 2004; Moussa ve diğ., 2020). Asma bitkisinde bir diğer hastalık ise Flavescence dorée hastalığı olup etkeni 16SrV üyesi olan *Ca. P. vitis*'tir (şekil 2.13) (Rizzoli ve diğ., 2022). Avustralya'ya özgü Australian Grapevine Yellow hastalığı da asmaları enfekte etmekte olup etmenleri arasında 16SII-D 16SrXII-B ve 16SrXXIV grubu fitoplazmalar bulunmaktadır (Constable ve diğ., 2002; Gibb ve diğ., 2015; Padovan ve diğ., 1995).



Şekil 2.13: Asma bitkisinde görülen fitoplazma hastalıkları, soldaki figür Flavescence dorée hastalığı, sağdaki figür Bois Noir hastalığı (CABI , 2024).

Meyve ağaçlarında fitoplazma kaynaklı hastalıklarda özellikle 16SrX grubu fitoplazmalar öne çıkmaktadır. *Ca. P. mali* Apple proliferation, *Ca. P. pyri* Pear decline ve *Ca. P. prunorum* *European stone fruit yellows* hastalığına sebep olmaktadır. Bu fitoplazmaların yanı sıra 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrIX, 16SrXII ve 16SrVX grubu fitoplazmalar da elma, armut, kiraz, vişne, erik, badem, kayısı, şeftali ve fındık, kestane, narenciye (limon, portakal, greyfurt, mandalina), nar ve hindistan cevizi ağaçlarında hastalık etmeni olarak rol oynamaktadırlar (Şekil 2.14) (Fiore ve diğ., 2018).



Şekil 2.14: Bazı meyve ağaçlarında fitoplazma hastalıkları, (A) Armut ağacında Pear Decline hastalığı, (B) Şeftali ağacında filodi, (C) Badem ağacında cadı süpürgesi (D) Erik ağacında European stone fruit yellow hastalığı (Fiore ve diğ., 2018; CABI 2024).

Yaban mersini (Starović ve diğ., 2013), kızılcık (Lee ve diğ., 2014), frenk üzümü ve çilek (Pérez-López ve Dumonceaux, 2016) gibi yumuşak meyvelerde de dünyanın farklı bölgelerinde rapor edilmiştir. Anavatanı Şili ve Arjantin olan ve murtilla (*Ugni molinae* Turcz) adı verilen yemişte cadı süpürgesi hastalığına sebep olan *Ca. P. fraxini* ve *Ca. P. ulmi* sadece Şili ile sınırlı olabilirken (Arismendi ve diğ., 2011), böğürtlende hastalığa sebep olan *Ca. P. rubi* geniş bir yayılım göstermektedir (Fiore ve diğ., 2018).

2.5.2. Süs Bitkilerinde Fitoplazma

Kesme çiçek ve süs bitkileri dünya çapında 55 milyar dolarlık bir pazara sahip olduğu tahmin ediliyor (Carvalho ve diğ., 2019). Türkiye ise 2022 yılı verileri itibarıyla bu pazarda 137,2 milyon dolarlık bir paya sahiptir (Türkiye Süs Bitkileri ve Mamülleri Sektör Raporu, 2023). Süs bitkilerinde tespit edilen fitoplazmaların sayısı küresel anlamda artan ticari faaliyetler sonucu giderek artmaktadır. Özetle, 49 farklı bitki türünde 14 farklı 16Sr grubuna ait fitoplazma kaynaklı hastalıklar dünyanın farklı yerlerinden bildirilmiştir. Bu bitkiler arasında ülkemizde de sıklıkla süs bitkisi olarak tercih edilen cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*), begonya (*Begonia spp.*), kasımpatı (*Chrysanthemum morifolium*), sıklamen (*Cyclamen persicum*), japon palmyesi (*Cycas revoluta*), ekinezya (*Echinacea purpurea*), yasemin (*Jasminum sambac*),

zambak (*Lilium longiflorum*), manolya (*Magnolia grandiflora*), düğün çiçeği (*Ranunculus sp.*), gül (*Rosa alba*) yer almaktadır (Bellardi ve diğ., 2018).

2.5.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Fitoplazma

Diğer bitkilerde olduğu gibi fitoplazmalar tıbbi ve aromatik bitkileri de enfekte etmekte ve bu durum oldukça endişe vericidir. Dünya çapında Apiaceae ve Asteraceae familyası ağırlıklı olmak üzere yaklaşık 200 kadar tıbbi ve aromatik bitkiyi etkilediği rapor edilmiş olup en çok rapor Avrupa ve Asya ülkelerinden gelmektedir. Hastalık etmeni olarak 16SrI grubu fitoplazmalar yoğun bir şekilde bildirilse de 16SrXV, 16SrXX, 16SrXXIV, 16SrXXIX, 16SrXXXII grupları da tıbbi ve aromatik bitkilerde hastalık yapmaktadır (Marcone ve diğ., 2016).

Fitoplazmalar tıbbi ve aromatik bitkilerde neden oldukları fitokimyasal değişiklikler ile öne çıkmaktadır. Fitoplazmalar enfekte etmiş oldukları bitkilerde sekonder metabolit üretimini teşvik ettiği bilinmektedir ancak genel anlamda bitkinin sağlığı açısından olumsuz etkilere sahiptir. Örneğin vinblastine adı verilen ve kemoterapi ilaçlarında kullanılan bu molekülün miktarının enfekte olmuş cezayir menekşesi bitkisinde arttığı tespit edilmiştir. Rapor edilen tıbbi ve aromatik bitkiler arasında en bilinenleri ise yonca, ginseng, fesleğen, kekik, kantaron, limon otu, datura, kenevir, sandal ağacı bulunmaktadır (Rao ve diğ., 2018).

2.5.4. Kent ve Orman Ağaçlarında Fitoplazma

Diğer bitkilerde olduğu gibi kent ve orman ağaçları da fitoplazma hastalıklarından etkilenmektedirler. Fitoplazmaların transmisyonu her ne kadar vektörler aracılığı ile olsa da aşılama veya çelik köklendirme gibi vejetatif yollarla da olabilmektedir (Dickinson ve diğ., 2013). Ülkemizde de ormanların rehabilitasyonlarında tercih edilen yöntemler arasında vejetatif yollar da bulunmaktadır (Öner ve diğ., 2016). Bu durum istenmeden de olsa fitoplazmaların yayılmalarına katkı sağlama ihtimalini artırmakla birlikte vejetatif yollarla üretimi sağlanacak olan bitkilerin üretim öncesi kontrollerinin yapılması önem arz etmektedir.

Dünyada fitoplazma kaynaklı rapor edilmiş kent ve orman ağaçlarını incelendiğinde kızılâğaç (*Alnus sp.*) (Marcone ve Rao, 2016), karaağaç (*Ulmus sp.*) (Sinclair, 2000), dişbudak ağacı (*Fraxinus sp.*) (Griffiths ve diğ., 1999), kavak ağacı (*Populus sp.*) (Mitrović ve diğ., 2011),

Çam ağacı (*Pinus sp.*) (Schneider ve diğ., 2005) ve ardıç ağacı (*Juniperus sp.*) (Davis ve diğ., 2010) yer almaktadır.

Kent ve orman ağaçlarında fitoplazma grupları diğer bitkilerde olduğundan daha az çeşitliliğe sahiptir. Bu gruplar 16SrI, 16SrIII, 16SrVI, 16SRVII, 16SrIX ve 16SrXXI olup tür adını sadece *Ca. P. pini*, *Ca. P. fraxini* ve *Ca. P. ulmi* alabilmiştir. Tür adını alabilen bu gruplara ait fitoplazmalar ise sırasıyla 16SrXXI-A, 16SrVII-A, 16SrVI grubuna dahildir (Marccone ve diğ., 2018).

2.6. TÜRKİYE’DE FİTOPLAZMA

Türkiye’de fitoplazma varlığının ilk kayıtları 1950’li dayanmaktadır. Tanrıkut (1953) hastalıklı domates bitkisi üzerinde yapmış olduğu çalışmada olası ajanın virüs olduğunu bildirmiştir ancak Sertkaya ve arkadaşları (2007) bu ajanın virüs değil 16SrXII-A grubu üyesi fitoplazma olduğunu kanıtlamıştır. Şu ana kadar Türkiye’de tarla bitkilerini, meyve ağaçlarını ve süs bitkilerini kapsayan 7 farklı ribozomal grup fitoplazma tespit edilmiştir (Çağlayan, 2023).

Türkiye’de meyve çeşitlerinde ağırlıklı olarak 16SrX grubu fitoplazmalar tespit edilmektedir. Türkiye’deki raporlara göre elma ağacında 16SrX-A (Canik ve Ertunc, 2007), armut ağacında 16SrX-C (Serçe ve diğ., 2006), kayısı ağacında 16SrX-A, 16SrX-B, 16SrX-C ve 16SrI (Çağlayan ve Gazel, 1999; Orel ve diğ., 2019;), erik ağacında 16SrX-B (Serçe ve diğ., 2006), kiraz ağacında 16SrI-B ve 16SrX-B (Çağlayan ve diğ., 2013; Karapınar ve diğ., 2021), badem ağacında 16SrX-B (Serçe ve diğ., 2006), nar ağacında 16SrI, 16SrX-C ve 16SrXII-A (Gazel ve diğ., 2016; Çağlayan ve diğ., 2017), antep fıstığı ağacında 16SrXII-A (Güldür ve diğ., 2018), böğürtlen 16SrV-E (Sertkaya ve diğ., 2003), asmada 16SrIX ve 16SrXII-A (Canik ve diğ., 2011) tespit edilmiştir.

Tarla bitkilerinde ise patatest 16SrI-B ve 16SrXII-N (Ertunc ve diğ., 2015; Eroglu ve diğ., 2010), domatest 16SrVI-A ve 16SrXII-A (Sertkaya ve diğ., 2007, Usta ve diğ., 2018), biberde 16SrVI-A (Sertkaya ve diğ., 2007), patlıcanda 16SrVI-A ve 16SrXII-A (Sertkaya ve diğ., 2007; Çağlar ve diğ., 2010), salatalıkta 16SrVI-A ve 16SrXII-A (Usta ve diğ., 2017), mısırd 16SrXIV-A (Çağlar ve diğ., 2019), susamda 16SrII-D, 16SrVI-A ve 16SrIX-C (Sertkaya ve diğ., 2007; Ikten ve diğ., 2014) ve son olarak lahanada 16SrVI-A (Serçe ve Yılmaz, 2020) tespit edilmiştir.

Süs bitkileri ve orman ağaçları hakkında Türkiye’de fazla rapor olmamakla birlikte süs narında 16SrIX-C ve 16SSrXII-A (Çağlayan ve diğ., 2019), kadife çiçeğinde 16SrXII-A (Alp ve diğ., 2016) tespit edilmiştir. Ayrıca ilk defa nergis bitkisinde 16SrX-A tespit edildiği de gelen raporlar arasındadır (Boztas ve diğ., 2024). Ardiç ağacında da fitoplazma tespit edilmiş olup bu fitoplazmaya en yakın grup 16SrXXV-A olarak belirlenmiştir. Ancak, benzerlik kat sayısı 0.6 olup eşik değerine (0.85) yaklaşmadığı için kesin bir grup ataması yapılamamıştır (Çağlar ve diğ., 2024).

2.7. CA. PHYTOPLASMA TEŞHİSİ

Fitoplazmalara karşı etkin bir tedavi mekanizması olmadığından dolayı sadece hastalığın yayılmaması için vektörlerin öldürülmesi ve hastalıklı bitkilerin uzaklaştırılması şeklinde bir karşı önlem alınmaktadır. Dolayısı ile fitoplazmaların sahada etkili ve erken bir şekilde teşhis edilmeleri gerekmektedir.

DNA temelli bu araçların geliştirilmesi, fitoplazmaların tespiti, tanımlanması ve sınıflandırılmasında büyük bir adım olmuştur ve 16S ribozomal bölgesi fitoplazma özgü primerlerin tasarlanmasında ana hedef olmuştur (Bertaccini, 2007). Bütün prokaryotlarda olduğu gibi fitoplazmalarda da 16S ribozomal bölgesi oldukça korunmuş olmasına karşın kendi içlerinde farklılık yaratacak kadar bilgi sağlamaktadır. Fitoplazmaların tespiti, karakterizasyonu, sınıflandırılması ve dizilenmesi iyi kalitede nükleik asit preparasyonlarına ve zenginleştirilmiş fitoplazma DNA'sı elde etmeye dayanır. Bu nedenle fitoplazma DNA'sını izole etmek için, bitki fenoliklerini ve polisakaritlerini minimum konsantrasyona indirmeyi amaçlayan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir çünkü bu bileşikler PCR deneyinde kullanılan polimerazı inhibe edebilir (Marzachi ve diğ., 2004). Bu protokollerin çoğu, zenginleştirme adımı gerektirir ve bu, işlenebilecek örnek sayısını azaltarak karmaşıklıklarını artırır. Tüm bunlara rağmen elde edilen fitoplazma DNA'sı toplam DNA'nın sadece %1'ini oluşturduğundan dolayı fitoplazmaların tespiti oldukça zordur (Bertaccini, 2007).

Fitoplazma semptomu gösteren bitkiler çeşitli moleküler teknikler ile analiz edilerek hastalığı taşıyıp taşımadıkları teyit edilmektedir. Fitoplazmaların enfekte olmuş bitki florasındaki düzensiz dağılımı, düşük konsantrasyonları (özellikle odunsu konakçılarda) ve mevsime ve bitki organına göre farklılıklar etkili teşhis için önemli engellerdir. Bu nedenlerden dolayı, fitoplazmalar çok önemli bazı bitki türlerinin yetiştirilmesini ciddi şekilde tehdit etse de teşhisi

basit değildir (Firrao ve diğ., 2007). Fitoplazmaların tespiti için çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiş olup bu teknikler PCR, LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), Gerçek-zamanlı PCR ve Droplet dijital PCR (ddPCR) şeklinde sıralanmaktadır.

2.7.1. Geleneksel Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Geliştirildiği günden itibaren moleküler biyoloji ve moleküler teşhislerde altın standart olarak kabul edilen Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tıp (Valones ve diğ., 2009), veterinerlik (Mohammed ve diğ., 2015), ziraat (Hadidi ve diğ., 2017) ve su ürünleri (Ador ve diğ., 2021) alanında sıkça tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Fitoplazma DNA amplifikasyonu genellikle ribozomal operon sekansına dayanan primerlerle elde edilir, ancak bu sekanslar bitkilerin yüzeyinde bulunabilecek *Acholeplasma* spp. gibi yakın ilişkili gibi diğer bakterilerden de çoğaltabilir (Tully ve diğ., 1994). Fitoplazma miktarının gerek organizma içerisinde gerekse izole edilen total DNA'nın içerisinde çok az olmasından dolayı nested-PCR adı verilen bir teknik ortaya çıkmaktadır. Bu teknik fitoplazmalara özgü evrensel iki çift primer ile ardışık olarak gerçekleştirilen zincir reaksiyonuna dayanmaktadır (Gundersen ve diğ., 1994). Fitoplazmaların 16S ribozomal DNA geninin amplifikasyonunun ilk defa rapor edilmesiyle PCR tabanlı fitoplazma tespiti çağı başlamıştır (Deng ve Hiruki, 1991). Deng ve Hiruki (1991) tarafından P1-6 primerlerinin geliştirilmesinin ardından Lee ve diğ., (1993) tarafından R16F2n/R2 primer çifti geliştirilmiştir. Akabinde Gundersen ve Lee (1996) P7 primerini geliştirmiş ve bu primer çiftleri rutin bir şekilde fitoplazma teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır (Nair ve Manimekalai, 2021). Diğer araştırmacılar tarafından da yapılan çalışmalar neticesinde birçok evrensel ve grup spesifik primerler geliştirilerek Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de verilmiştir (Bertaccini ve diğ., 2019).

Tablo 2.1: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan evrensel nested-PCR primerleri.

Primer	Sekans (5' – 3')	Hedef bölge
P1	AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT	16S rDNA
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	23S rDNA
R0	GAATACCTTGTTACGACTTAACCCC	16S rDNA
P3	GGATGGATCACCTCCTT	16S rDNA
P4	GAAGTCTGCAACTCGACTTC	16S rDNA
P5	CGGCAATGGAGGAAACT	16S rDNA
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	16S rDNA
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	16S rDNA
F1	AAGACGAGGATAACAGTTGG	16S rDNA
B6	TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	SR
R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	16S rDNA
R16mR2	CTTAACCCCAATCATCGA	16S rDNA
P1A	AACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC	16S rDNA
16Sr-SR	GGTCTGTCAAACTGAAGATG	SR
P7A	CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	23S rDNA
PC399	AACGCCGCGTGAACGATGAA	16S rDNA
PC1694	ATCAGGCGTGTGCTCTAACC	SR
fU5	CGGCAATGGAGGAAACT	16S rDNA
rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	16S rDNA
PA2f	GCCCCGGCTAACTATGTGC	16S rDNA
PA2r	TTGGTGGGCCTAAATGGACTC	SR
M1(758F)	GTCTTTACTGACGC	16S rDNA
M2(1232R)	CTTCAGCTACCCTTTGTAAC	16S rDNA
SN910601	GTTTGATCCTGGCTCAGGATT	16S rDNA
SN910502	AACCCCGAGAACGTATTCACC	16S rDNA
1F7	AGTGCTTAACACTGTCCTGCTA	16S rDNA
7R3	TTGTAGCCCAGATCATAAGGGGCA	16S rDNA
3Fwd	ACCTGCCTTTAAGACGAGGA	16S rDNA
3rev	AAAGGAGGTGATCCATCCCCACCT	16S rDNA
7R2	GACAAGGGTTGCGCTCGTTTT	16S rDNA
5Rev	ACCCCGAGAACGTATTCACCGCGA	16S rDNA

Tablo 2.2: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik nested-PCR primerleri.

Primer	Spesifite	Sekans (5' – 3')	Hedef bölge
R16(I)F1	SrI, II, IX, XII, XV	TAAAAGACCTAGCAATAGG	16S rDNA
R16(I)R1	SrI, II, IX, XII, XV	CAATCCGAACTAAGACTCT	16S rDNA
R16(III)F2	SrIII	AAGAGTGGAAAACTCCC	16S rDNA
R16(III)R1	SrIII	TTCGAACTGAGATTGA	16S rDNA
LY16Sf	SrIV	CATGCAAGTCGAACGGAATC	16S rDNA
LY16Sr	SrIV	GCTTACGCAGTTAGGCTGTC,	16S rDNA
R16(V)F1	SrV	TTAAAAGACCTTCTTCGG	16S rDNA
R16(V)R1	SrV	TTCAATCCGTACTGAGACTACC	16S rDNA
R16(X)F1	SrX	GACCCGCAAGTATGCTGAGAGATG	16S rDNA
R16(X)R1	SrX	CAATCCGAACTGAGAGTCT	16S rDNA
fO1	SrX	CGGAACTTTTAGTTTCAGT	16S rDNA
rO1	SrX	AAGTGCCCAACTAAATGAT	16S rDNA
ECA1	SrX-B	AATAATCAAGAACAAGAAGT	16S rDNA
ECA2	SrX-B	GTTTATAAAAATTAATGACTC	16S rDNA

2.7.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PCR)

Gerçek zamanlı PCR olarak bilinen ikinci nesil PCR, patojen tespiti doğruluğunu ve güvenilirliğini artırma potansiyeli ile patojen tespiti için yeni altın standart olarak ortaya çıkmıştır (Alemu, 2014). DNA'ya bağlanan bir boya veya probe yardımıyla amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak takip edilebildiği bu sistem geleneksel PCR'ye göre daha yüksek bir hassasiyete sahip olmakla birlikte miktar tayini, gen ifadesi analizi, tek nükleotit polimorfizmi (SNP) gibi analizlerin de yapılmasına olanak sağlamaktadır (Houghton ve Cockeril, 2006). Geleneksel PCR'de olduğu gibi GZ-PCR'de tıp (Maurin, 2012), veterinerlik (Toohey-Kurth ve diğ., 2020), ziraat (Schaad ve Frederick, 2002) ve su ürünleri (Purcell ve diğ., 2011) alanında kullanımı yaygındır. Ayrıca bu yöntem birden fazla olayın aynı anda (multipleks) analizine olanak sağladığından dolayı semptomları benzer veya bir arada gözlenen hastalıkların tespitine de olanak sağlamaktadır (Qu ve diğ., 2011).

Patojenlerin etkili bir şekilde tespit edilmesi zorlu bir görevdir, bu sebeple yüksek kalitede DNA eldesi oldukça önemlidir. Fenolik bileşikler gibi kontaminantlar reaksiyonun verimli bir şekilde çalışmasını engelleyerek inhibitör görevi görmektedirler. Bu sebepten dolayı zaten düşük titrelere bulunan fitoplazmaların tespitini daha da zorlaştırmaktadır. GZ-PCR düşük miktarlarda bile mevcut olan patojenleri tespit edebilir ancak, yüksek döngü eşiği (Ct) değerleri

ile temsil edilen zayıf gerçek zamanlı PCR sinyalleri şüpheli olabilir. Bu nedenle, bir reaksiyonun yalancı pozitif veya yalancı negatif sonucunu belirlemek için güvenilir bir Ct eşiği oldukça önemlidir (Grosdidier ve diğ., 2017). Bu sebeple yukarıda bahsedilen olguların göz önünde bulundurulması oldukça önemlidir. Yaygın bir şekilde kullanılan bu yöntemde standardizasyon sağlanması adına Bustin ve diğ. (2009)'i Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması için Minimum Bilgiler (MIQE) kılavuzunu yayınlayarak bu yöntemin güvenilirliğini artırmışlardır.

Fitoplazma tespitini daha hızlı ve daha etkili bir şekilde gerçekleştirebilmek için sürekli olarak çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmaların neticesinde gerçek zamanlı PCR (gz-PCR) yönteminin fitoplazma tespiti için uygulanabilir kılınması sağlanmıştır (Bertaccini ve Duduk, 2009). gz-PCR; geleneksel PCR'ye göre daha hızlı, hassas, özgül ve miktar analizi de yapabilen bir sistemdir. Ayrıca boyama, jelde görüntüleme gibi PCR sonrası aşamalara ihtiyaç duymadığından daha verimli bir uygulamadır (Abou-Jawdah ve diğ., 2019). Dolayısı ile gz-PCR birçok bitki patojeninin belirlenmesi için en uygun yöntemdir, ancak fitoplazmaların saf kültürde büyüme eksikliğinden dolayı sadece yüksek seviyelerde konakçı DNA varlığı ile birlikte elde edilebileceği göz ardı edilmemelidir.

Nested-PCR'de olduğu gibi gz-PCR'de de bitki ve yüzeyindeki diğer organizmalardan kaynaklı amplifikasyonlar gerçekleşebilir. Bu sebeple spesifik bir prob sisteme dahil edilmelidir. Probe'lar genellikle bir ucunda floresan bir molekül ve diğer ucunda bu floreal molekülden gelen ışınları sönmöleyen bir söndürücü (quencher) molekül ile dizayn edilmiş primerler olup özgülüğö artırmaktadırlar (Loftis ve Reeves, 2012)

Fitoplazmaların tespitine yönelik çalışmalar derlenerek bu çalışmalarda kullanılan evrensel (Tablo 2.3) ve grup spesifik primerler (Tablo 2.4) aşağıda verilmiştir (Abou-Jawdah ve diğ., 2019, Mehle ve diğ., 2013; Valasevich ve Schneider, 2017, Galetto ve Marzachi. 2009, Monti ve diğ., 2013, Manimekalai ve diğ., 2011, Jawhari ve diğ., 2015, Herath ve diğ., 2010, Mazraie ve diğ., 2019, Córdoba ve diğ., 2014, Yvon ve diğ., 2009).

Tablo 2.3: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan evrensel gerçek zamanlı PCR primerleri.

Primer	Sekans (5' – 3')	Hedef bölge
CYS2Fw CYS2Rv CYS2 Probe	AGGTTGAACGGCCACATTG TTGCTCGGTCAGAGTTTCCTC ACACGGCCCCAACTCCTACGGGA	16S rDNA
Uni-F Uni-R Uni-P	AAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAG AACCTAACATCTCAGACACGAACT ACGACAACCATGCACCA	16S rDNA
UPH-F (F) D-UPHr2 (R) UPH-P (P)	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA CGACAACCATGCACCACCTGIIIICTGATAACC TGACGGGACTCCGCACA	16S rDNA
JH-F 1 (F) JH-F all (F) JH-R (R) JH-P Probe	GGTCTCCGAATGGGAAAACC ATTTCCGAATGGGGCAACC CTCGTCACTACTACCRGAATCGTTATTAC AACTGAAATATCTAAGTAAC	23S rDNA
Forward primer Reverse primer Probe	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA TGACGGGACTCCGCACAAGCG	16S rDNA
GPO3F MGSO	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	16S rDNA (Mikoplazma ve fitoplazma)

Tablo 2.4: Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik gerçek zamanlı PCR primerleri.

Primer	Spesifite	Sekans (5' – 3')	Hedef bölge
fAY rEY	16SrV-C, 16SrV-D (FD)	GCACGTAATGGTGGGGACTT GCTTCAATTTCGGTGACGAAAG	16S rDNA
FD-F FD-R FD-P	16SrV-C, 16SrV-D (FD)	AAGTCGAACGGAGACCCTTC TAGCAACCGTTTCCGATTGT AAAAGGTCTTAGTGGCGAACGGGT	16S rDNA
FDgen-F FDgen-R FDgen-P	16SrV-C, 16SrV-D (FD)	TTATGCCTTATGTTACTGCTTCTATTGTTA TCTCCTTGTTCTTGCCATTCTTT ACCTTTTGA CTCAATTGA	sec Y
F1024 R1112 iProbe	16SrV-C, 16SrV-D (FD)	GTGAGATGTTAGGTAAAGTCCTAAAACGA TTGGCAGTCTCGCTAAAGTCC AACCCCTGTGCTAGTTGCCAGC	16S rDNA

Tablo 2.4 (Devamı): Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik gerçek zamanlı PCR primerleri.

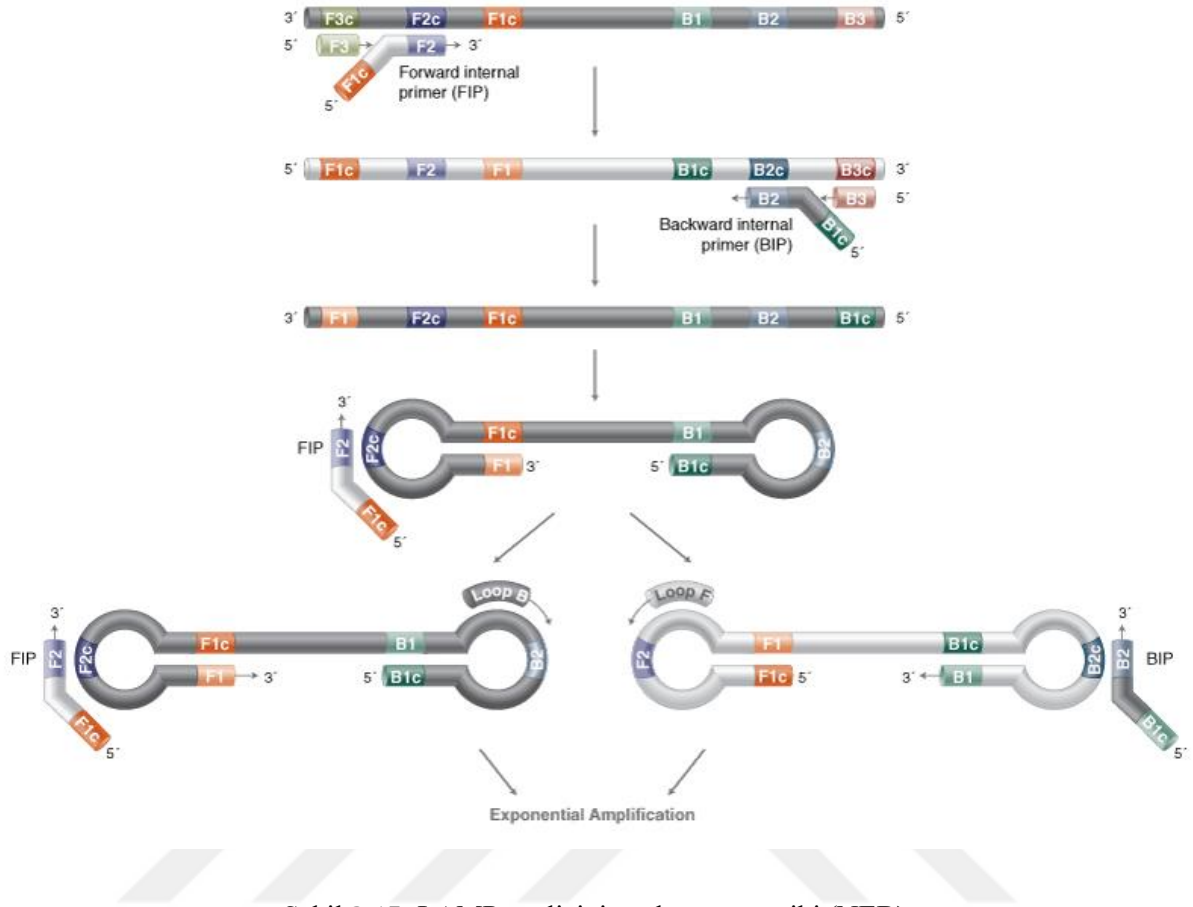
StolFw StolRev	16SrXII-A (BN)	AACCGCTCGCAAACAGC ATTAGCGCCTTAGCTGTG	Genomic Fragment
BN-F BN-R BN-P	16SrXII-A (BN)	GGTTAAGTCCCGCAACGAG CCCACCTTCCTCCAATTTATCA AACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATTAAAG	16S rDNA
BNgen-F BNgen-R BNgen-P	16SrXII-A (BN)	AAGCAGGTTTAGCGATGGTTGT TGGTACCGTTGCTTCATCATTT TTAATACCACCTTCAGGAAA	Genomic Fragment
fAP2 rAP2	AP	AAGAGCAATTCGTACTTTTCG GCCGAAGTAGTTTCTAATTGAC	Nitroreductase
AP3 AP4	AP	GAAACATGTCTATTGGTGG CCAATGTGTGAAATCTGTAG	Genomic Fragment
qAP-16S-F qAP-16S-R qAP-16S	AP	CGAACGGGTGAGTAACACGTAA CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA TAACCTGCCTCTTAGACG	16S rDNA
qAP-16S-F qAP-16S-R AP-MGB	AP	CGAACGGGTGAGTAACACGTAA CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA CTGCCTCTTAGACGAGG	16S rDNA
fAT rATRT TaqMan Probe	AP	CATCATTTAGTTGGGCACTT CGCTTCAGCTACTCTTTGTG CCCTTATGACCTGGGCTACA	16S rDNA
rpLNS2f rpLNS2r2	ESFY	GTGCTGAAGCTAATTTATTG CAATATGGCTAGTTCTTTTT	Ribosomal protein
P1 R16(X)F1r	16SrX	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATT CATCTCTCAGCATACTTGCGGGTC	16S rDNA
Tuf1 Tuf2 Tuf-P	Ca. P. asteris	GCTAAAACCTTGTCACGTTGTACG CGGAAATAGAATTGAGGACGGT TGTTTTAACTAAAAGAAGAAGGAGGACG TCACACTGCCTTTTTCTCTC	Tuf
AY-F AY-R AY-P	Ca. P. asteris	TTGGGTAAAGTCCCGCAAC CCCACCTTCCTCCAATTTATCA CCAGCACGTAATGGTGGGGACTT	16S rDNA
16Sp303F 16Sp378R 16TM329-P	Beet leafhopper virescence	AGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGA GTGGGCCTAAATGGACTTGAAC CACACGCCTGATAAGCGTGAGGTCG	16S rDNA

Tablo 2.4 (Devamı): Fitoplazmaların moleküler teşhisinde kullanılan grup spesifik gerçek zamanlı PCR primerleri.

FimpAP RimpAP qimpAP	16SrX-A	GGTTCAGTTGTTGGTGCTT TTTSTTGTTTACTTTKTGATGAAA AGGCCAGAACTAATAGACCAAGCT	imp
SAD-F SAD-R AP-P	16SrX-A	TGGTTAGAGCACACGCCTGAT TCCACTGTGCGCCCTTAATT CAAAGTATTTATCTTAAGAAAACAAGCT	16S rDNA
rpAP15f-mod rpAP15r3	Ca. Phytoplasma mali	TGCTGAAGCTAATTTGGC CCCATGAATATTAACCTCCT	Ribosomal protein
F1 R1	coconut root (wilt) phytoplasma	CGTCTAAGGTAGGGTCGATGA GGACTTGAACCACCGACCTC	16S rDNA
AwsF AWsR AW23plus	Ca. P. phoenicium	AGGCCCCACCAAACGTCTTAA CCTTCATCGGCTCTTAGTGC ACAAGAGAACAGCGACCTTTATTA	SR-23S rDNA
QPF2 QPR2	arecanut yellow leaf disease phytoplasma	ACGCTTAACGTTGTCCTGCT TGCCTCAGCGTCAGTAAAGA	16S, SR, 23S rDNA
EY-1332-F EY-1332-R EY-1332-P	Elm Yellow's Phytoplasma	TTT AGC AGG AAG TGC AAT ATC TAA ACA GAT TCT AAA GCA ACA CCG ACA ATA ATT CTT TTG GCG GGA CTA GT	SecY
Forward Reverse Probe	Candidatus Phytoplasma aurantifolia	CGGTCTAGTAAGTCAGTG CATTTTACGCTACA ATTCCACTCGCCTCTATCTAACTCA	16S rDNA
LY16S-LSF LY16S-LSR LY16S-LSP	16SrIV	GCTAAAGTCCCCACCATAACGT CGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGT CCCCTGTCGTTAATTG	16S rDNA
ESFYf ESFYr	ESFY	CCATCATTTAGTTGGGCACT ATAGGCCCAAGCCATTATTG	16S-SR rDNA

2.7.3. Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (Loop-Mediated Isothermal Amplification – LAMP)

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), polimeraz zincir reaksiyonunun aksine termal döngü gerektirmeyen, hedef organizmaların amplifikasyonu ve tespiti için kullanılan bir yöntemdir (Tomlinson, 2013). Son yıllarda, uzman olmayan kişiler tarafından laboratuvarından uzakta, örneğin sahada veya sınır denetim noktasında gerçekleştirilebilecek daha basit ve daha hızlı tespit yöntemlerine doğru bir yönelim olmuştur. LAMP yöntemini mevcut diğer tanı yöntemlerinden ayıran başlıca özellikler, amplifikasyon hızı ve reaksiyonların sonucunu belirlemek için uygulanabilecek çok çeşitli tespit yöntemleri, yöntemin amplifikasyon inhibitörlerine direnci, zaman alıcı nükleik asit izolasyon protokolleri yerine ham numune hazırlama yöntemleri şeklinde sıralanabilir (Hodgetts, 2019). 2000 yılında notomi ve meslektaşları tarafından geliştirilen bu teknik kısaca, iki iç ve iki dış primer olmak üzere en az dört primerin iplikçik değiştiren bir DNA polimeraz ile birlikte kullanılmasına dayanır (Notomi ve diğ., 2000). Primerler ve iplikçik değiştiren polimeraz aktivitesinin kombinasyonu, iç primerlerin molekül içi tamamlayıcılığı nedeniyle her iki ucunda dambıl benzeri bir yapı oluşturan tek sarmallı bir DNA parçasının oluşmasına yol açar. Bu dambıl yapılar, iç primerlerin ve dış primerlerin bağlanması için hedeftir. İplikçik değiştiren polimeraz ile birlikte bu kendi kendine primerleme özelliği sayesinde sürekli olarak yeni amplifiye DNA üretilir (Şekil 2.15). Elde edilen reaksiyon ürünleri, hedef DNA bölgesinin uzun konkatemerlerinden oluşur. Konkatermer terimi ise aynı DNA dizisinin birden fazla kopyasını içeren uzun ve sürekli bir DNA molekülünü ifade etmek için kullanılmaktadır (Venbrux ve diğ., 2023). Reaksiyon 60-65°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilir ve kullanılan primerlerin yanı sıra hedefe bağlı olarak genellikle 30 dakika içinde (numune hazırlama hariç) sonuç verir (Ivanov ve ark., 2021). Ayrıca, dambıl yapısının ilmeklerini hedef alan iki ek primer daha eklenerek analiz süresi azaltılabilir. LAMP tabanlı amplifikasyon ürünlerinin tespiti için jel-elektroforez, çökelmeye bağlı bulanıklık ölçümü (türbitimetrik), floresan boyalar ve probalar, yanıl akış cihazları (LFT) dahil olmak üzere birden fazla yöntem kullanılabilir (Venbrux ve diğ., 2023).



Şekil 2.15: LAMP analizinin çalışma prensibi (NEB).

Özellikle klinik teşhiste sıklıkla kullanılmakta olan bu yöntem ile Dang humması, ensefalit, Batı Nil virüsü, Chikungunya virüsü, Norwalk virüsü, H5N1, SARS, SARS-COV, Norovirüs, HPV, tüberküloz ve daha birçok hastalığın teşhisi yapılmaktadır (Notomi ve diğ., 2015, Parida ve diğ., 2008).

Bitki patojenlerini de tespit etmek için tercih edilen yöntemlerden biri olan LAMP yöntemi ile 100'e yakın bitki virüsü (Panno ve diğ., 2020) ve birçok mantar ve bakteri kaynaklı hastalığın tespitinde kullanılmaktadır (Le ve Vu, 2017).

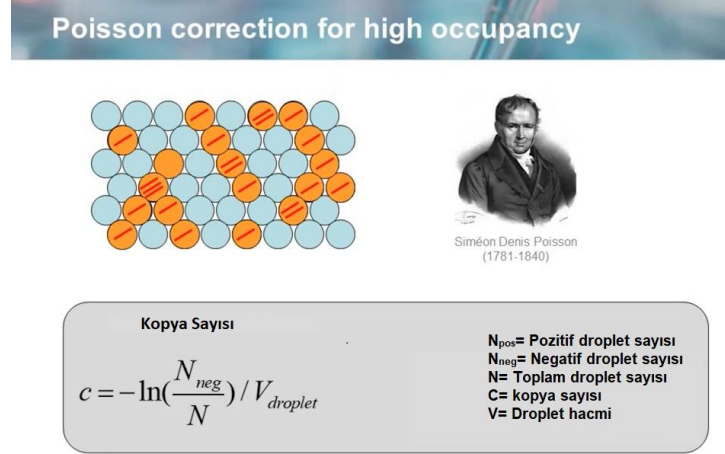
Fitoplazma tespiti için de kullanılan bu yöntem ile 16SrI, II, V, VI, X, XI, XII, XIV grubu fitoplazmalar ile Cassava witches' Broom (CWB), Coconut root wilt disease (RWD) ve arecanut yellow leaf (YLD) fitoplazmaları tespit edilmektedir. Ancak bu testlerde kullanılan primerlerin birçoğunun özgüllük testleri yapılmadığından dolayı diğer fitoplazma gruplarını tespit edip edemediği veya hangilerinin tür/grup spesifik olduğu tam olarak bilinmemektedir.

(Hodgetts, 2019). Diğer yandan bazı hastalıkların birden fazla fitoplazma grubu ile ilişkilendirilmesinden de kaynaklanmaktadır. Örneğin sesame phyllody hastalığına sebep olan fitoplazma SrI ve SrII grubuna dahil iki farklı fitoplazmadır. Dolayısı ile sesame phyllody hastalığına sebep olan fitoplazma tespiti için kullanılan LAMP yöntemi fitoplazma grubu yerine hastalık spesifik olarak dizayn edilmiştir (Quoc ve diğ., 2021). Bunların yanı sıra bütün fitoplazma gruplarını da tespit eden evrensel LAMP metotları da geliştirilmiştir ve geleneksel PCR ve gerçek zamanlı PCR’de olduğu gibi bu metotlar da çoğunlukla 16S ribozomal DNA ile sınırlıdır (Akahori ve diğ., 2024; Nair ve Manimekalai, 2021).

2.7.4 Droplet Dijital PCR (ddPCR)

GZ-PCR, nükleik asitlerin standart bir eğri yardımıyla mutlak miktar tayini veya referans materyaller ve iç kontrol kullanılarak elde edilen Ct değerlerini karşılaştırılarak göreceli miktar tayini yapmak için kullanılabilir. Ancak Ct değeri hesaplaması, DNA konsantrasyonu, DNA kirliliği, doğru iç kontrolün kullanılmaması ve prosedürün standardizasyonu gibi birçok faktör nedeniyle yanlış olabilir. Dijital PCR ise GZ-PCR’ye göre yüksek oranda tekrarlanabilirliğe, inhibitörlere karşı daha az duyarlı, daha yüksek doğruluk ve hassasiyete sahiptir (Manoj, 2016).

Dijital PCR miktar analizlerinde GZ-PCR’de olduğu gibi herhangi bir referansa ihtiyaç duymadan Poisson istatistiğinden faydalanarak mutlak miktar tayini yapabilmektedir (Majumdar ve diğ., 2017) (Şekil 2.16). 3. nesil PCR olarak adlandırılan Droplet dijital PCR ise bu teknolojiyi bir adım daha ileri götürerek reaksiyonu 20.000 parçaya bölmekte ve ayrılan her bir parçacığı tek tek analiz ederek mikrolitre başına 1 kopya sayısına kadar tespit edebilmektedir (Pinheiro ve diğ., 2012; Lu ve diğ., 2020).



Şekil 2.16: ddPCR mutlak miktar tayini formülü

Reaksiyon karışımı diğer PCR yöntemlerinde olduğu gibi hazırlandıktan sonra mikroakışkan mekaniği yardımıyla yağ-su emülsiyonu şeklinde nükleik asitler rastgele bir biçimde parçacıklara dağılmaktadır. Daha sonra reaksiyon bu parçacıkların içinde gerçekleştirilmekte ve her bir parçacık Poisson istatistiğine göre analiz edilip mutlak kopya sayısı hesaplanmaktadır (Mao ve diğ., 2019).

Giderek yaygınlaşan bu yöntem tıp (Wong ve diğ., 2017), veterinerlik (Tsokana ve diğ., 2023), ziraat (Lee ve diğ., 2021) ve su ürünleri alanındaki hastalıkların teşhisinde (Orioles ve diğ., 2022) kullanılmaya başlanmıştır.

Mollicutes üyelerine dahil türlerinde teşhisinde tercih edilen bu yöntem ile *Mycoplasma pneumoniae* (Zhao ve diğ., 2023), *Ureaplasma spp.* (Huang ve diğ., 2021; Huang ve diğ., 2021b), *Spiroplasma citri* (Maheshwari ve diğ., 2017; Maheshwari ve diğ., 2021), *Mycoplasma genitalium* (Peh ve diğ., 2023) teşhisi yapılmaktadır.

Fitoplazmaların teşhisi ve mutlak miktar tayini için ise sınırlı sayıda referans bulunmakla birlikte sadece 5 adet yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalar ise *groEL* (Hammond ve diğ., 2021, Pérez-López ve diğ., 2017), *secY* (Mehle ve diğ., 2014), *tuf* (Yu ve diğ., 2022) ve 16S ribozomal DNA (Bahar ve diğ., 2018) bölgelerini hedef almakta olup tür veya grup spesifik çalışmalardır. Dolayısı ile ddPCR yöntemi kullanılarak fitoplazmaların teşhisinde evrensel bir metodoloji eksikliği bulunmaktadır. Ayrıca çoğu fitoplazma genomu 16S ribozomal DNA geninden iki

kopya içermektedir (Cho ve diğ., 2020). Dolayısı ile mutlak miktar tayini yapılırken bu bölge hedef alınır ise bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

2.8. CA. PHYTOPLASMA SINIFLANDIRILMASI

Fitoplazmaların teşhisinden sonraki adım olarak fitoplazmaların sınıflandırılması gelmektedir. Sekans teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte ilk defa MLO'ların 16S ribozomal DNA'ları elde edilmiş ve filogenetik olarak ayrı oldukları kanıtlanmıştır (Lim ve Sears, 1989). Bu gelişmeler sonucu ilk evrensel primerler geliştirilmiş ve fitoplazma teşhisi hız kazanmıştır. Ancak fitoplazmaların kültüre alınma çabaları başarısız olduktan sonra geleneksel mikrobiyal karakterizasyonlar fitoplazmalar için geçerli olamamıştır (Zhao ve diğ., 2013). Bu sebeple Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) analizi ile 16S ribozomal DNA bölgesinin 17 adet kesim ezimine dayalı bir sınıflandırma sistemi getirilmiştir (Lee ve diğ., 1995). RFLP analizi hem zaman alıcı hem de 17 adet kesim enzimi ile birlikte maliyetli olduğundan dolayı iPhyClassifier adında in-silico analiz programı geliştirilerek sanal jel görüntüleri ve bu görüntülere ait benzerlik kat sayılarına göre sınıflandırma yapılmasına olanak sağlanmıştır (Zhao ve diğ., 2009).

Bu program sayesinde fitoplazma tanımlanması ve sınıflandırılması üzerine çok kısa bir sürede 1600 kadar makale yayınlanarak çalışmalar hız kazanmıştır (Wei ve Zhao, 2022). RFLP analizine göre sınıflandırma yapılabilmesine olanak sağlandıktan sonra bu sınıflandırmaların standardizasyonu için çeşitli yönergeler yayınlanmıştır. Bu yönergelerin ilki 2004 yılında Uluslararası Fitoplazma/Spiroplazma Çalışma Ekibi- Fitoplazma Taksonomi Grubu tarafından yayınlamıştır (IRPCM, 2004). Bu yönergeye göre, (I) minimum 1200 bazlık 16S ribozomal DNA bölgesi sekansı elde edilmesi, (II) yeni tür ataması yapılması durumunda benzerlik oranı %97.5'ten az olmalı, (III) benzerlik oranı %97.5'ten fazla ancak ekolojik olarak ayrı ve farklı konukçu ve vektörlere sahip olmak koşullarını sağlamaları gerekmektedir.

Bu yönerge 2022 yılında iki kez güncellenerek son halini almıştır (Bertaccini ve diğ., 2022; Wei ve Zhao, 2022). Bu yönergelere göre eski yönergeye ek olarak (I) önerilen 16S ribozomal DNA sekansı 1500 bazdan fazla veya tamamı olmalı, (II) 16S ribozomal DNA benzerlik oranı %98.65'ten fazla olmalı ve var ise tüm genomun ortalama nükleotit benzerlik oranı (ANI) %95-96'dan az olmalı, (III) housekeeping genlerinden en az iki tanesi olmak koşulu ile çoklu bölge sekans analizi (MLSA) yapılması gerekmektedir.

Fitoplazmalar için belirlenmiş 5 adet housekeeping geni bulunmakta olup bu genler *groEL*, *tuf*, *rp*, *secA* ve *secY* genleridir (Wei ve Zhao, 2022). Bu genlere ait primerlerin sekansları ise Martini vd. (2019)'nin yapmış olduğu derlemede ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Yönergede yayınlanan bir diğer kural ise tüm genom sekansıdır, bu kapsamda toplamda 47 adet tüm genomu ve contig seviyesinde fitoplazma sekansı NCBI veri bankasında saklanmaktadır (Wei ve Zhao, 2022).

Günümüzde 16S ribozomal DNA'sına göre yapılan sınıflandırmada fitoplazmalar 37 grup ve 48 Candidatus tür ile temsil edilmektedirler (Tablo 2.7) (Wei ve Zhao, 2022). Yayınlanan bu yönergeler ile fitoplazmaların sınıflandırılmasına bir standardizasyon getirilmiştir, 2022 yılı öncesi 39 grup ile temsil edilen fitoplazmalar yeni yönergeler ışığında 37 gruba indirgenerek daha güvenilir bir sınıflandırmaya tabi olmuşlardır.

Tablo 2.5: Fitoplazma 16S rDNA gruplarına göre güncel liste.

Grup	'Ca. Phytoplasma' türleri	Alt grup
16SrI: Aster yellows grubu	'Ca. Phytoplasma asteris' 'Ca. Phytoplasma lycopersici' 'Ca. Phytoplasma tritici'	16SI-B 16SrI-Y 16SrI-C
16SrII: Peanut witches' broom grubu	'Ca. Phytoplasma aurantifolia'	16SrII-B
16SrIII: X-disease grubu	'Ca. Phytoplasma pruni'	16SrIII-A
16SrIV: Coconut lethal yellows grubu	'Ca. Phytoplasma palmae' 'Ca. Phytoplasma cocostanzaniae'	16SrIV-A 16SrIV-C
16SrV: Elm yellows grubu	'Ca. Phytoplasma ulmi' 'Ca. Phytoplasma ziziphi' 'Ca. Phytoplasma rubi' 'Ca. Phytoplasma balanitae'	16SrV-A 16SrV-B 16SrV-E 16SrV
16SrVI: Clover proliferation grubu	'Ca. Phytoplasma trifolii' 'Ca. Phytoplasma sudamericanum'	16SrVI-A 16SrVI-I
16SrVII: Ash yellows grubu	'Ca. Phytoplasma fraxini'	16SrVII-A
16SrVIII: Loofah witches' broom grubu	'Ca. Phytoplasma luffae'	16SrVIII-A
16SrIX: Pigeon pea witches' broom grubu	'Ca. Phytoplasma phoenicium'	16SrIX-D

Tablo 2.5 (devam): Fitoplazma 16S rDNA gruplarına göre güncel liste.

16SrX: Apple proliferation grubu	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	16SrX-A 16SrX-C 16SrX-F 16SrX-D
16SrXI: Rice yellow dwarf grubu	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma cirsii</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma sacchari</i> '	16SrXI-A 16SrXI-D 16SrXI-B
16SrXII: Stolbur grubu	' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> '	16SrXII-B 16SrXII-D 16SrXII-E 16SrXII-A 16SrXII-H
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence	' <i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma meliae</i> '	16SrXIII-A 16SrXIII-G
16SrXIV: Bermudagrass white leaf grubu	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	16SrXIV-A
16SrXV: Hibiscus witches' broom grubu	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '	16SrXV-A
16SrXVI: Sugar cane yellow leaf syndrome	' <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> '	16SrXVI-A
16SrXVII: Papaya bunchy top grubu	' <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> '	16SrXVII-A
16SrXVIII: American potato purple top wilt	' <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> '	16SrXVIII-A
16SrXIX: Japanese chestnut witches' broom	' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '	16SrXIX-A
16SrXX: Buckthorn witches' broom grubu	' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '	16SrXX-A
16SrXXI: Pine shoot proliferation grubu	' <i>Ca. Phytoplasma pini</i> '	16SrXXI-A
16SrXXII: Nigerian coconut lethal decline	' <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> '	16SrXXII-A
16SrXXIII: Buckland Valley grapevine yellows	---	16SrXXIII-A
16SrXXIV: Sorghum bunchy shoot grubu	---	16SrXXIV-A

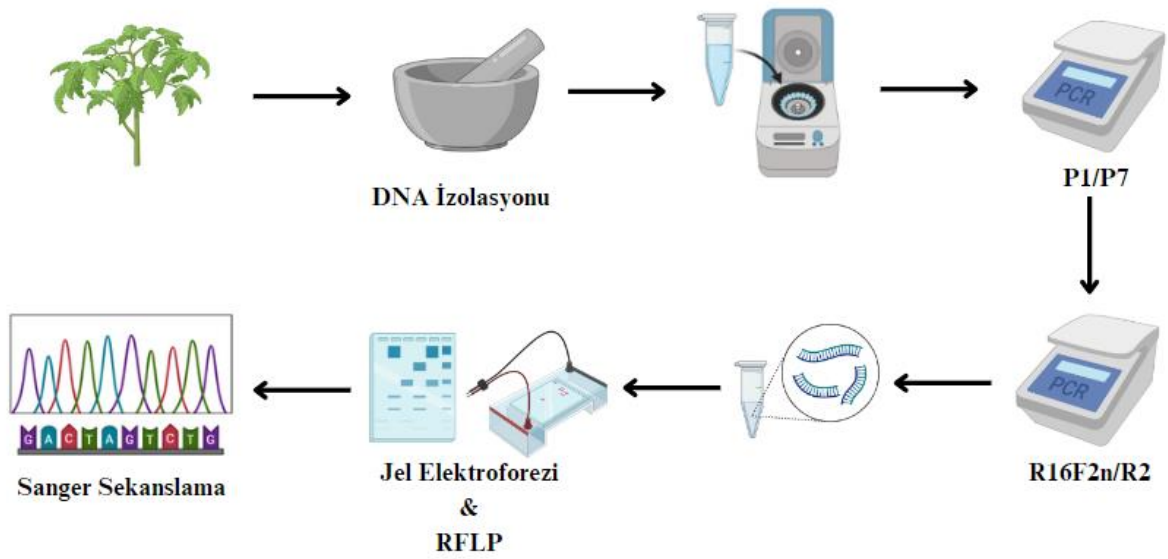
Tablo 2.5 (devam): Fitoplazma 16S rDNA gruplarına göre güncel liste.

16SrXXV: Weeping tea tree witches' broom	---	16SrXXV-A
16SrXXVI: Mauritius sugar cane yellows D3T1	---	16SrXXVI-A
16SrXXVII: Mauritius sugar cane yellows D3T2	---	16SrXXVII-A
16SrXXVIII: Havana derbid grubu	---	16SrXXVIII-A
16SrXXIX: Cassia witches' broom grubu	' <i>Ca. Phytoplasma omanense</i> '	16SrXXIX-A
16SrXXX: Salt cedar witches' broom grubu	' <i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i> '	16SrXXX-A
16SrXXXI: Soybean stunt phytoplasma grubu	' <i>Ca. Phytoplasma costaricanum</i> '	16SrXXXI-A
16SrXXXII: Malaysian periwinkle virescence	' <i>Ca. Phytoplasma malaysianum</i> '	16SrXXXII-A
16SrXXXIII: Allocasuarina	' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '	16SrXXXIII-A
16SrXXXVI: Foxtail palm yellow decline grubu	' <i>Ca. Phytoplasma wodyetiae</i> '	16SrXXXVI-A
16SrXXXVII: Stylosanthes little leaf grubu	' <i>Ca. Phytoplasma stylosanthis</i> '	16SrXXXVII-A
16SrXXXVIII: Borgia coconut syndrome grup	' <i>Ca. Phytoplasma noviguineense</i> '	16SrXXXVIII-A
16SrXXXIX: Palm lethal wilt grubu	' <i>Ca. Phytoplasma dypsidis</i> '	16SrXXXIX-A

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL TEMİNİ

Tez çalışmasında kullanılan domates bitkisi (*Solanum lycopersicum* L.) 2021 yılında araziden toplanmış olup moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır (Şekil 3.1). Fitoplazmaların moleküler teşhisi ve tayini için uygulanan yöntemler Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1: Fitoplazmaların moleküler teşhisi ve tayini (Biorender ile oluşturulmuştur).

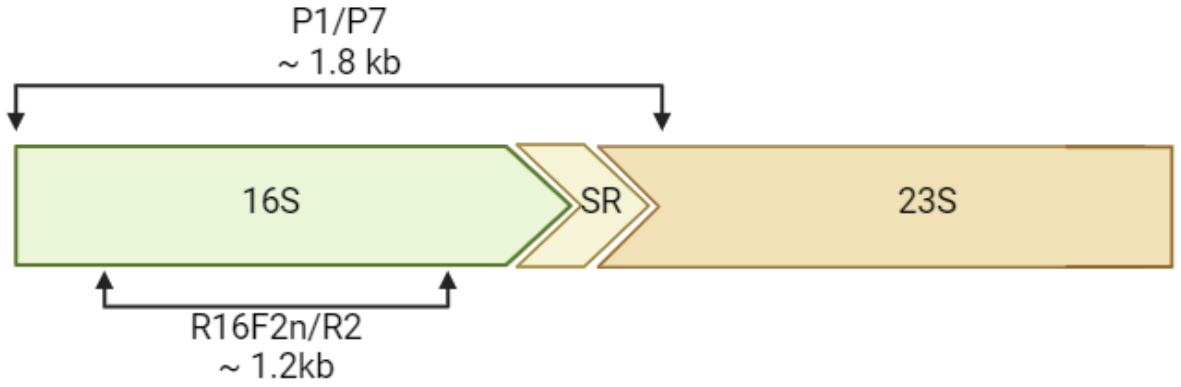
3.2. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'a göre yapılmış olup, kısaca; 100 mg dondurulmuş örnek sıvı azot yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek üzerine 1 ml CTAB solusyonu (%2 CTAB, 1.4M NaCl, %0.2 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Hcl pH 8.0) eklenerek 65°C 'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 1 ml fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 15 dk 13.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak eşit hacimde soğuk izopropanol eklenip 15 dk -80°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dk boyunca santrifüj edilip süpernatant dökülmüştür. Pellet 2 defa 1 ml %70'lik etil alkol ile (1. yıkamada 100 µl sodyum asetat eklenmiştir) 5 dk 13.000 rpm'de yıkanmıştır. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırılarak 50 µl moleküler saflıkta su eklenerek DNA çözülmüştür ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza

edilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflık ve miktar tayin ise NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) kullanılarak yapılmıştır.

3.3. FİTOPLAZMALARIN NESTED-PCR İLE TEŞHİSİ

Fitoplazmaların PCR yöntemiyle teşhisi nested-PCR adı verilen, temelde ardışık iki PCR analizi ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca fitoplazmaların genomları AT açısından zengin olduğu ve bu sebeple amplifikasyonları zor olduğundan PCR analizlerinde Taq (KTK biotech ve Thermo Scientific, AmpliTaq (Thermo Scientific), KOD (KTK biotech), Phusion Polimeraz (Thermo Scientific) ve Q5 (New England Biolabs) polimerazları kullanılarak etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda P1/P7 ve R16F2n/R2 primerleri (Deng ve Hiruki, 1991; Schneider ve diğ., 1995) ile C1000 touch termal döngü cihazında (Bio-Rad) amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir (şekil 3.2).



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan primerlerin hedefledikleri bölgeler ve uzunlukları.

Nested-PCR analizlerine dair kullanılan primelerin sekansı (tablo 3.1) ve termal döngü koşulları (tablo 3.2) aşağıda verilmiştir. Reaksiyon sonrası ürünler ise 1x TBE (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA pH 8.0) ile hazırlanmış %1'lik agaroz jelde yürütülerek GreenView ve RedView (ABP Bioscience) boyası kullanılarak mavi ışık ve UV altında görüntülenmiştir. Fitoplazma rDNA bölgesini hedefleyen P1/P7 primeri ile amplifikasyonda yaklaşık 1.8 kb, R16F2n/R2 primeriyle amplifikasyonda ise yaklaşık 1.2 kb'lik ürün beklenmektedir.

Tablo 3.1: Nested-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları.

Primer	Sekans (5'-3')
P1 P7	AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT
R16F2n R16R2	GAAACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG

Tablo 3.2: Nested-PCR reaksiyon koşulları.

Taq		AmpliTaq		EpisoZYme Taq		KOD		Q5		Phusion	
95 °C	2 dk	95 °C	10 dk	95 °C	5 dk	95 °C	5 dk	98 °C	30 sn	98 °C	10 sn
95 °C	30 sn	95 °C	30 sn	95 °C	15 sn	95 °C	15 sn	98 °C	7 sn	98 °C	1 sn
55 °C	30 sn	55 °C	30 sn	55 °C	20 sn	55 °C	20 sn	55 °C	20 sn	55 °C	5 sn
72 °C	2 dk	72 °C	2 dk	74 °C	1 dk	74 °C	2 dk	72 °C	1 dk	72 °C	20 sn
72 °C	10 dk	72 °C	7 dk	74 °C	5 dk	74 °C	5 dk	72 °C	2 dk	72 °C	1 dk

3.4. FİTOPLAZMA ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI, AKTARIMI VE SEKANSLANMASI

Elde edilen R16F2n/R2 PCR ürünü CloneJet PCR klonlama kiti (Thermo Scientific) kullanılarak pJet 1.2 plazmidi içerisine üretici talimatlarına göre klonlanmıştır. Daha sonra plazmid E. coli dh5α suşuna ısı şoku yöntemiyle aktarılmıştır. Kısaca, kompetent E. coli dh5α suşu ve plazmid önce 30 dk boyunca buz üzerinde, 45 sn 42°C su banyosunda ve 3 dk tekrar buz üzerinde inkübasyonu ile aktarım gerçekleştirilmiştir. Aktarımı gerçekleşen E. coli dh5α suşu üzerine 400 µl LB (Luria Broth) besiyeri eklenerek 37°C 220 rpm'de 1 saat süreyle inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre yoğunluna bağlı olarak hücrelerin tamamı veya 100 µl'si amfisilin içeren katı LB besiyerine (LB-Amp) ekilerek gece boyunca 37°C'de büyümeye bırakılmıştır. Kolonilerin seçimi ise plazmid içerisinde bulunan amfisilin direnç geni yardımıyla yapılmıştır. Büyüyen koloniler daha sonra alınarak besin açısından zengin sıvı SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) besiyerine alınarak büyümeye 37°C'de bırakılmıştır.

Sıvı besiyerinde büyüyen koloniler alkali parçalama yöntemiyle plazmid izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Green ve Sambrook, 2018). Kısaca, kültürden 3 ml alınarak 1 dk 12.000 rpm'de çöktürülerek süpernatant atılır ve 100 µl pellet sulandırma tamponu (50 mM glikoz, 25 mM Tris-Hcl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ile sulandırılarak 5 dk buz üzerinde inkübe edilir. Üzerine 200 µl parçalama tamponu (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek 4 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılır. Reaksiyonu sonlandırmak için üzerine 150 µl nötralizasyon tamponu (3

M potasyum, 5 M asetat) 4 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra 10 dk 14.000 rpm'de çöktürülerek plazmidleri içeren süpernatant alınır. Bu aşamadan sonrası kısım 3.2'de bahsedilen izopranoöl basamağındaki gibi devam ederek plazmid DNA'sı elde edilir.

Elde edilen plazmid DNA'sı tekrardan R16F2n/R2 primeri ile amplifiye edilerek ürünün aktarımı kontrol edilmiştir. Elde edilen ürün NucleoSpin Gel & PCR Clean-up Mini kit (Macherey-Nagel) kullanılarak üretici talimatlarına göre saflaştırılarak sekanslanmak üzere hazırlanmıştır. Sekanslama işlemi çift yönlü olacak şekilde hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. DNA SEKANS ANALİZİ VE SANAL RFLP

Sekans sonucu elde edilen çift yönlü okuma verileri DNA Dragon (v1.9.2) yazılımı kullanılarak birleştirilmiştir ve Snapgene Viewer (v6.2.2) kullanılarak haritalanmıştır. Birleştirilmiş sekans Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak hizalanmış ve diğer fitoplazma sekansları ile benzerlikleri belirlenmiştir.

Sanal RFLP motifleri ise pDRAW32 (v1.1.147, <https://www.acaclone.com>) kullanılarak in silico gerçekleştirilmiştir. Fitoplazmalarda 16S rDNA bölgelerini baz alarak gerçekleştirilen RFLP analizlerinde 17 adet kesim enzimi kullanılmaktadır, bu enzimler sırasıyla *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *ThaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* ve *TaqI*'dir.

3.6. FİTOPLAZMALARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PCR) İLE TEŞHİSİ

Fitoplazma DNA'sının gerçek zamanlı amplifikasyonu için Insta Q96 plus (Hi-Media) cihazı kullanılmıştır. GZ-PCR amplifikasyonları probe tabanlı gerçekleştirilmiş olup kullanılan primer/probe sekansları tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: GZ-PCR ve ddPCR analizlerinde kullanılan primer/probe sekansları (Christensen ve diğ., 2004; Hren ve diğ., 2007).

Primer/Probe	Sekans (5'-3')
16S-F	CGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGA
16S-R	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA FAM-
16S-P	FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-BHQ
Uni-F	AAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAG
Uni-R	AACCTAACATCTCAGACACGAACT
Uni-P	FAM-ACGACAACCATGCACCA-BHQ

Mutlak kantitasyon fitoplazma R16F2n/R2 PCR ürününden oluşturulan standart eğriye göre hesaplanmıştır. Bu kapsamda plazmid DNA'sı $1,8 \times 10^7$, $1,8 \times 10^6$, $1,8 \times 10^5$, $1,8 \times 10^4$ ve $1,8 \times 10^3$ kopya sayısına sahip olacak şekilde sulandırılmıştır. PCR ürünlerinin kopya sayısı ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Şekil 3.2).

$$Kopya Sayısı = \frac{DNA Miktarı (ng) \times 6,022 \times 10^{23}}{Uzunluk (bp) \times 660 \times 1 \times 10^9}$$

Şekil 3.2: Plazmid kopya sayısı hesaplama formülü.

PCR ürünleri ve pozitif örnek Promega GoTaq Enviro qPCR master mix'i kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışımı ve koşulları tablo 3.4'te verilmiştir.

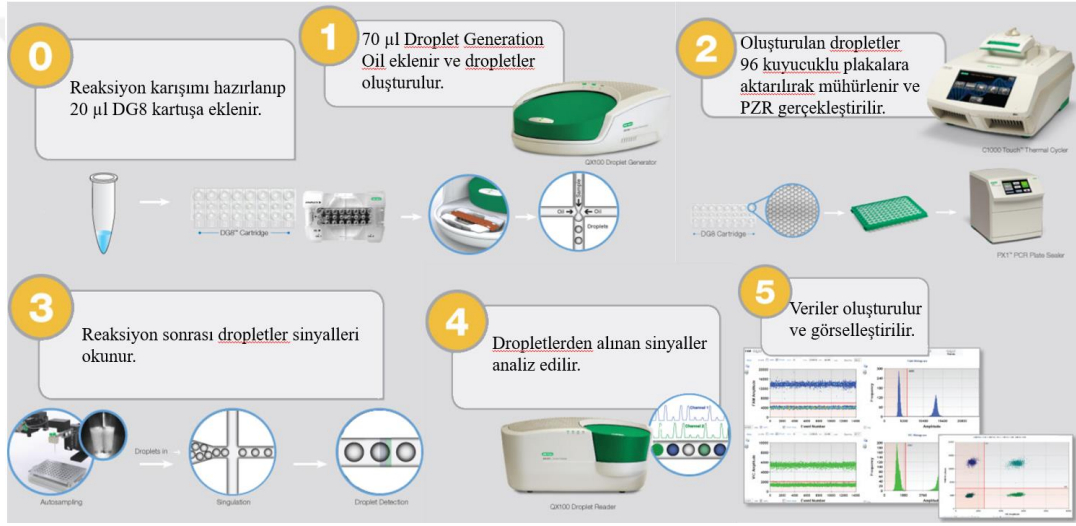
Tablo 3.4: GZ-PCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.

GoTaq Enviro qPCR mix	10 µl	95 °C	2 dk	
Primer-F	1 µl	95 °C	15 sn	40 döngü
Primer-R	1 µl	60 °C	1 dk	
Probe	0.4 µl			
Template	1 µl			
Moleküler Safılıkta Su	6.6 µl			
Toplam	20 µl			

3.7. FİTOPLAZMALARIN DROPLET DİJİTAL PCR (DDPCR) İLE TEŞHİSİ

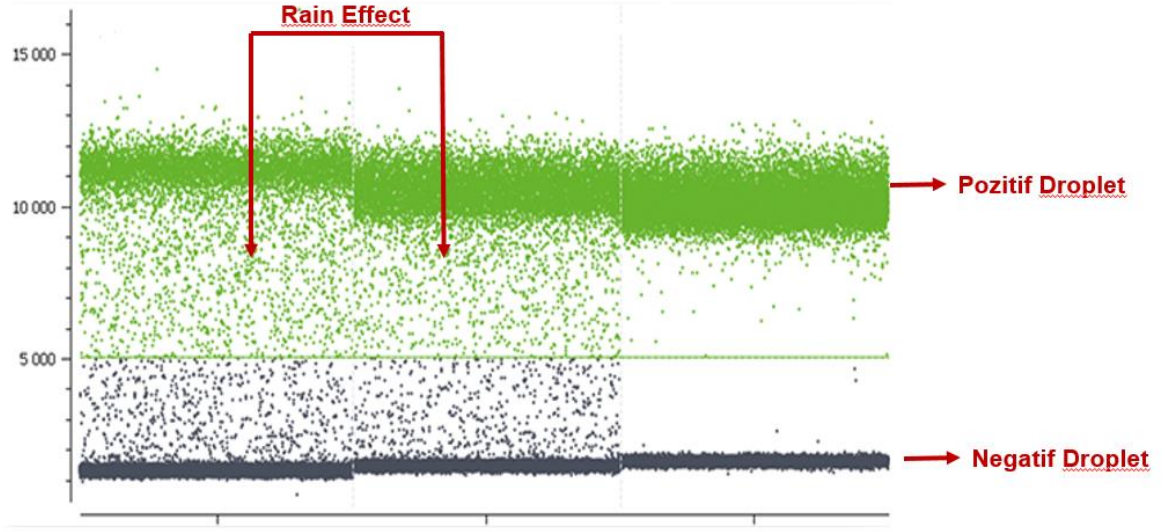
Fitoplazma DNA'sının Droplet dijital PCR (ddPCR) ile amplifikasyonları QX100 Droplet Dijital PCR Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak yapılmıştır. Bu kapsamda öncelikle reaksiyon

karışımı üretici talimatlarına göre hazırlandıktan sonra 20 µl reaksiyon karışımı DG8 kartuşlarına (Bio-Rad) aktarıldı, kartuşların ilgili kuyularına da 70 µl Droplet Generation Oil eklenerek eklenerek QX100 Droplet Generator (Bio-Rad) cihazında dropletler oluşturulmuştur. Dropletleri oluşturulmuş reaksiyon karışımından 40 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılıp üzeri folyo ile PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad) cihazında mühürlenmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere C1000 touch termal döngü cihazı (Bio-Rad) kullanılmıştır. Reaksiyon sonrası dropletler içerisindeki amplifikasyon QX100 Droplet Reader (Bio-Rad) cihazında tespit edilerek QX Manager (v.2.0)'da analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



şekil 3.3: ddPCR akış şeması (Bio-rad).

ddPCR analizi esnasında oluşan pozitif ve negatif dropletlerin birbirlerinden ayrılmasına ve elde edilen kopya sayılarına göre optimizasyonları gerçekleştirilerek analizler tamamlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: İdeal ddPCR amplifikasyon grafiği

ddPCR analizlerinde kullanılan primer/probe GZ-PCR analizlerinde kullanılan primer/probe ile aynı olup (Tablo.3.3) reaksiyon karışımı ve koşulları tablo 3.5'te verilmiştir. gz-PCR analizlerinde gerçekleştirildiği gibi probe tabanlı ve DNA'ya bağlanan boyalar ile amplifikasyonlar karşılaştırılmış olup gradien PCR yapılarak optimizasyonları tamamlanmıştır.

Tablo 3.5: ddPCR reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulları.

ddPCR EvaGreen super mix	11 µl	ddPCR super mix (no UTP)	11 µl	95 °C	10 dk	40 döngü
Primer-F	0.5 µl	Primer-F	1.8 µl	95 °C	30 sn	
Primer-R	0.5 µl	Primer-R	1.8 µl	60 °C	1 dk	
Template	1 µl	Probe	0.5 µl	98°C	10 dk	
Moleküler Saflıkta Su	9 µl	Template	1 µl			
		Moleküler Saflıkta Su	5.9 µl			
Toplam	22 µl	Toplam	22 µl			

4. BULGULAR

4.1. BİTKİ MATERYALİ VE SEMPTOMLARI

Araziden toplanan domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisine ait çiçek ve gövde yapısı loop altında detaylıca incelenmiştir. Bitkide gözlemlenen filodi, morarma ve gövdede tomurcuklanma semptomları fitoplazma enfeksiyonuna ait ilk işaretleri taşımaktadır (Şekil 4.1-4.5).



Şekil 4.1: Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde gözlemlenen filodi semptomu.



Şekil 4.2: Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde gözlemlenen indirgenmiş çiçek yapısı.



Şekil 4.3 Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde gözlemlenen gövdede tomurcuklanma.



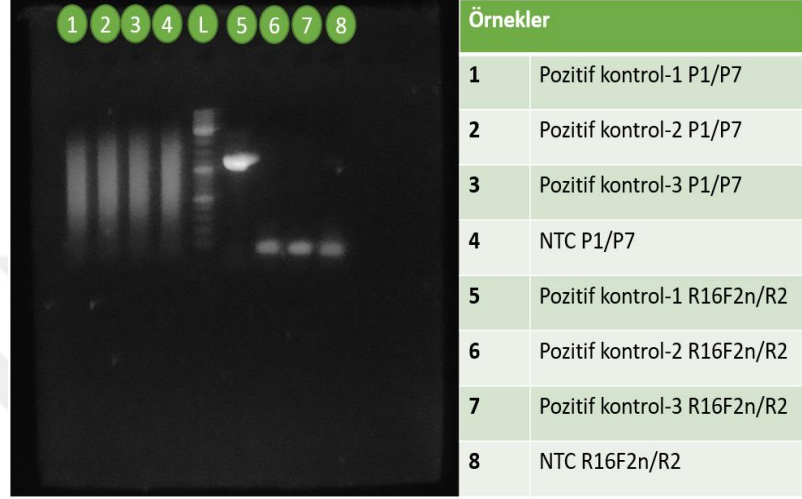
Şekil 4.4: Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde gözlemlenen morarma semptomu.



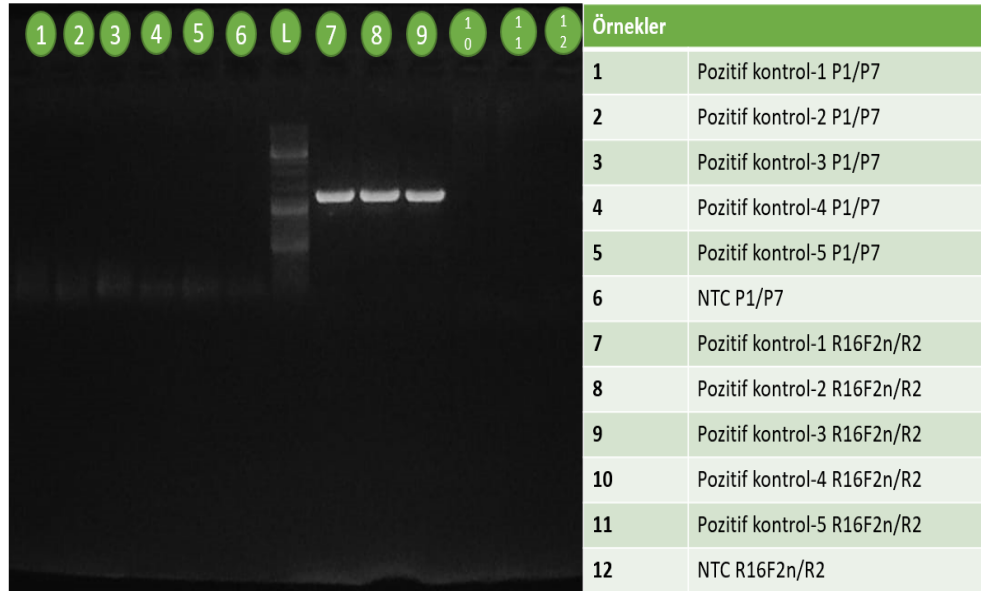
Şekil 4.5: Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinde gözlemlenen bozuk çiçek yapısı ve morarma semptomu.

4.2. DNA İZOLASYONU VE NESTED-PCR SONUÇLARI

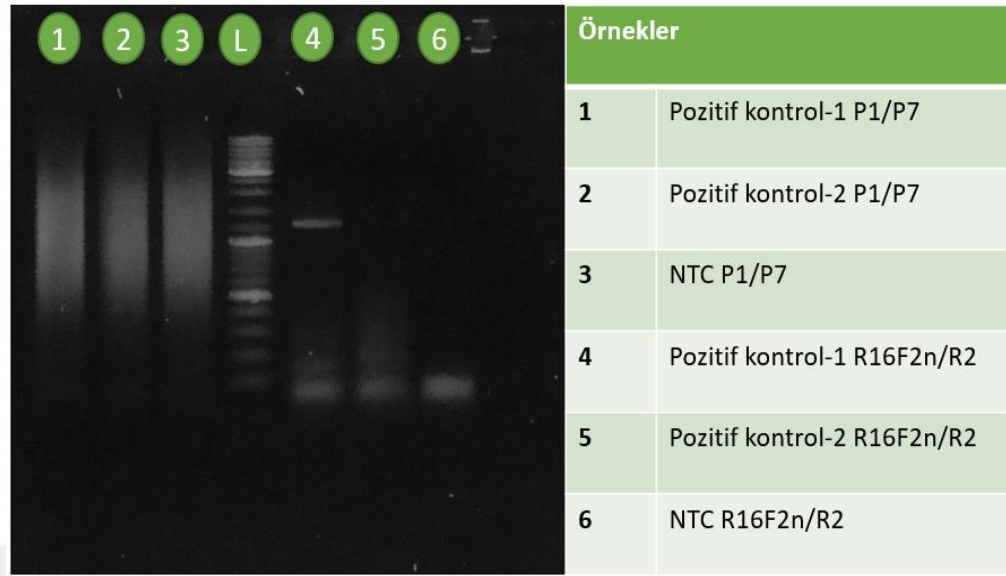
Fitoplazma DNA'larının amplifikasyonu için 6 farklı ticari polimeraz kullanılmış olup her bir polimerazın etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda elde veriler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6-4.11)



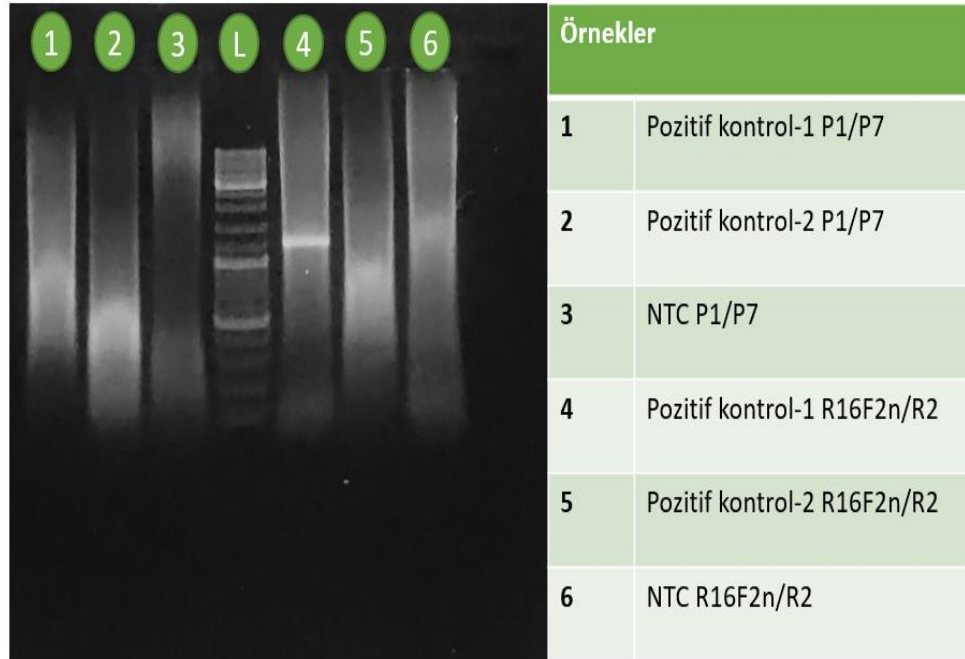
Şekil 4.6: Farklı fitoplazma DNA'larının *Taq* polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü



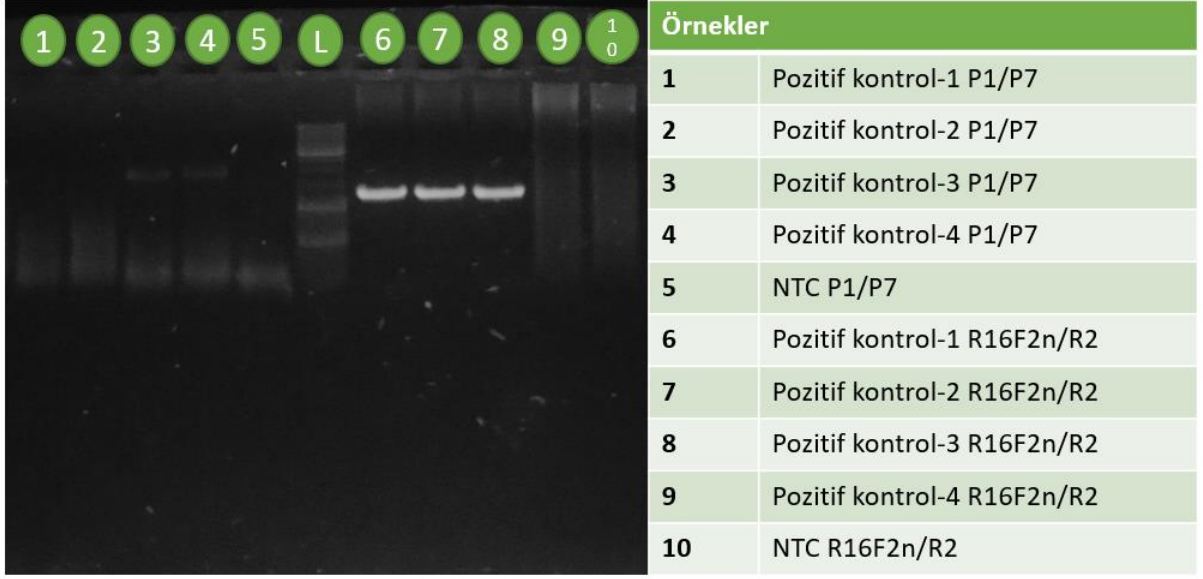
şekil 4.7: Farklı fitoplazma DNA'larının *AmpliTaq* polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü



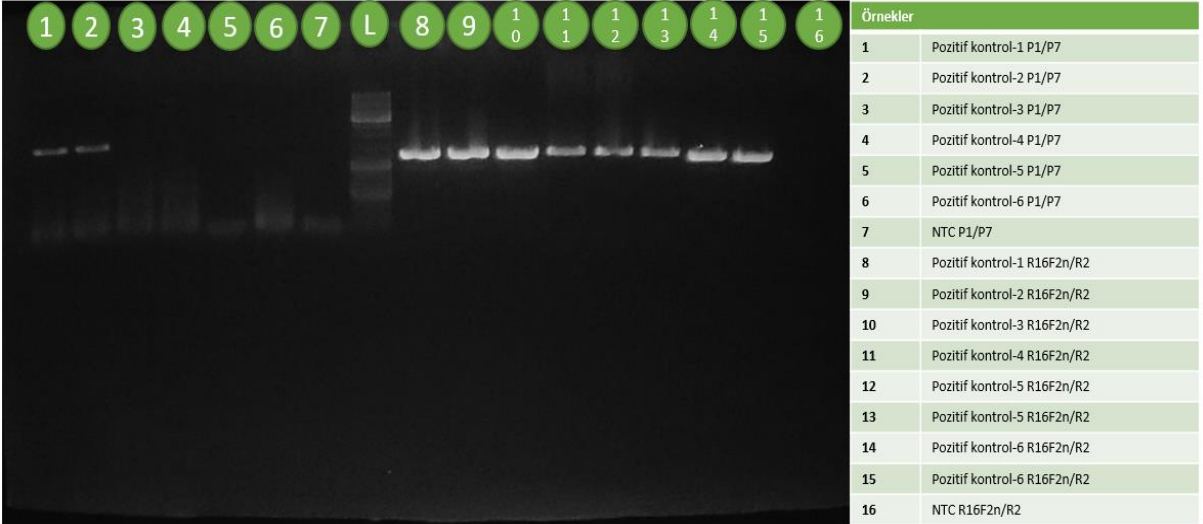
şekil 4.8: Farklı fitoplazma DNA'larının *EpisoZyme Taq* polimeraz (KTK) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü



şekil 4.9 Farklı fitoplazma DNA'larının *KOD* polimeraz (KTK) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü



şekil 4.10: Farklı fitoplazma DNA'larının Q5 polimeraz (NEB) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü



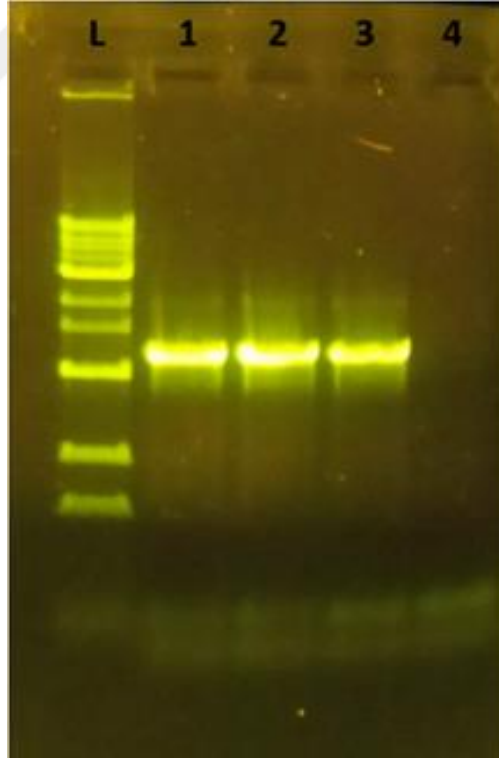
şekil 4.11: Farklı fitoplazma DNA'larının *Phusion* polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonuna ait jel görüntüsü

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinden DNA izolasyonu CTAB yöntemi ile 1 saat ve gece boyu inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve inkübasyon süresinin DNA miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) cihazı ile ölçülerek incelenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinden izole edilen DNA'nın NanoDrop sonuçları

Örnek	Miktar (ng/μl)	260/280	260/230
<i>S. lycopersicum</i> (1 saat)	998.5	2.16	2.15
<i>S. lycopersicum</i> (gece boyu)	371.8	2.13	1.94
<i>S. lycopersicum</i> (Negatif kontrol)	871	1.90	2.01

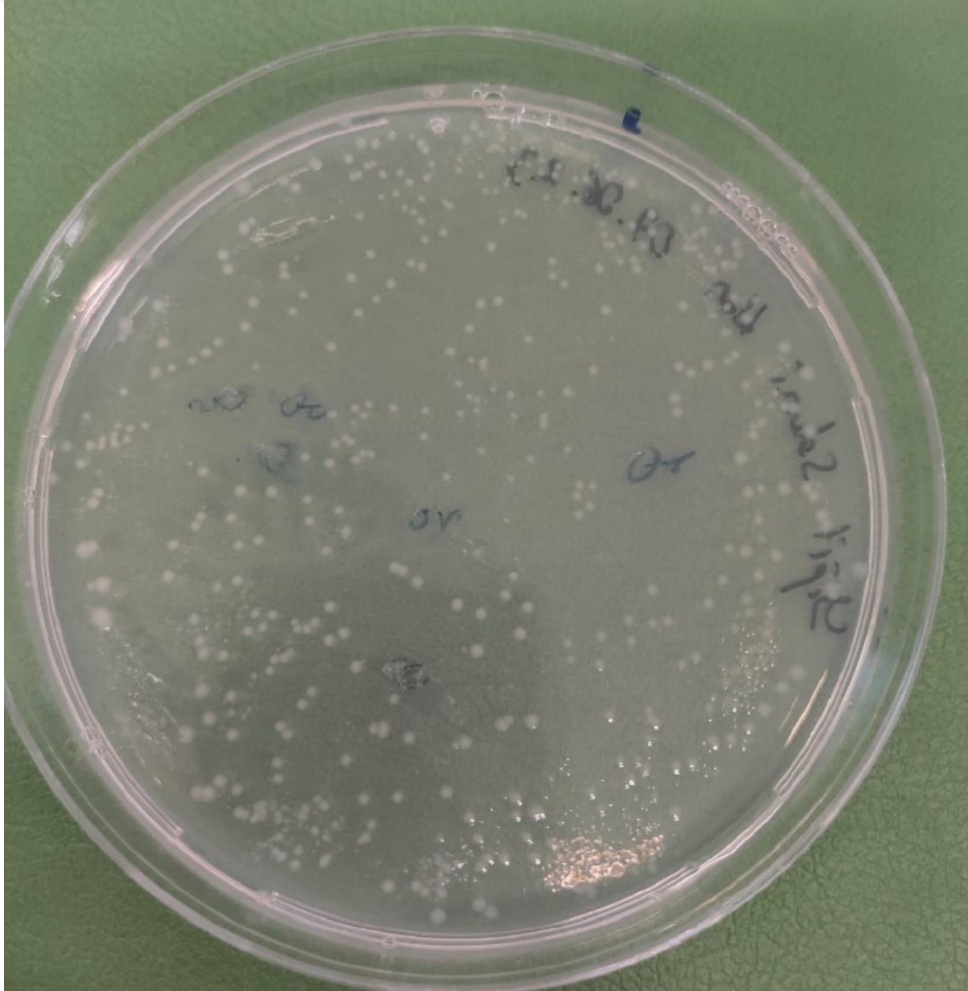
Araziden toplanan domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisinden izole edilen DNA'lar polimeraz etkinlik analizi sonuçlarına göre *Phusion* polimeraz (Thermo Scientific) kullanılarak nested-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil. 4.6). Edilen bant uzunluğu yaklaşık 1.2 kb olup beklenen bant uzunluğundadır.



şekil 4.12: R16F2n/R2 primeri ile yapılan nested-PCR analizi sonucu. L: ladder, 1: *S. lycopersicum* (1 saat), 2: *S. lycopersicum* (gece boyu), 3: Pozitif kontrol, 4: NTC (non-template kontrol).

4.3. FİTOPLAZMA ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI, AKTARIMI VE SEKANSLANMASI

Elde edilen 1.2 kb uzunluğundaki R16F2n/R2 ürünü NucleoSpin Gel & PCR Clean-up Mini kit (Macherey-Nagel) kullanılarak üretici talimatlarına göre saflaştırılarak klonlama için uygun hale getirilmiştir. Saflaştırılan ürün CloneJet PCR klonlama kiti (Thermo Scientific) kullanılarak pJet 1.2 plazmidi içerisine üretici talimatlarına göre klonlanmıştır. Plazmid daha sonra *E. coli* dh5 α suşuna aktararak amfisilin antibiyotiği içeren petrilerde ekilmiş ve kolonilerin büyümesi için 37°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Aktarımı başarılı şekilde gerçekleşen koloniler plazmid içerisinde bulunan amfilisin direnç geni sayesinde büyüme göstermiştir (şekil 4.7).



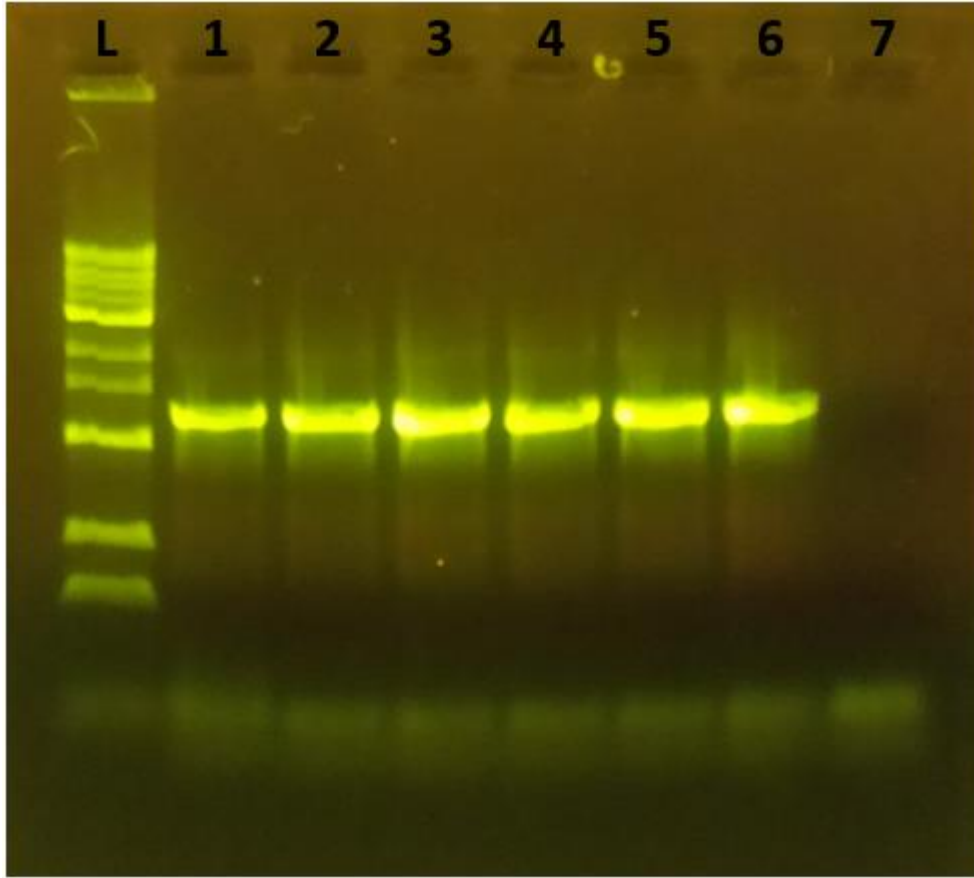
şekil 4.13: Aktarımı gerçekleşen *E. coli* dh5 α kolonileri

Büyüme gösteren koloniler seçilerek izolasyonları gerçekleştirilmiştir ve miktar ve kalite analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Aktarımı başarılı şekilde gerçekleşen plazmidlerin NanoDrop sonuçları.

Örnek	Miktar (ng/μl)	260/280	260/230
Plazmid-1	2561.8	2.04	2.26
Plazmid-2	3489.3	2.11	2.31
Plazmid-3	2817.1	2.05	2.20
Plazmid-4	3150.2	2.14	2.41
Plazmid-5	2377.4	2.10	2.36

İzole edilen plazmidler R16F2/R2 primeri ile tekrardan amplifikasyonu gerçekleştirilerek ürünün klonlandığı teyit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.14: R16F2n/R2 primeri ile yapılan PCR analizi sonucu. L: ladder, 1-5: Plazmid, 6: Pozitif kontrol, 7: NTC (non-template kontrol).

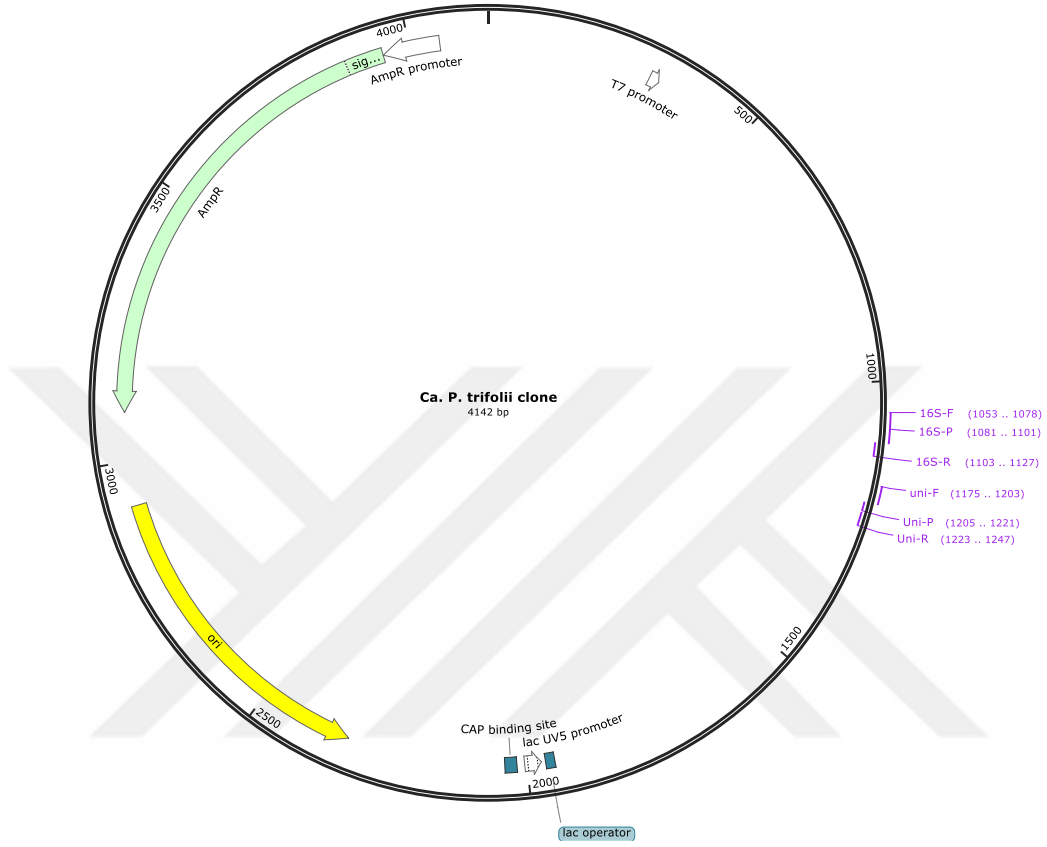
4.4. DNA SEKANS ANALİZİ VE SANAL RFLP

Sekanslama işlemi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiş olup çift yönlü olacak şekilde yapılmıştır. Sekans verileri DNA Dragon (v1.9.2) yazılımı kullanılarak birleştirilmiştir. Bu kapsamda sekans kromatogramına göre baştan 10 baz ve sondaki kirli okumalar göz ardı edilerek birleştirilmiştir. Sekansların birleştirilmiş son hali ise aşağıda verilmiştir.

>S.lycopersicum_R16F2n/R2_izolat

```
TTTTTGTTTTTAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCA
CATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGA
CTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAAAA
AGTAGTGGA AAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT
GTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGCTTA
ACGCTGTCTTGTTATAGAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAGAGGCAAGCGG
AATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCG
TAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGT
CGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGT
ACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTG
GATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATA
CTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCA
TGTTGTGTCGTAGTTTCGTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGC
AACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCC
AATTAAACATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATG
ATCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCG
AGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAAC
CGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCAGTCGC
```

Birleştirilmiş sekans verisi ise Snapgene Viewer (v6.2.2) programı kullanılarak haritalanmıştır (şekil 4.9)



Şekil 4.15: Birleştirilmiş sekans verisinin haritası

Birleştirilmiş sekans Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak hizalanmış ve diğer fitoplazma sekansları ile benzerlikleri belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre en yüksek benzerlik oranına sahip sekans %99,91 benzerlik ile MK209688.1 erişim numarasına sahip *Ca. P. trifolii* olduğu belirlenmiştir (şekil 4.10).

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate Sanliurfa-TR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2152	2152	100%	0.0	99.91%	1195	MK209688.1
☒ Eggplant big bud phytoplasma clone Zanjan 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Eggplant big bud...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1250	MT240537.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate GrS93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1243	MN224665.1
☒ 'Tamarix aphylla' witches'-broom phytoplasma clone Chah Afzal Taa84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Tamarix aphylla'...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1250	MK313754.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate RWB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1223	MH430092.1
☒ 'Solanum melongena' big bud phytoplasma Yazd 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Solanum melong...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1250	MG760570.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone 115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1249	PP408997.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone tr1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1233	KY321932.1
☒ 'Cucurbita pepo' phytoplasma clone Neyshabur 16S ribosomal RNA gene, 16S-23S ribosomal RNA intergenic sp...	'Cucurbita pepo'...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1810	KP119494.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone M45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16S-23S ribosomal RNA i...	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1792	OP793485.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone M3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16S-23S ribosomal RNA in...	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1535	OP793481.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone 31.R16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1205	OR429419.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii strain Rus-361Fc1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1551	KP864671.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii strain Rus-355F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1550	KP864669.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Syr-1982F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1551	OQ120451.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Syr-1981F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1551	OQ120436.1
☒ Behshahr(Iran) periwinkle phylloxy phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Behshahr(Iran) p...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1479	KC661072.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate CtgWBP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1328	OM964913.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Igdir 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1254	OM663745.1
☒ 'Vigna unguiculata' virescence phytoplasma isolate Tabriz-172 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal...	'Vigna unguiculat...'...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1674	KC633094.1
☒ 'Vigna unguiculata' virescence phytoplasma isolate Nazarfou 182 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 16...	'Vigna unguiculat...'...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1810	KC633092.1
☒ Candidatus Phytoplasma solani isolate Abarkoh2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1402	KF130966.1
☒ Candidatus Phytoplasma trifolii clone AP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2143	2143	100%	0.0	99.74%	1346	MT981209.1

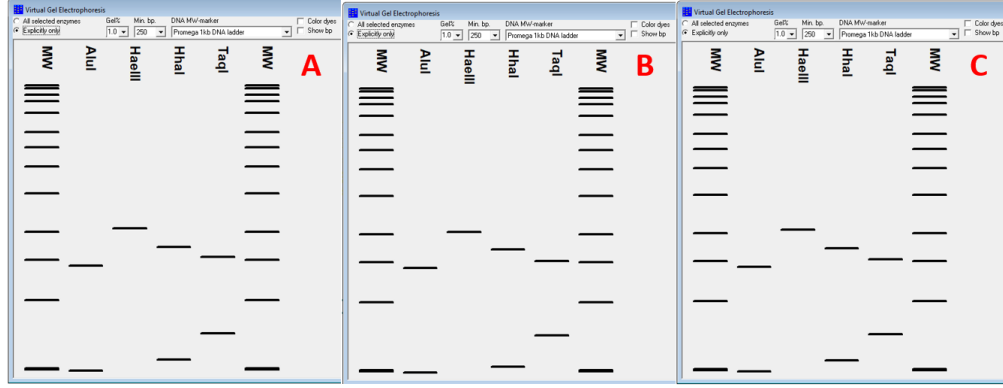
Şekil 4.16: Birleştirilmiş sekansın BLAST analizi sonucu.

Ca. P. trifolii referans sekans (AY390261.1) ile benzerlik oranı ise %99.41 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
select all 0 sequences selected								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic sp...	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1809	AY390261.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone 2017CAP050-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2130	2130	100%	0.0	99.49%	1250	OQ597719.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone 65-Pot 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1253	MH683601.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Aceratagalia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1258	MG958640.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Aliaab80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1251	MT674293.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone as1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1250	MK107819.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Broccoli-Zac 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1258	KR259945.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone ChZac5F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1258	KM095132.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Cph3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1250	KT807467.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Jgdir 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2128	2128	100%	0.0	99.49%	1251	MT344968.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone Ipekpolu S2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1259	QN231787.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA inte...	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1796	QF793480.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii clone M49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA int...	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1794	QF793486.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii gene for 16S ribosomal RNA, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer region, 23...	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1767	AB279597.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate LH21-362-CaTrifolii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1244	QR428570.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii isolate Phyto-ZacAgs08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1258	MF888941.1
☐ Candidatus Phytoplasma trifolii strain AK-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA in...	Candidatus Phyt...	2126	2126	100%	0.0	99.49%	1749	EU346380.1

Şekil 4.17: Birleştirilmiş sekansın BLAST analizi sonucu.

Fitoplazmaların moleküler karakterizasyonunda gerekli olan bir diğer analiz ise RFLP analizidir ve günümüzde RFLP analizi in-silico olarak da yapılabilmektedir. Bu kapsamda sekans sonucuna göre *Ca. P. trifolii* olarak belirlediğimiz örneğin sekansı, oluşturduğu motiflerden dolayı *Ca. P. trifolii* için ayırt edici özellikte olan *AluI*, *HaeIII* *HhaI* ve *TaqI* kesim enzimi ile pDRAW32 (v1.1.147, <https://www.acaclone.com>) kullanılarak sanal RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. Kesim enzimleri ile elde edilen motif, benzerlik oranının en yüksek olduğu sekans (%99.91, MK209688.1) ve referans sekans (%99.41, AY390261.1) ile aynı motife sahip olup domates bitkisinden (*Solanum lycopersicum* L) izole edilen fitoplazmanın *Ca. P. trifolii* olduğu bulunmuştur (Şekil 4.12).

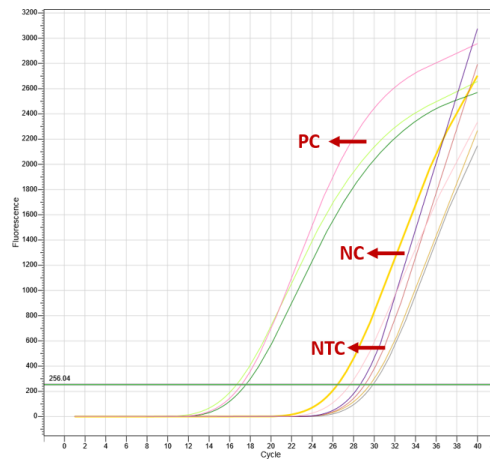


şekil 4.18: pDRAW32 ile gerçekleştirilen sanal RFLP analizi. A. Yılmaz ve ark. (2019) MK209688.1; B. Domatesten elde edilen sekans; C. Referans sekans AY390261.

4.5. FİTOPLAZMALARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PCR) İLE TEŞHİSİ

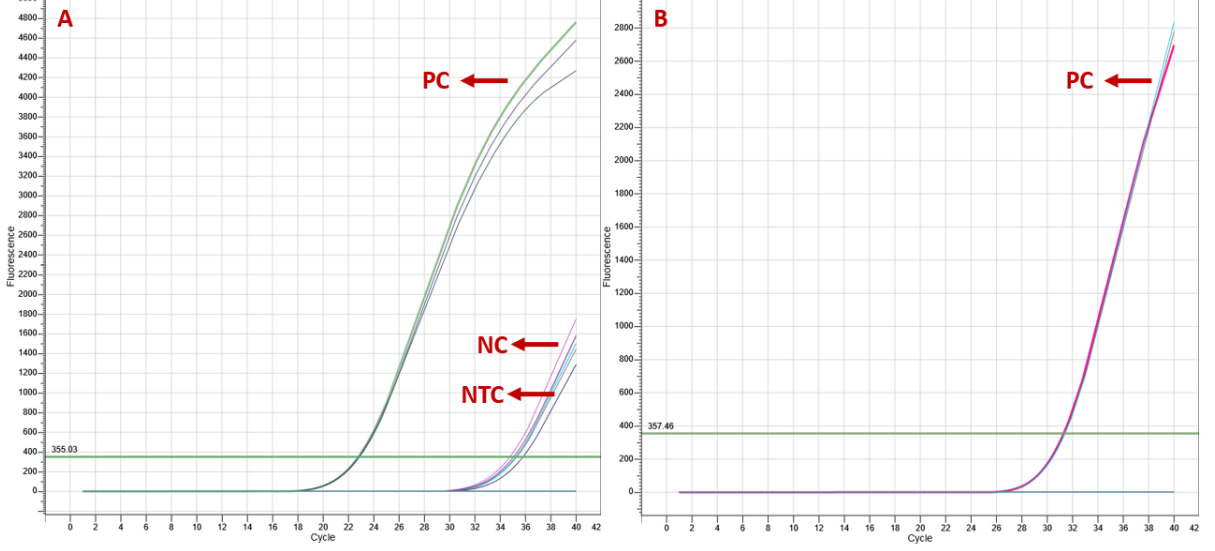
2021 yılında araziden toplanan ve hastalık etmeninin *Ca. P. trifolii* olarak tespit ettiğimiz domates bitkisi Tablo 9’da verilen primerler kullanılarak gz-PCR analizi ile tekrar edilmiştir.

Bu kapsamda probe ve SybrGreen tabanlı iki yöntem karşılaştırılarak, SybrGreen tabanlı analizlerde gözlenen non-spesifik amplifikasyonlardan dolayı analizlere probe tabanlı yöntem ile devam edilmiştir (Şekil 4.13).



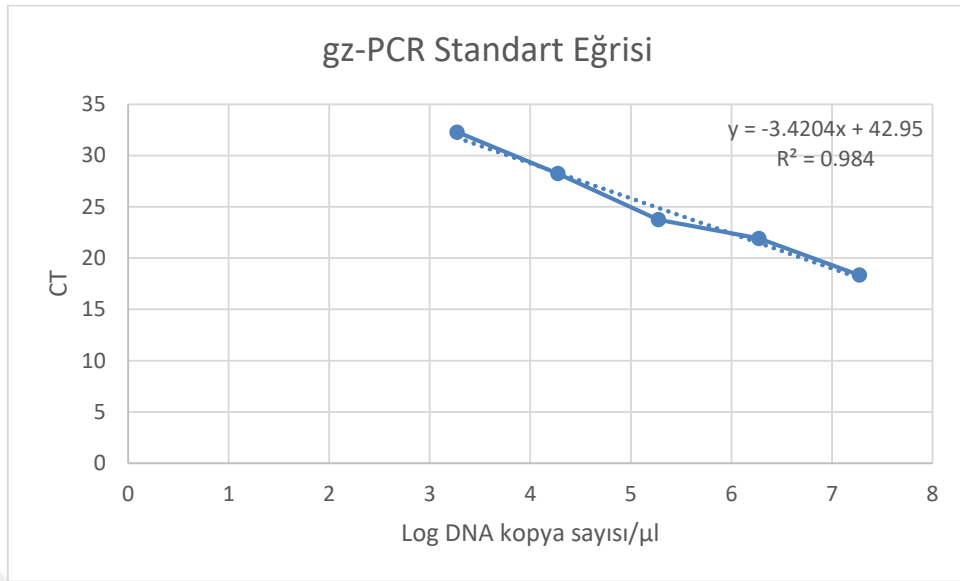
Şekil 4.19: SybrGreen tabanlı gerçekleştirilen analize ait amplifikasyon grafiği. PC, pozitif kontrol; NTC, non-template kontrol; NC, negatif kontrol.

Probe tabanlı gerçekleştirilen analizlere göre ise Hren ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu primerlerin fitoplazmaların gz-PCR tabanlı amplifikasyonu için daha uygun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



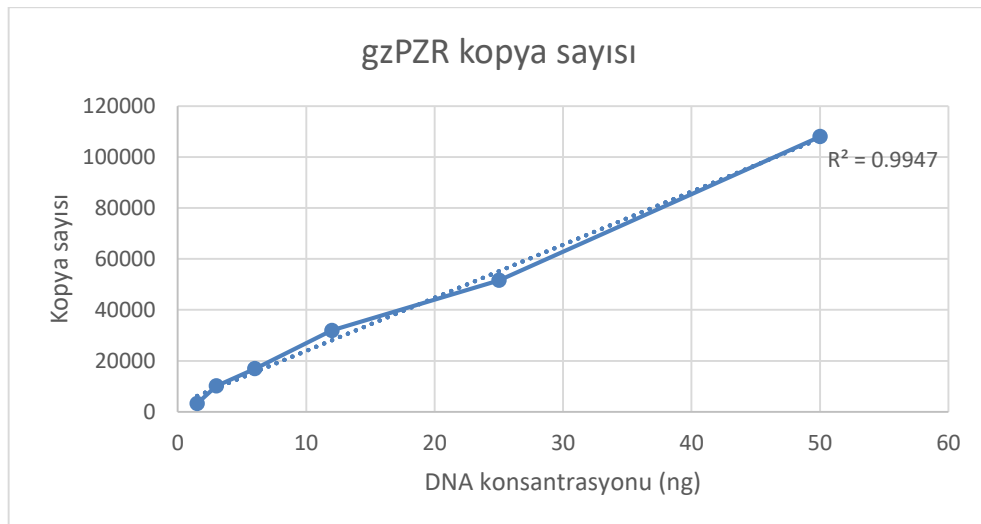
Şekil 4.20: Probe tabanlı gerçekleştirilen analizlere ait amplifikasyon grafiği. A, Christensen ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu primer (16S); B, Hren ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu primer (UNI); PC, pozitif kontrol; NTC, non-template kontrol; NC, negatif kontrol.

Mutlak miktar tayini ve PCR verimi hesaplamaları için kısım 3.4'te ifade edildiği üzere hazırlanan PCR ürünleri ile hesaplanmıştır. Bu kapsamda PCR ürünü kopya sayıları 1.8×10^7 , 1.8×10^6 , 1.8×10^5 , 1.8×10^4 ve 1.8×10^3 olacak şekilde seyreltilen örnekler ile gz-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ile bir standart eğri oluşturulmuştur ve bu eğrinin eğimine bağlı olarak verimi belirlenmiştir. Standart eğrinin eğimi -3.4204 olup PCR verimi (E) $E = 10^{-1/\text{eğim}}$, % PCR verimi (%E) ise $\%E = (E - 1) \times 100$ formülüne göre hesaplanmaktadır (şekil 4.13). Elde edilen sonuçlar formüllerde yerine yerleştirildiğinde PCR verimi %96 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21: PCR ürünü kullanılarak hazırlanan standart eğri (n=6, p<0.05).

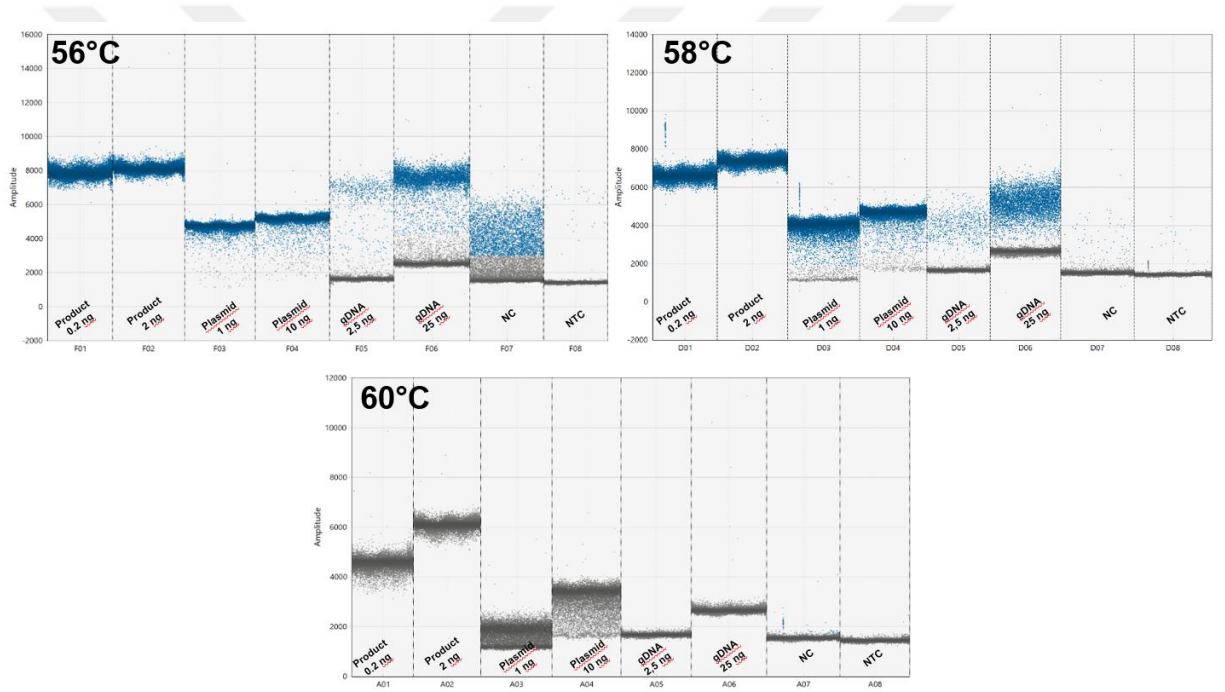
Fitoplazma pozitif domates bitkisinden izole edilen DNA kullanılarak mutlak kopya sayısı hesaplaması ise şekil 4.15'te verilen denkleme göre hesaplanmaktadır. Ancak bu formülde ters logaritma uygulanması gerekmektedir ($x = (y + 43.404) / 3.124$). Burada y değeri mikrolitre başına karşılık gelen kopya sayısının logaritmik değeri olduğu için çıkan sonucun ters logaritma değeri bize mutlak kopya sayısını vermektedir.



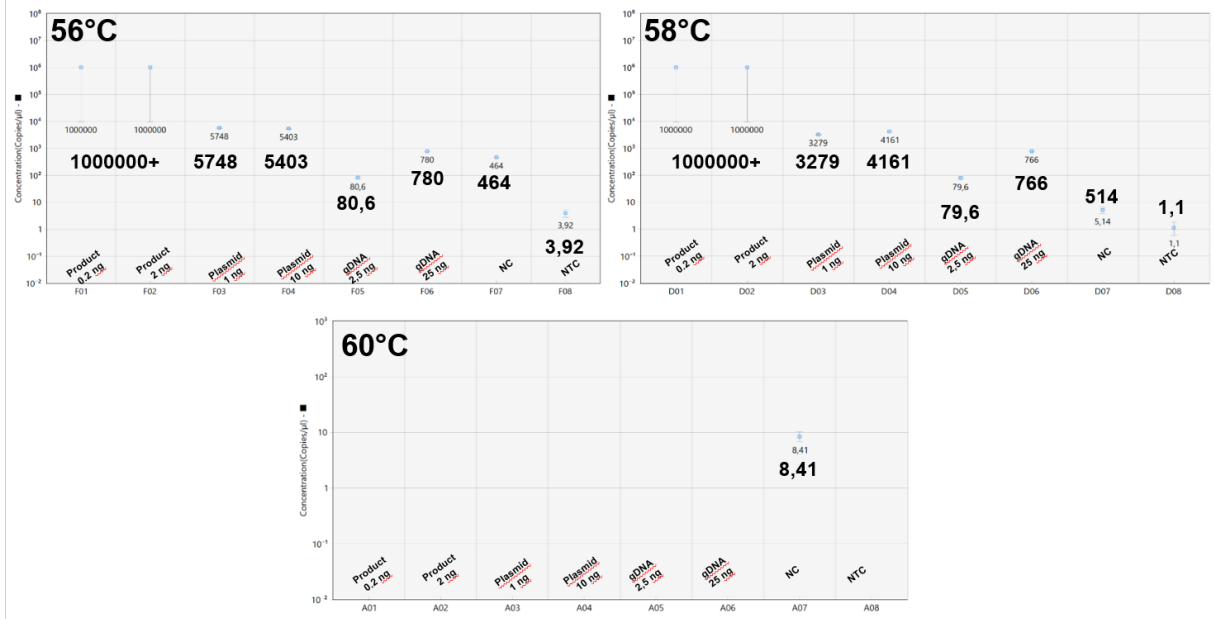
Şekil 4.22 Fitoplazma pozitif domates bitkisinden izole edilen ve ardışık seyreltme yapılarak DNA ile gerçekleştirilen gzPCR'da elde edilen kopya sayısı grafiği (n=6, p<0.05)

4.6. FİTOPLAZMALARIN DROPLET DİJİTAL PCR (DDPCR) İLE TEŞHİSİ

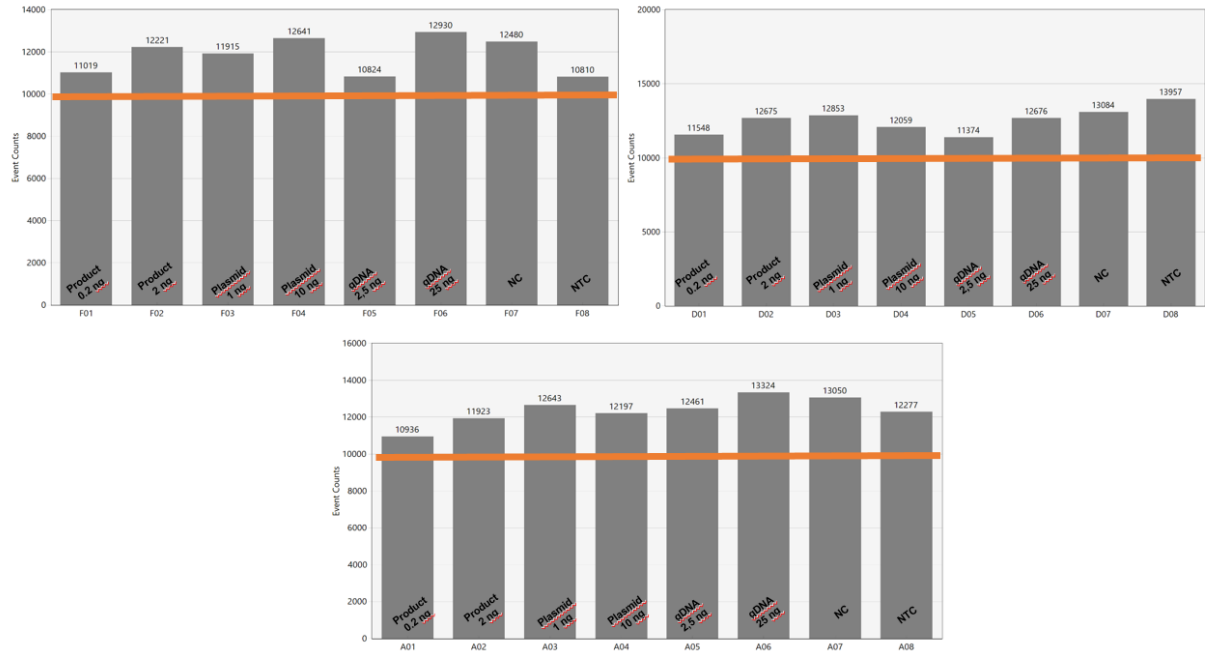
ddPCR sistemlerinde gerçekleştirilen amplifikasyonlar gz-PCR sistemlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu bağlamda Christensen ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu 16S primeri ile EvaGreen tabanlı gradient PCR analizi gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular gz-PCR elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Gerçekleştirilen analizlerin tamamında oluşturulan droplet sayısı 10.000 ve üzeri olup istatistiki olarak kabul edilebilir düzeydedir ve bütün sıcaklık derecelerinde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenmiş olup fitoplazmaların tespitinde probe tabanlı analizlerin kullanılması uygun görülmüştür (Şekil 4.17-4.19)



şekil 4.23: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR amplifikasyon grafiği

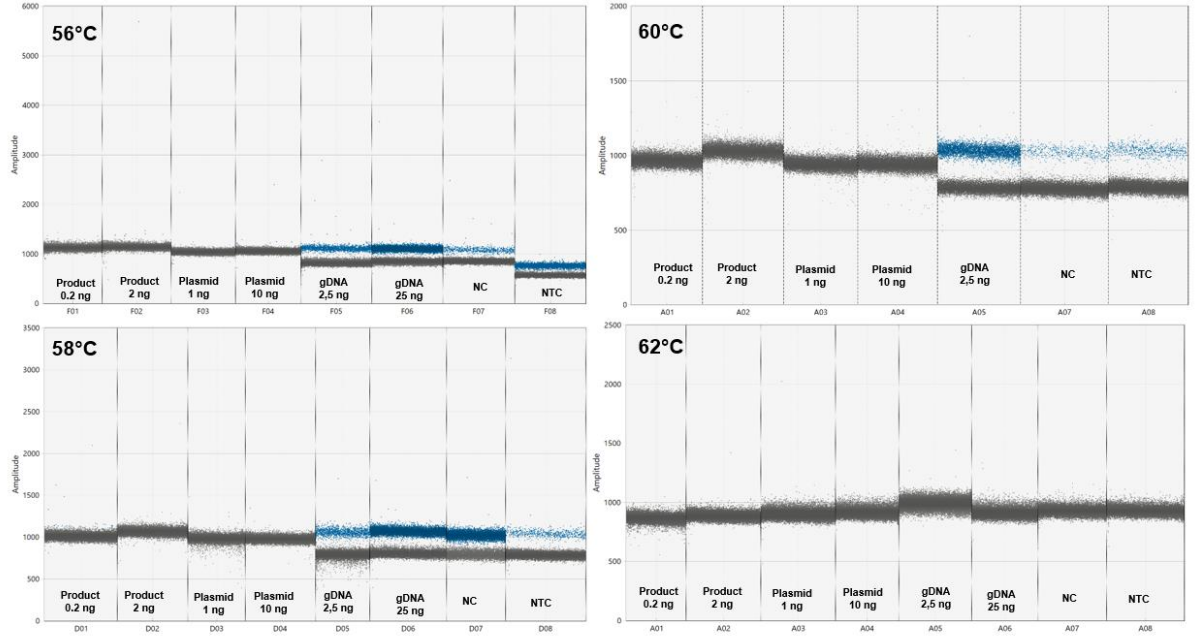


Şekil 4.24: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR kopya sayısı grafiği

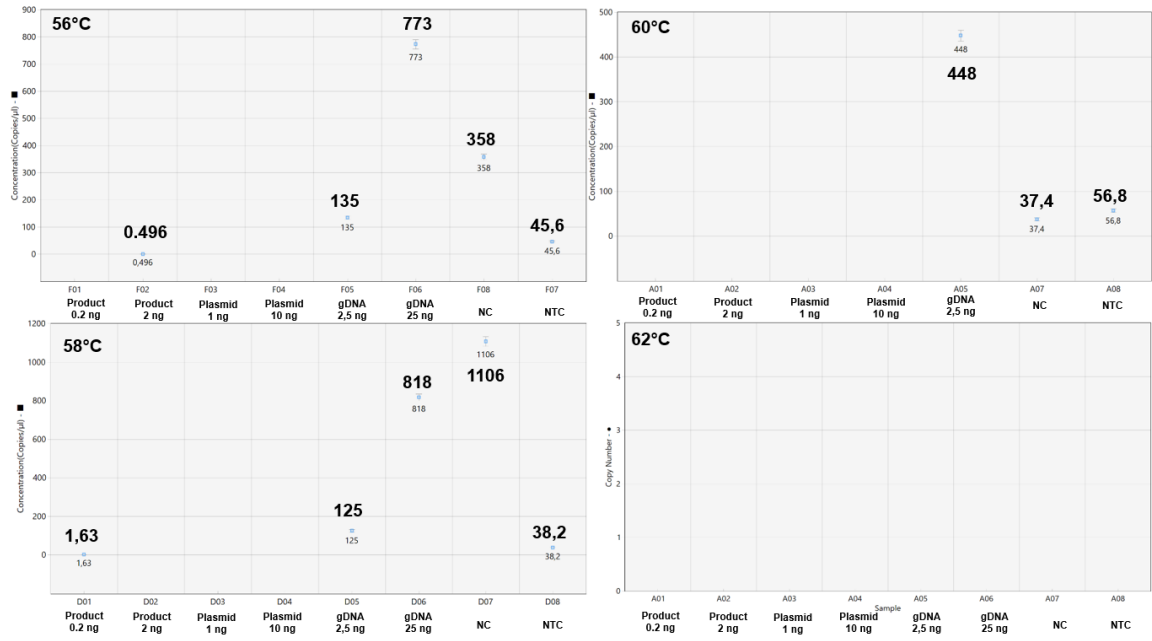


Şekil 4.25: EvaGreen tabanlı gradient ddPCR droplet sayısı grafiği

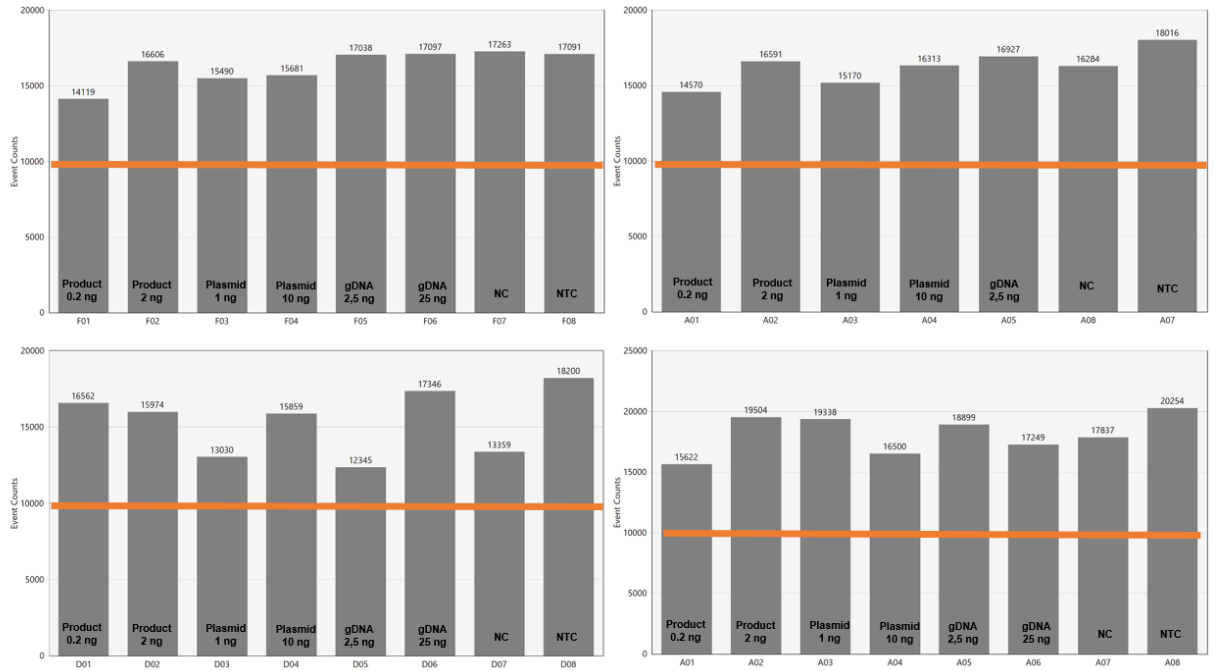
Probe tabanlı analizlerde ilk olarak Christensen ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiş olup uygun bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. Yapılan analizler neticesinde 16S primerleri için uygun bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiş olup gz-PCR tespit edilen non-spesifik amplifikasyon görülmeye devam edilmiştir (Şekil 4.20-4.22)



Şekil 4.26: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR amplifikasyon grafiği

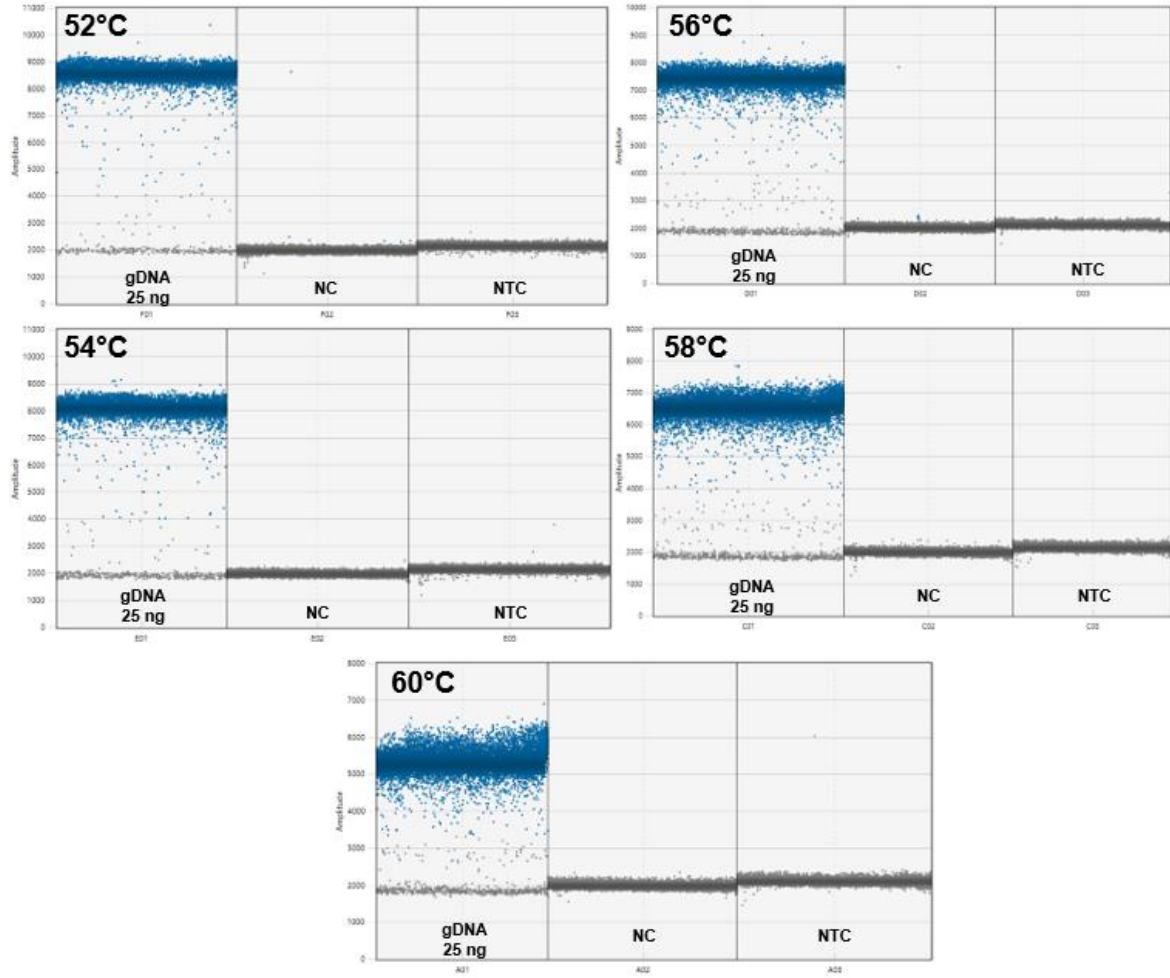


Şekil 4.27: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR kopya sayısı grafiği

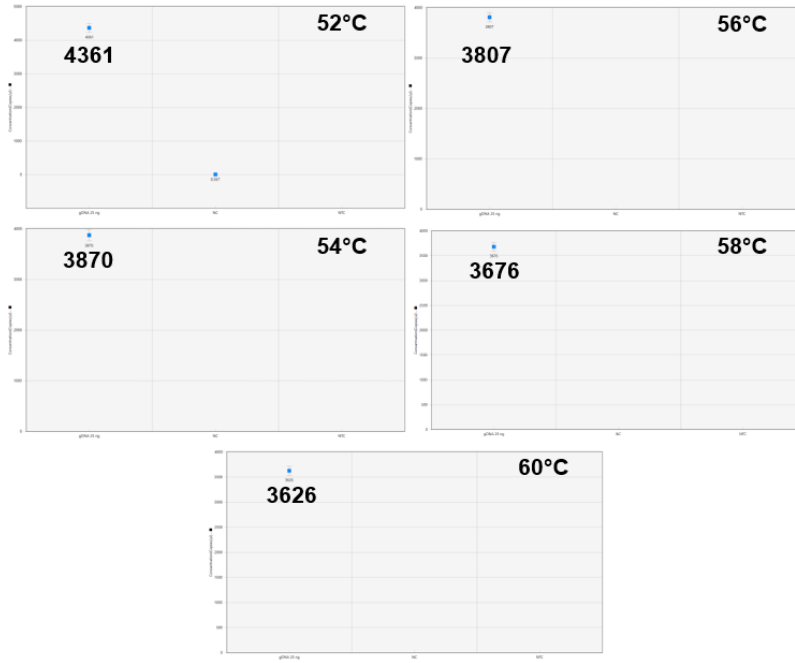


Şekil 4.28: Christensen ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR droplet sayısı grafiği

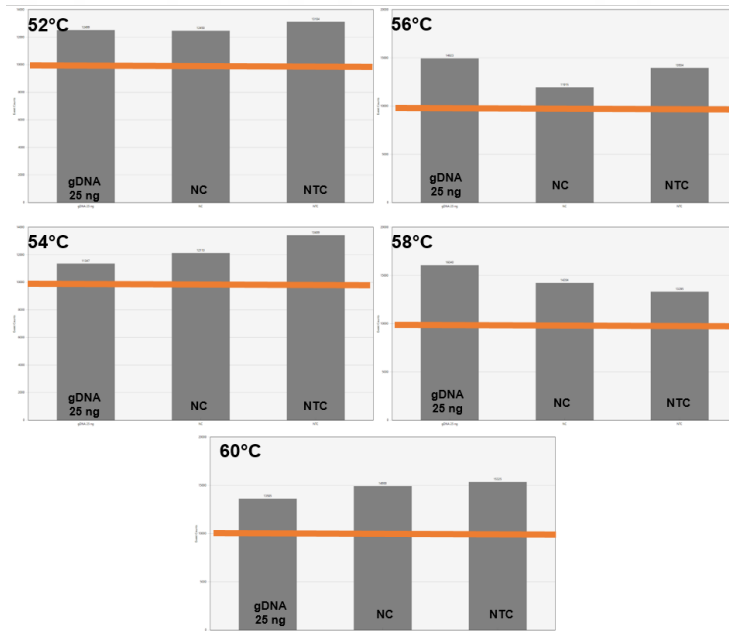
Hren ve meslektaşlarının geliştirmiş olduğu UNI primerleri için de aynı analizler tekrar edilerek uygun bağlanma sıcaklıkları gerçekleştirilmiş olup UNI primeri için uygun bağlanma sıcaklığı 58°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.23-4.25).



Şekil 4.29: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR amplifikasyon grafiği

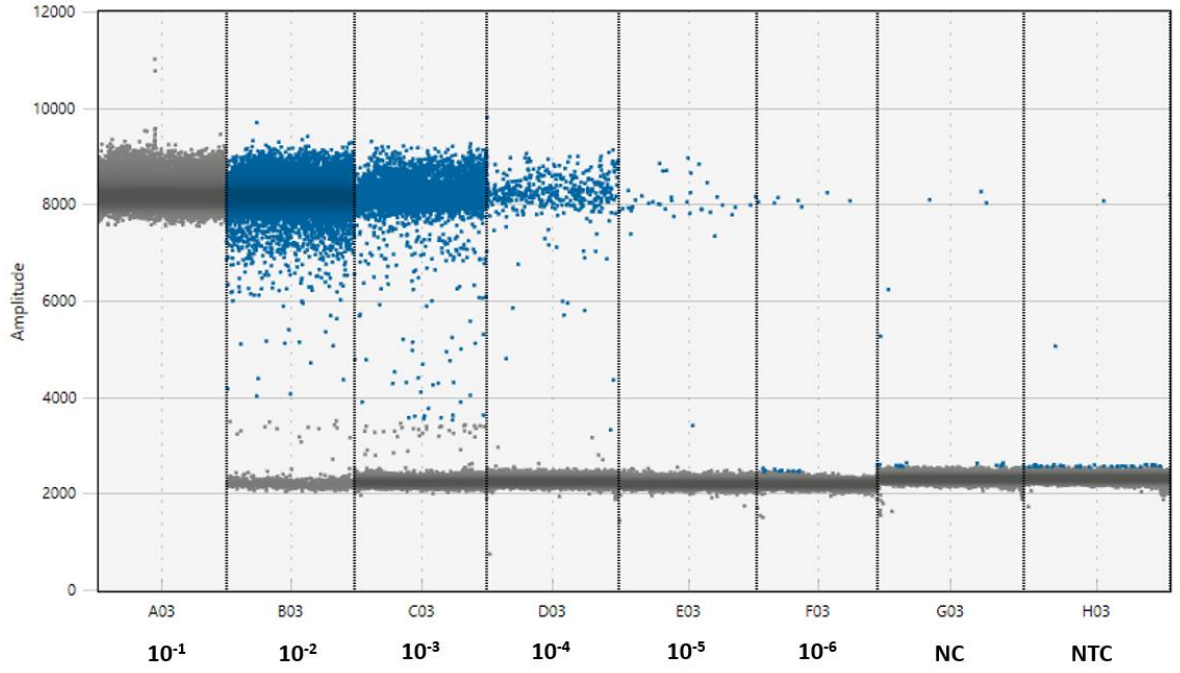


Şekil: 4.30: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR kopya sayısı grafiği

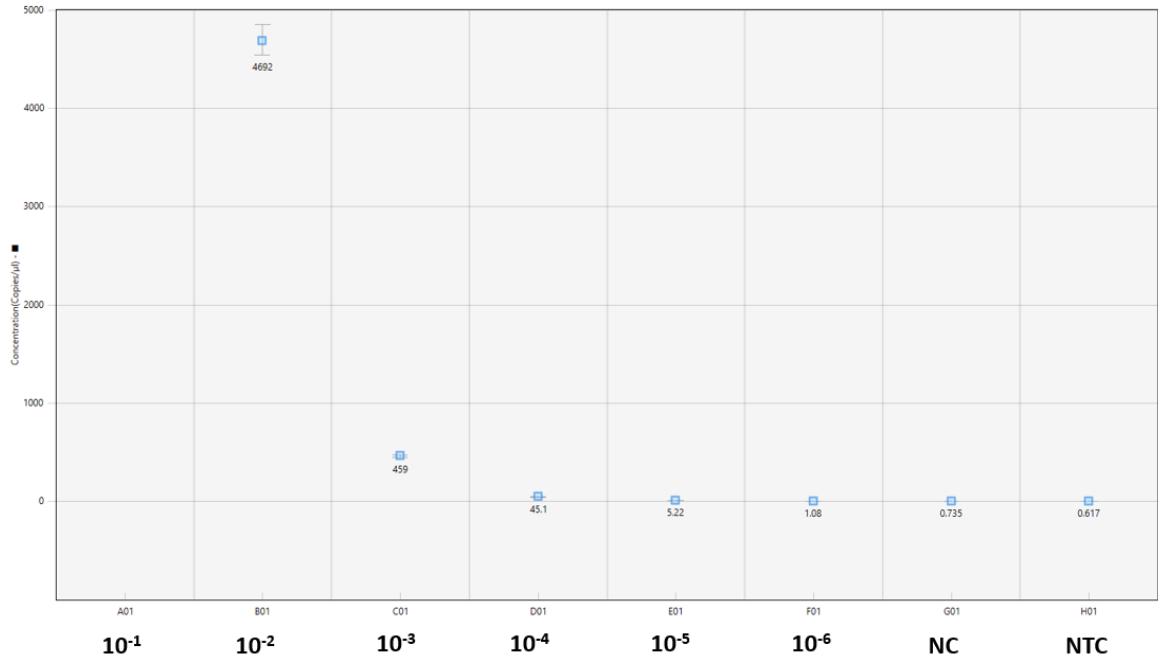


Şekil 4.31: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile gerçekleştirilen gradient ddPCR droplet sayısı grafiği

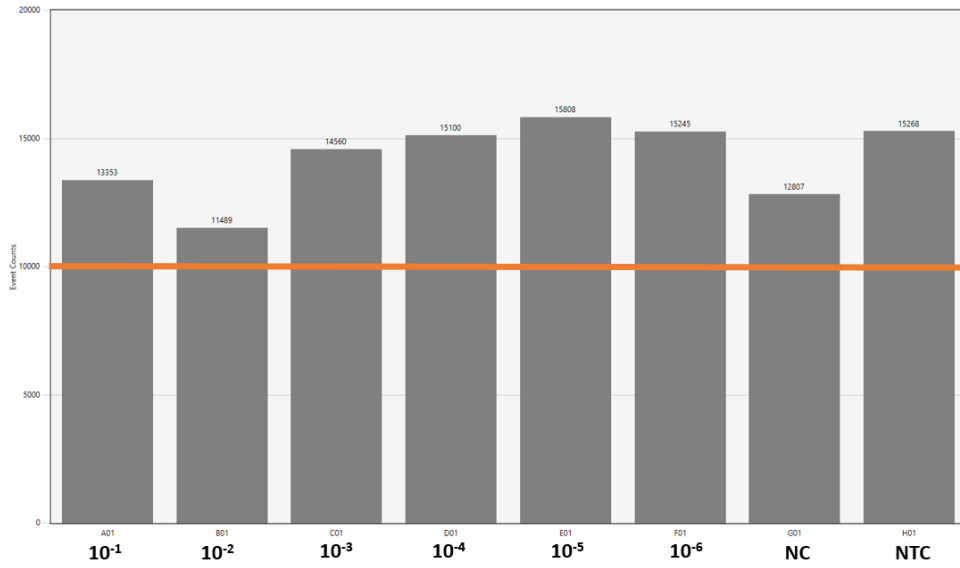
Uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesinin ardından genomik DNA ve PCR ürünü ile hazırlanmış standart ile fitoplazmaların mutlak miktar tayin analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü ile hazırlanmış standart kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde ardışık seyreltmeler arasında beklenen ve tespit edilen kopya sayıları birbiri ile tutarlılık ve yüksek korelasyon göstermektedir. ddPCR'ın herhangi bir standarta ihtiyaç duymadan mutlak miktar yapabildiği yapılan bu analiz ile bir kez doğrulanmıştır (Şekil 4.26-4.28).



Şekil 4.32: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR amplifikasyon grafiği

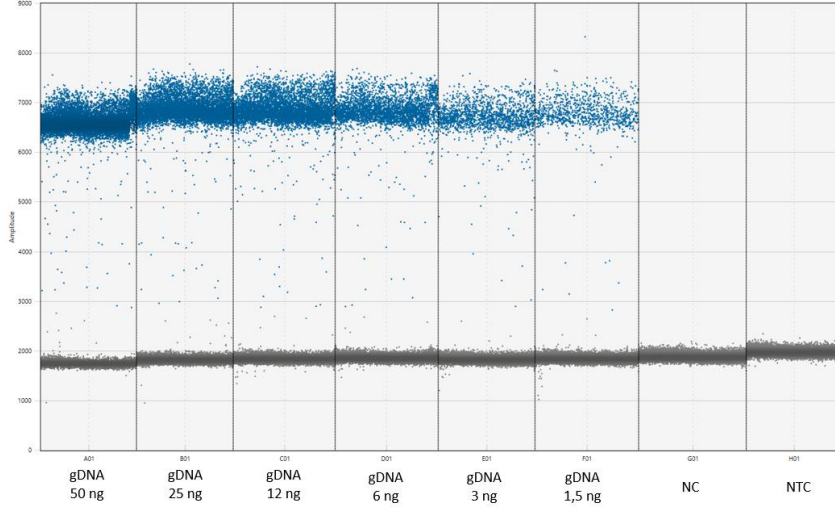


Şekil 4.33: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR kopya sayısı grafiği

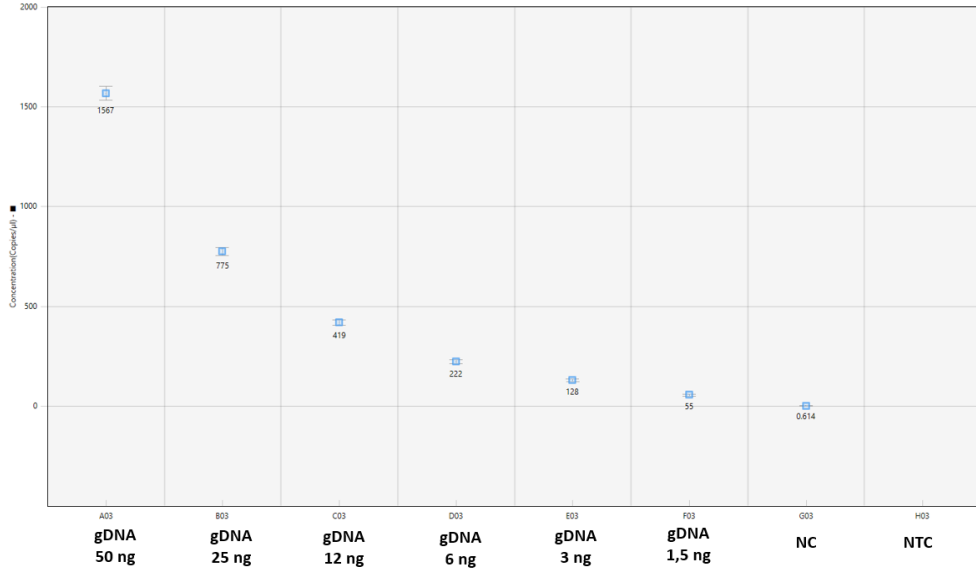


Şekil 4.34: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR droplet sayısı grafiği

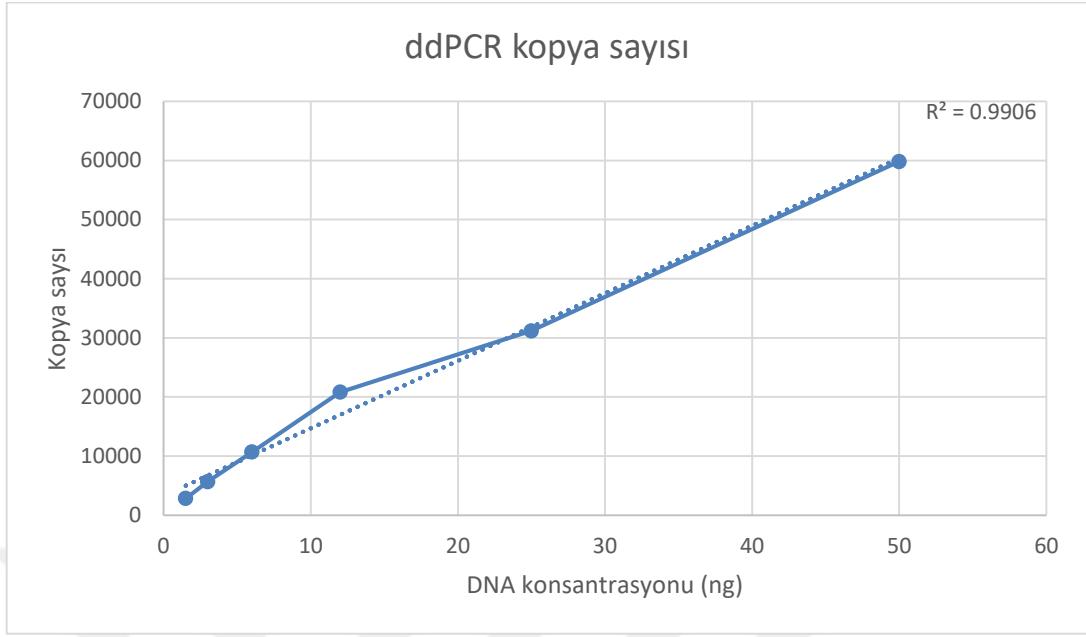
Bitki içerisindeki fitoplazma miktarını hesaplamak için fitoplazma ile enfekte olmuş domates DNA'sı 2'şer katlık ardışık seyreltmeler ile ddPCR analizlerine tabi tutulmuştur. Ardışık seyreltmeler arasındaki kopya sayıları farkı yüksek korelasyon göstermektedir (Şekil 4.27-4.29).



Şekil 4.35: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR amplifikasyon grafiği



Şekil 4.36: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR kopya sayısı grafiği



şekil 4.37: Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primerler ile genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen ddPCR analizi sonucu elde edilen mutlak kopya sayısı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaklaşık 50 yıl önce bilimsel anlamda ilk defa keşfedilen fitoplazmaların konukçu bitkilerdeki düşük titrelerinden ve özellikle odunsu bitkilerin floem dokusundaki düzensiz dağılımlarından dolayı tespit edilmeleri zordur (Berges ve diğ., 2000). Bu mikroorganizmaların doğru ve hassas bir şekilde tespiti fitoplazma kaynaklı hastalıkların kontrolü ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilecek salgınların önlenmesi için oldukça önemlidir. Bu sebeple 16S rDNA dizisi üzerine tasarlanmış çeşitli primerlerin (bknz Tablo 2.1 ve 2.2) farklı kombinasyonları kullanılarak fitoplazmaların tespiti rutin bir şekilde yapılmaktadır. Tespit edilen fitoplazmaların karakterizasyonu ise elde edilen PCR ürünlerinin 17 farklı kesim enzimi (bknz. kısım 3.5) ile oluşturduğu RFLP motiflerine ve sekans analizine dayanmaktadır. (Lee ve diğ., 1998). Bu yaklaşım ile dünya çapında 37 grup ve 140'dan fazla alt gruba ait fitoplazma keşfedilmiştir (Wei ve Zhao, 2022).

Mikrobiyal topluluklarının 16S rDNA bölgesinin amplifikasyonu ve sekansına dayanan taksonomik yaklaşımlar oldukça önemlidir. PCR analizi tasarımıındaki çok sayıdaki faktör sekans hata oranını doğrudan etkilemektedir. Amplifikasyonda kullanılan polimeraz tercihi ise bu faktörlerden bir tanesidir. Ticari olarak üretilen polimerazların birçoğu Taq polimeraza göre daha düşük hata oranına ve daha yüksek hassasiyete sahiptir. Bu polimerazlar arasında Q5, KAPA ve Phusion 100 kat, Accuprime ve Platinum polimeraz ise 10 kat daha düşük hata oranına ve daha yüksek hassasiyete sahiptir (Sze ve Schloss, 2019). Ayrıca AT oranı %70'den fazla ve %30'dan az olan örneklerin amplifikasyonu polimerazı inhibe eden ikincil yapılar ve primerlerin yanlış bağlanması veya hiç bağlanamaması gibi nedenlerden dolayı zorlaşmaktadır (Guido ve diğ., 2016). Phusion polimeraz ise hi-fidelity ve proofreading özelliğine sahip olmakla birlikte AT oranı yüksek bölgelerin amplifikasyonu için ideal bir polimeraz olarak karşımıza çıkmaktadır. Fitoplazmaların genomları yaklaşık %77'ye varan AT oranına sahip olup amplifikasyon için zorlayıcı bir durum oluşturabilmektedir (Bertaccini ve Duduk, 2009). Fitoplazmaların bu özelliklerinden dolayı ve karakterizasyonunun sekans verilerinin güvenilir olmasına dayanmasından dolayı tez çalışması kapsamında Phusion polimeraz tercih edilmiştir. Her ne kadar polimerazların mutasyon oranları düşük olsa da daha saf ve konsantre ürün elde edilmesi adına PCR ürünlerinin plazmid içerisine klonlanıp E. coli'ye aktarılması avantaj sağlamaktadır. Bazı E. coli suşlarının mutasyon oranı milyarda 1'e yakın olup en verimli polimerazdan bile daha düşüktür (Tago ve diğ., 2005).

Çalışmada kullanılan deney materyali olan enfekte domates bitkisinin amplifikasyonu Phusion polimeraz ile gerçekleştirilmiş olup PCR ürünü önce *E. coli* dh5α suşuna aktarılmış ve daha sonra sekanslamaya tabi tutulmuştur. Sekans verilerinin BLAST analizi göre, Wei ve Zhao (2019)'nun yayınlamış oldukları yönergedeki önermeler doğrultusunda domates bitkisinin *Ca. P. trifolii* ile enfekte olduğu tespit edilmiş olup referans sekans (AY390261.1) ile benzerliği %99.41'dir. En çok benzerlik gösteren sekans (%99.91) ise MK209688.1 erişim numaralı olan ve ülkemiz sınırları içinde tespit edilmiş biber bitkisinden izole edilen *Ca. P. trifolii*'ye aittir (Yılmaz ve diğ., 2019). Sanal RFLP analizi ise Yılmaz ve meslektaşlarının (2019) kullanmış olduğu kesim enzimlerine (*TaqI*, *AluI*, *HhaI*, *HaeIII*) göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen motifler Yılmaz ve meslektaşlarının (2019) sonuçları ile benzerlik göstererek tespit ettiğimiz patojenin *Ca. P. trifolii* olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır.

Ca. P. trifolii 16SrVI grubuna dahil bir fitoplazma olup ülkemiz sınırları içinde görülen fitoplazmalar arasında yaygın bir gruptur. Ülkemizde özellikle Solanaceae familyasını enfekte eden bu fitoplazma biber, patlıcan, domates, salatalık, susam, mısır, kabak ve balkabağı bitkisinde çeşitli semptomlara yol açarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Usta ve diğ., 2018; Yılmaz ve diğ., 2019; Oksal ve diğ., 2017; Usta ve Güller, 2020; Güller, 2020; Usta ve diğ., 2021; Güller ve Usta, 2020b; Sertkaya ve diğ., 2007; Çarpar ve Sertkaya, 2022; Usta ve diğ., 2017).

Fitoplazmaların geleneksel yöntemlerle teşhisi jel görüntüleme, RFLP gibi analiz sonrası birkaç adımı daha gerektirmektedir. 2004 yılından itibaren amplifikasyon sonrası adımları gerektirmeyen evrensel veya grup spesifik gz-PCR gibi çeşitli protokollerin önerildiği yaklaşımlar geliştirilmiştir. Christensen ve meslektaşları (2004)'te yapmış oldukları çalışma sonucu ilk 16S rDNA tabanlı gz-PCR protokolü geliştirilmiş olup aynı zamanda fitoplazmaların bitki içerisindeki titrelerinin de hesaplanmasına olanak sağlanmıştır (Christensen ve diğ., 2004). İlerleyen yıllarda Galetto ve meslektaşları (2005) ve Hren ve meslektaşları (2007)'de iki farklı evrensel fitoplazma primeri daha geliştirerek bu alanda katkılarını sunmuşlardır (Galetto ve diğ., 2005; Hren ve diğ., 2007). Bu çalışmalarda protokollerin ortak noktası ise fitoplazmaların tespiti için tasarlanmış bir probe kullanılması ve primerlerin bağlanma sıcaklığının en az 60°C olmasıdır. Bu tez çalışması kapsamında Hren ve meslektaşlarının tasarlamış olduğu primer/probe kullanılmış olup primer bağlanma sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık derecelerinin altında gerçekleştirilen amplifikasyonlarda non-

spesifik sinyallerin alınma ihtimali artacağından dolayı yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir. Özellikle bakterilerin 16S rDNA bölgeleri hedef alınarak gerçekleştirilen analizlerde primer bağlanma sıcaklığı oldukça önemlidir ve her bir primerin kendine özgü optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi gerekmektedir (Sipos ve diğ., 2007). Döngü başına amplikon artışı olarak da ifade edilen PCR verimliliği (E) amplifikasyonun gerçekleştirildiği cihaz, primer dizaynı, teknik tekrarlar, reaksiyon bileşenleri, primerin bağlanma sıcaklığı ile doğrudan etkilenmektedir. (Apte ve Daniel, 2009, Svec ve diğ., 2015). 60°C’de gerçekleştirdiğimiz amplikasyonlardan elde edilen standart eğriye göre PCR verimliliği %96 olarak belirlenmiştir. İdeal bir PCR verimliliği %90-110 arasında olup bu aralıktaki değerler kabul edilebilir sınırlar içerisinde (Bu ve diğ., 2016). Fitoplazmaların kantitatif gz-PCR analizleri üzerine yapılmış araştırmaların birçoğunda PCR verimliliği üzerine fazla bir veri bulunmasa da genel olarak kabul edilebilir aralıktadırlar. Hren ve meslektaşları (2007) dizayn etmiş oldukları primerin %93-101 arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmiş olup, elde etmiş olduğumuz veriler Hren ve meslektaşları (2007) ile tutarlılık göstermektedir (Hren ve diğ., 2007). *Ca. P. prunorum* spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilmiş kantitatif gz-PCR analizinde ise PCR verimi %89-93 (Minguzzi ve diğ., 2016) ve %84-88 (Yvon ve diğ., 2009), Coconut Lethal Yellow Phytoplasma primerleri kullanılarak gerçekleştirilen analizde ise PCR verimi %104.9-108.1 (Córdova ve diğ., 2014) arasında değişkenlik göstermektedir. Ayrıca multipleks analizlerde verimliliğin %113.5’a kadar çıktığı bildirilmiş olup bütün primerlerin tek bir reaksiyon içerisinde optimum koşullarda çalışabilmesi için normal olarak kabul edilmektedir (Pelletier ve diğ., 2009) Genel olarak bildirilen PCR verimleri kabul edilebilir sınırlar içerisinde olup, elde ettiğimiz sonuçlar diğer araştırmacılarla tutarlılık göstermektedir. Gz-PCR analizlerinde anlamlı bir teşhis ve miktar tayini yapılabilmesi için PCR verimliliği oldukça önemlidir çünkü yapılacak olan miktar tayinleri elde edilen standart eğriler ve verimlilik üzerinden doğrudan etkilenmektedir (Ruijter ve diğ., 2021).

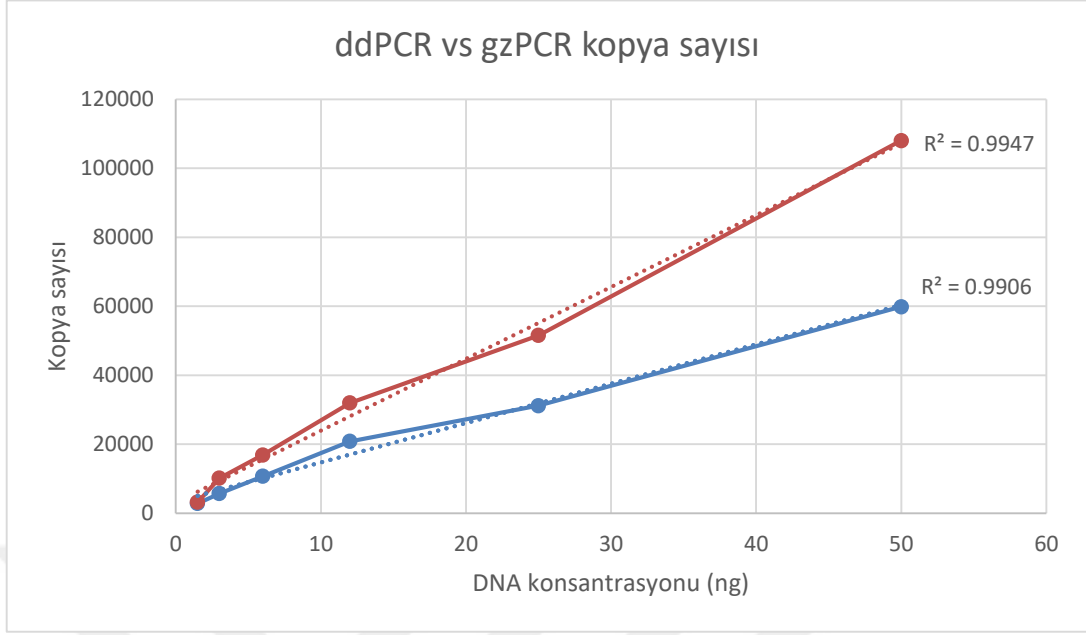
Gerçek Zamanlı PCR analizlerinde göreceli (relative quantification) ve mutlak (absolute quantification) olmak üzere iki farklı miktar tayin metodu bulunmaktadır. Göreceli miktar tayininde gen ifadesi bilinen bir dahili bir referans ile deney grubunun ifadesinin karşılaştırılması (normalizasyon) ile belirlenmektedir. Referans gen olarak genellikle housekeeping genler kullanılmakta olup aynı veya ayrı reaksiyonlarda çoğaltılarak yapılabilir. Dolayısı ile herhangi bir standarta ihtiyaç olmadan miktar tayinleri gerçekleştirilmektedir. Mutlak miktar tayini ise konsantrasyonu bilinen harici bir standart kullanılarak yapılmaktadır.

Standart olarak plazmid kullanılabiliceği gibi genomik DNA, PCR ürünü veya sentetik DNA da kullanılabilir. Standart kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre yapılan miktar tayini son derece spesifik, hassas ve tekrarlanabilir verilerin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır (Pfaffl, 2004).

Fitoplazmaların gz-PCR ile miktar analizlerinde her iki yöntem de kullanılmaktadır. Fitoplazmaların gz-PCR ile göreceli miktar analizlerinde genellikle izole edildikleri organizmanın (bitki veya böcek) housekeeping genleri veya diğer kararlı bölgeleri (18S rDNA, ITS) hedef alınmaktadır (Christen ve diğ., 2004; Marzachi ve Bosco, 2005; Ikten ve diğ., 2017). Mutlak miktar tayinlerinde ise hedeflemiş oldukları bölgelerini içeren standartlara göre yapılmaktadır (Martini ve diğ., 2007; Yvon ve diğ., 2009; Monti ve diğ., 2013; Lamilla ve diğ., 2023; Jawhari ve diğ., 2015). Bu tez çalışması kapsamında da mutlak miktar tayini yapılmış olup standart eğri için fitoplazma 16S bölgesini içeren PCR ürünü kullanılmıştır.

Saflaştırılmış PCR ürünü kullanılarak oluşturulan standart eğrinin PCR verimi %96 olup ddPCR analizlerinde başarılı bir şekilde amplifiye olmuştur. Yapılan analizlere göre beklenen ve elde edilen kopya sayıları birbiri ile tutarlılık göstermektedir. ddPCR'ın doğruluğu ve hassasiyeti çeşitli araştırmacılar tarafından da açıkça ortaya konmakla birlikte, tez çalışmasından elde edilen veriler de ddPCR'ın yüksek hassasiyete sahip olduğunu doğrulamaktadır (Falzone ve diğ., 2020; Pérez-López ve diğ., 2017; Maheshwari ve diğ., 2017 ve 2021; Hammond ve diğ., 2021; Hou ve diğ., 2023).

Gerçek zamanlı PCR sistemlerinde sağlıklı bir şekilde miktar analizi yapabilmek için düşük ct değerlerine sahip olunması gerekmektedir. Özellikle ct değeri 35 ve üzeri değerler miktar analizleri için önerilmemektedir (de Ronde ve diğ., 2018). Böyle durumlarda eşik değerinin çok iyi belirlenmesi gerekmekte olup, çok düşük eşik değerlerinde yalancı pozitif sonuçlara, çok yüksek eşik değerlerinde ise yalancı negatif sonuçlara neden olmaktadır (Ruiz-Villalba ve diğ., 2021). Hazırlanan standart eğriye göre gzPCR'da 35 ct değeri yaklaşık olarak 2000 kopyaya denk gelmekte olup sağlıklı bir şekilde analiz yapabileceğimiz minimum değer olarak belirlenmiştir. ddPCR analizlerine göre ise mikrolitre başına 1 kopyaya kadar tespit edebilmekle birlikte sağlıklı bir şekilde ayırım yapabileceğimiz değerin mikrolitre başına 5 kopya olduğu tespit edilmiştir. ddPCR analizlerinde 50 ng DNA'ya karşılık 59840 kopya edilmesine karşın, gzPCR 108025 kopya tespit etmektedir (şekil 5.1)



şekil 5.1: ddPCR ve gzPCR’da elde edilen kopya sayılarının karşılaştırılması

ddPCR’ın Poisson dağılımından kaynaklı düşük dinamik aralığına sahip olmasına rağmen (Zhao ve diğ., 2016) elde ettiğimiz verilere göre ddPCR fitoplazmaların tespitinde ve miktar analizlerinde en az 10 kat daha güvenilir ve hassastır.

Özetle bu tez çalışması sonucu domates bitkisinde *Ca. P. trifolii* varlığı tespit edilerek 16S rDNA bölgesini hedef alan evrensel primerler ile ilk defa ddPCR analizleri gerçekleştirilerek mutlak miktar tayinleri yapılmıştır. Fitoplazmaların tespitinde ddPCR kullanımı üzerine yapılan çalışmalar tür spesifik olup, tek bir türü tespit üzerine dizayn edilmişlerdir (Bahar ve diğ., 2018; Hammond ve diğ., 2021; Mehle ve diğ., 2014; Pérez-López ve diğ., 2017; Yu ve diğ., 2022) . Çalışmamızın bir diğer amacı ise laboratuvarımıza gelen örneklerde ddPCR kullanarak bu organizmaların tamamını tespit edebilecek hassas ve kesin bir yöntem geliştirmektir. Küresel iklim değişikliği yüzünden böceklerin göç hareketi ile birlikte ülkemizde olduğu kadar Dünya çapında da fitoplazmalar agresif bir şekilde yayılmaktadırlar. Bu böcekler ara konakları olan ve rezervuar bitki olarak adlandırılan göz ardı edilen bitkilerden beslenerek fitoplazmaların yayılmalarını hızlandırmaktadırlar ve fitoplazma semptomları ancak hastalığın geç evrelerinde ortaya çıktığından dolayı karşı önlen alınması için çok geç kalınmış anlamına gelmektedir. ddPCR düşük kopya sayılarını tespit etme özelliğinden dolayı fitoplazma ile enfekte olmuş bitkileri daha semptom bile göstermeden tespit ederek hastalığın yayılmasını

önlemede avantaj sağlamaktadır. İleriki çalışmalarda multipleks ddPCR analizleri ile bitki içerisinde düşük titrasyona sahip *Spiroplasma citri* ve *Ca. Liberibacter asiaticus* gibi diğer zorunlu bitki patojenlerinin eş zamanlı tespiti çalışmaları ile fitopatoloji alanında katkılar yapılması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abou-Jawdah, Y., V. Aknadibossian, M. Jawhari, P. Tawidian, and P. Abrahamian. 2019. "Real-Time PCR Protocol for Phytoplasma Detection and Quantification." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 117-130.
- Adan-Kubo, J., Yoshii, S. H., Kono, H., and Miyata, M. 2012. "Molecular Structure of Isolated MvspI, a Variable Surface Protein of the Fish Pathogen *Mycoplasma mobile*." *Journal of Bacteriology* 194, no. 12: 3050-3057.
- Ador, M. A. A., M. S. Haque, S. I. Paul, J. Chakma, R. Ehsan, and A. Rahman. 2021. "Potential Application of PCR Based Molecular Methods in Fish Pathogen Identification: A Review." *Aquaculture Studies* 22(1).
- Akahori, M., A. Miyazaki, H. Koinuma, R. Tokuda, N. Iwabuchi, Y. Kitazawa, and Y. Yamaji. 2024. "Use of the 23S rRNA Gene as a Target Template in the Universal Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Genomic DNA from Phytoplasmas." *Microbiology Spectrum* e00106-24.
- Alemu, K. 2014. "Real-Time PCR and Its Application in Plant Disease Diagnostics." *Advances in Life Sciences and Technology* 27: 39-49.
- Alfaro-Fernández, A., M. A. Ali, F. M. Abdelraheem, E. A. E. Saeed, and M. I. Font San Ambrosio. 2012. "Molecular Identification of 16SrII-D Subgroup Phytoplasmas Associated with Chickpea and Faba Bean in Sudan." *European Journal of Plant Pathology* 133: 791-795.
- Alma, A., Lessio, F., and Nickel, H. 2019. "Insects as Phytoplasma Vectors: Ecological and Epidemiological Aspects." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II: Transmission and Management of Phytoplasma-Associated Diseases*, 1-25.
- Alp, Ş., M. Usta, H. M. Sipahioğlu, and A. Güller. 2016. "First Report of 'Candidatus *Phytoplasma solani*' on a New Host Marigold (*Tagetes erecta* L.)." *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 40, no. 3: 311-318.
- Al-Saleh, M. A., and M. A. Amer. 2014. "Molecular Characterization of the 16SrII Group of Phytoplasma Associated with Faba Bean (*Vicia faba* L.) in Saudi Arabia."
- Apte, A., and Daniel, S. 2009. "PCR Primer Design." *Cold Spring Harbor Protocols* 2009, no. 3: pdb-ip65.
- Arismendi, N., F. Gonzalez, A. Zamorano, N. Andrade, A. M. Pino, and N. Fiore. 2011. "Molecular Identification of Candidatus *Phytoplasma fraxini* in Murta and Peony in Chile." *Bulletin of Insectology* 64, Supplement: S95-S96.

- Arocha, Y., B. Piñol, B. Picornell, R. Almeida, and P. Jones. 2007. "Broad Bean and Sweet Pepper: Two New Hosts Associated with Candidatus Phytoplasma Asteris (16SrI Phytoplasma Group) in Cuba." *Plant Pathology* 56(2): 342-346.
- Bahar, M. H., T. J. Wist, D. R. Bekkaoui, D. D. Hegedus, and C. Y. Olivier. 2018. "Aster Leafhopper Survival and Reproduction, and Aster Yellows Transmission Under Static and Fluctuating Temperatures, Using ddPCR for Phytoplasma Quantification." *Scientific Reports* 8(1): 227.
- Bai, X., Correa, V. R., Toruño, T. Y., Ammar, E. D., Kamoun, S., and Hogenhout, S. A. 2009. "AY-WB Phytoplasma Secretes a Protein That Targets Plant Cell Nuclei." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, no. 1: 18-30.
- Bellardi, M. G., A. Bertaccini, Madhupriya, and G. P. Rao. 2018. "Phytoplasma Diseases in Ornamental Crops." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 191-233.
- Berges, R., Rott, M., and Seemüller, E. 2000. "Range of Phytoplasma Concentrations in Various Plant Hosts as Determined by Competitive Polymerase Chain Reaction." *Phytopathology* 90, no. 10: 1145-1152.
- Bertaccini, A. 2007. "Phytoplasmas: Diversity, Taxonomy, and Epidemiology." *Frontiers in Bioscience-Landmark* 12, no. 2: 673-689.
- Bertaccini, A. 2022. "Plants and Phytoplasmas: When Bacteria Modify Plants." *Plants* 11, no. 11: 1425.
- Bertaccini, A., and B. Duduk. 2009. "Phytoplasma and Phytoplasma Diseases: A Review of Recent Research." *Phytopathologia Mediterranea* 48, no. 3: 355-378.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., and Contaldo, N. 2014. "Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture." *American Journal of Plant Sciences* 2014.
- Bertaccini, A., S. Paltrinieri, and N. Contaldo. 2019. "Standard Detection Protocol: PCR and RFLP Analyses Based on 16S rRNA Gene." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 83-95.
- Bertaccini, A., Y. Arocha-Rosete, N. Contaldo, B. Duduk, N. Fiore, H. G. Montano, ... and A. Zamorano. 2022. "Revision of the 'Candidatus Phytoplasma' Species Description Guidelines." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72(4): 005353.
- Bio-Rad, (Erişim tarihi 01.06.2024) https://www.bio-rad.com/es/life-science-research/overlay/ddpcr-technology-workflow?ID=QX100Workf_1323999411
- Bové, J. M., Foissac, X., and Saillard, C. 1993. "Spiralins." In *Mycoplasma Cell Membranes*, 203-223.

- Boztas, K., K. Derecik, K. Çağlayan, and I. Tulum. 2024. "Molecular Detection and Characterization of 'Candidatus Phytoplasma mali' Associated with Phyllody on *Narcissus tazetta* in Türkiye." *Journal of Crop Health*: 1-9.
- Bu, J., Zhao, J., and Liu, M. 2016. "Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR in Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Under a Variety of Conditions." *PLOS ONE* 11, no. 4: e0154212.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55(4): 611-622.
- CABI, Centre for Agriculture and Bioscience International, (Erişim tarihi 15.04.2024) <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.1079/cabicompendium.26184>
- Canik, D., and F. Ertunc. 2007. "Distribution and Molecular Characterization of Apple Proliferation Phytoplasma in Turkey." *Bulletin of Insectology* 60, no. 2: 335.
- Canik, D., F. Ertunc, S. Paltrinieri, N. Contaldo, and A. Bertaccini. 2011. "Identification of Different Phytoplasmas Infecting Grapevine in Turkey."
- Carvalho, L. M., B. Souza, and A. L. V. de Sousa. 2019. "Ornamental Plants." In *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity*, 355-368.
- Castro, S., and J. Romero. 2004. "First Detection of a Phytoplasma Infecting Faba Bean (*Vicia faba* L.) in Spain." *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(2): 253-256.
- Cho, S. T., H. J. Kung, W. Huang, S. A. Hogenhout, and C. H. Kuo. 2020. "Species Boundaries and Molecular Markers for the Classification of 16SrI Phytoplasmas Inferred by Genome Analysis." *Frontiers in Microbiology* 11: 531209.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., and Schulz, A. 2004. "Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, no. 11: 1175-1184.
- Chuche, J., and Thiéry, D. 2014. "Biology and Ecology of the Flavescence Dorée Vector *Scaphoideus titanus*: A Review." *Agronomy for Sustainable Development* 34: 381-403.
- Citti, C., and Blanchard, A. 2013. "Mycoplasmas and Their Host: Emerging and Re-Emerging Minimal Pathogens." *Trends in Microbiology* 21, no. 4: 196-203.
- Constable, F. E., J. R. Whiting, K. S. Gibb, and R. H. Symons. 2002. "A New Grapevine Yellow's Phytoplasma from the Buckland Valley of Victoria, Australia." *Vitis* 41, no. 3: 147-153.
- Córdova, I., C. Oropeza, C. Puch-Hau, N. Harrison, A. Collí-Rodríguez, M. Narvaez, and L. Sáenz. 2014. "A Real-Time PCR Assay for Detection of Coconut Lethal Yellowing Phytoplasmas of Group 16SrIV Subgroups A, D, and E Found in the Americas." *Journal of Plant Pathology* 96, no. 2.

- Ćurčić, Ž., J. Stepanović, C. Zübert, K. Taški-Ajduković, A. Kosovac, E. Rekanović, and B. Duduk. 2021. "Rubbery Taproot Disease of Sugar Beet in Serbia Associated with *Candidatus Phytoplasma solani*." *Plant Disease* 105, no. 2: 255-263.
- Çağlar, B. K., E. Şimşek, and T. Elbeaino. 2024. "Ligustrum Witches' Broom Phytoplasma Caused Witches' Broom Disease for *Juniperus excelsa* Bieb. in Turkey." *Journal of Plant Diseases and Protection* 131, no. 2: 515-522.
- Çağlar, B. K., S. Satar, A. Bertaccini, and T. Elbeaino. 2019. "Detection and Seed Transmission of Bermudagrass Phytoplasma in Maize in Turkey." *Journal of Phytopathology* 167, no. 4: 248-255.
- Çağlar, B. K., T. Elbeaino, M. Küsek, D. Pehlivan, H. Fidan, and M. Portakaldalı. 2010. "Stolbur Phytoplasma Infections in Potato and Tomato Plants from Different Locations in Turkey." *Journal of Turkish Phytopathology* 39, no. 1-3: 1-8.
- Çağlayan, K. 2023. "Diversity, Distribution, and Status of Phytoplasmas Diseases in Turkey." In *Diversity, Distribution, and Current Status*, 249-267. Academic Press.
- Çağlayan, K., and M. Gazel. 1999. "Primary Studies for Viroid and Phytoplasma Problems of Stone Fruits in East Mediterranean Area of Turkey." In *Proceedings XIVth International Plant Protection Congress (IPPC)*, Jerusalem, p. 16.
- Çağlayan, K., M. Gazel, and M. Acioğlu. 2017. "Molecular Detection and Characterization of Phytoplasmas in Ornamental Pomegranates (*Punica granatum* L.)." In *24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]*, Thessaloniki, Greece, June 5–9, 118.
- Çağlayan, K., M. Gazel, C. Küçüköğül, S. Paltrineri, N. Contaldo, and A. Bertaccini. 2013. "First Report of 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' (Group 16SrI-B) Infecting Sweet Cherries in Turkey." *Journal of Plant Pathology* 95, no. 4, Supplement.
- Çağlayan, K., M. Gazel, M. Acioglu, H. D. Kocabag, and H. M. Sipahioglu. 2019. "Molecular Identification of Phytoplasmas in Ornamental Pomegranates in Turkey." *Phytopathogenic Mollicutes* 9, no. 1: 3-4.
- Çarpar, H., and Sertkaya, G. 2022. "Detection and Characterization of Phytoplasmas in Some Cucurbits (Cucurbitaceae) and Bindweed (Convolvulaceae) in Hatay Province of Turkey." *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 27, no. 1: 166-173.
- Davis, R. E., E. L. Dally, Y. Zhao, I. M. Lee, R. A. S. A. Jomantiene, A. J. Detweiler, and M. L. Putnam. 2010. "First Report of a New Subgroup 16SrIX-E ('Candidatus *Phytoplasma phoenicium*'-Related) Phytoplasma Associated with Juniper Witches' Broom Disease in Oregon, USA." *Plant Disease* 94, no. 9: 1164.
- de C. Bittencourt, D. M., Brown, D. M., Assad-Garcia, N., Lynott, M. R., Sun, L., Palhares de Melo, L. A. M., et al. 2022. "Minimal Cell JCVI-syn3B as a Chassis to Reveal the Mechanisms Behind Mycoplasma Host–Pathogen Interactions." *bioRxiv*, 2022-09.

- de Oliveira, E., D. Valiūnas, J. Jović, I. P. Bedendo, L. Urbanavičienė, and C. M. de Oliveira. 2018. "Occurrence and Epidemiological Aspects of Phytoplasmas in Cereals." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 67-89.
- de Oliveira, E., E. C. Landau, and S. Morais de Sousa. 2015. "Simultaneous Transmission of Phytoplasma and Spiroplasma by Dalbulus Maidis Leafhopper and Symptoms of Infected Maize." *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1s): S99-S100.
- de Ronde, M. W., Ruijter, J. M., Moerland, P. D., Creemers, E. E., and Pinto-Sietsma, S. J. 2018. "Study Design and qPCR Data Analysis Guidelines for Reliable Circulating miRNA Biomarker Experiments: A Review." *Clinical Chemistry* 64, no. 9: 1308-1318.
- Deng, S., and C. Hiruki. 1991. "Amplification of 16S rRNA Genes from Culturable and Nonculturable Mollicutes." *Journal of Microbiological Methods* 14(1): 53-61.
- Dickinson, M., M. Tuffen, and J. Hodgetts. 2013. "The Phytoplasmas: An Introduction." In *Phytoplasma: Methods and Protocols*, 1-14. Edited by E. M. Davis and K. W. Lee. Totowa, NJ: Humana Press.
- Doi, Y. O. J. I., M. Teranaka, K. Yora, and H. Asuyama. 1967. "Mycoplasma-or PLT Group-Like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom." *Japanese Journal of Phytopathology* 33, no. 4: 259-266.
- Du Toit, A. 2014. "Phytoplasma Converts Plants into Zombies." *Nature Reviews Microbiology* 12, no. 6.
- Duduk, B., and A. Bertaccini. 2006. "Corn with Symptoms of Reddening: New Host of Stolbur Phytoplasma." *Plant Disease* 90(10): 1313-1319.
- Duduk, B., Ž. Čurčić, J. Stepanović, J. W. Böhm, A. Kosovac, E. Rekanović, and M. Kube. 2023. "Prevalence of a Candidatus *Phytoplasma solani*-Related Strain Designated as New 16SrXII-P Subgroup over Candidatus *Arsenophonus phytopathogenicus* in Sugar Beet in Eastern Germany." *Plant Disease* 107, no. 12: 3792-3800.
- Duret, S., Berho, N., Danet, J. L., Garnier, M., and Renaudin, J. 2003. "Spiralin Is Not Essential for Helicity, Motility, or Pathogenicity but Is Required for Efficient Transmission of *Spiroplasma citri* by Its Leafhopper Vector *Circulifer haematocaps*." *Applied and Environmental Microbiology* 69, no. 10: 6225-6234.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., and Yang, L. 2014. "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors." *Assay and Drug Development Technologies* 12, no. 4: 207-218.
- Ermacora, P., and Osler, R. 2019. "Symptoms of Phytoplasma Diseases." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 53-67.

- Eroglu, S., H. Ozbek, and F. Sahin. 2010. "First Report of Group 16SrXII Phytoplasma Causing Stolbur Disease in Potato Plants in the Eastern and Southern Anatolia Regions of Turkey." *Plant Disease* 94, no. 11: 1374.
- Ertunc, F., D. C. Orel, S. Bayram, S. Paltrinieri, A. Bertaccini, S. Topkaya, and G. Soylemezoglu. 2015. "Occurrence and Identification of Grapevine Phytoplasmas in Main Viticultural Regions of Turkey." *Phytoparasitica* 43: 303-310.
- Falzone, L., Musso, N., Gattuso, G., Bongiorno, D., Palermo, C. I., Scalia, G., et al. 2020. "Sensitivity Assessment of Droplet Digital PCR for SARS-CoV-2 Detection." *International Journal of Molecular Medicine* 46, no. 3: 957-964.
- Fiore, N., A. Bertaccini, P. A. Bianco, M. Cieřlińska, L. Ferretti, T. X. Hoat, and F. Quaglino. 2018. "Fruit Crop Phytoplasmas." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 153-190.
- Firrao, G., M. Garcia-Chapa, and C. Marzachi. 2007. "Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12: 1353-1375.
- Galetto, L., and C. Marzachi. 2009. "Real-Time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas." In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, edited by P. G. Weintraub and P. Jones, 1-18.
- Galetto, L., Bosco, D., and Marzachi, C. 2005. "Universal and Group-Specific Real-Time PCR Diagnosis of Flavescence Dorée (16Sr-V), Bois Noir (16Sr-XII), and Apple Proliferation (16Sr-X) Phytoplasmas from Field-Collected Plant Hosts and Insect Vectors." *Annals of Applied Biology* 147, no. 2: 191-201.
- Gazel, M., K. Çağlayan, H. Başpınar, J. F. Mejia, S. Paltrinieri, A. Bertaccini, and N. Contaldo. 2016. "Detection and Identification of Phytoplasmas in Pomegranate Trees with Yellows Symptoms." *Journal of Phytopathology* 164, no. 2: 136-140.
- Ghayeb Zamharir, M., and H. Azimi. 2018. "Detection and Characterisation of a Phytoplasma Associated with Cucumber (*Cucumis sativus*) Regional Yellows Disease in Iran." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 51, no. 15-16: 889-893.
- Gibb, K. S., F. E. Constable, J. R. Moran, and A. C. Padovan. 2015. "Phytoplasmas in Australian Grapevines-Detection, Differentiation and Associated Diseases." *VITIS-Journal of Grapevine Research* 38, no. 3: 107.
- Green, E. R., and J. Meccas. 2016. "Bacterial Secretion Systems: An Overview." In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 213-239.
- Green, M. R., and J. Sambrook. 2018. "Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Maxipreps." *Cold Spring Harbor Protocols* 2018, no. 1: pdb-prot093351.
- Griffiths, H. M., W. A. Sinclair, C. D. Smart, and R. E. Davis. 1999. "The Phytoplasma Associated with Ash Yellows and Lilac Witches'-Broom: 'Candidatus Phytoplasma

- fraxini'." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49, no. 4: 1605-1614.
- Grosdidier, M., J. Aguayo, B. Marçais, and R. Ioos. 2017. "Detection of Plant Pathogens Using Real-Time PCR: How Reliable Are Late Ct Values?" Plant Pathology 66(3): 359-367.
- Grosjean, H., Breton, M., Sirand-Pugnet, P., Tardy, F., Thiaucourt, F., Citti, C., et al. 2014. "Predicting the Minimal Translation Apparatus: Lessons from the Reductive Evolution of Mollicutes." PLOS Genetics 10, no. 5: e1004363.
- Gruenewald, J., T. Brendler, and C. Jaenicke. 2007. PDR for Herbal Medicines. Thomson, Reuters.
- Guido, N., E. Starostina, D. Leake, and I. Saaem. 2016. "Improved PCR Amplification of Broad Spectrum GC DNA Templates." PLoS One 11, no. 6: e0156478.
- Gundersen, D. E., I. M. Lee, S. A. Rehner, R. E. Davis, and D. T. Kingsbury. 1994. "Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): A Basis for Their Classification." Journal of Bacteriology 176, no. 17: 5244-5254.
- Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., and Malhotra, B. D. 2019. "Cell-Based Biosensors: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives." Biosensors and Bioelectronics 141: 111435.
- Güldür, M., E. Şimşek, B. E. H. Ç. E. T. Çağlar, M. Dikilitaş, H. Gümüş, and H. Ayvaci. 2018. "First Report of a 'Candidatus Phytoplasma solani'-Related Strain (16SrXII-A Subgroup) Associated with Pistachio Leaf Scorch Disease in Turkey." New Disease Reports 38.
- Güller, A. 2021. "Molecular Analysis and First-Time PCR Isolation of 'Candidatus Phytoplasma Trifolii' from Maize (Zea mays L.) in Turkey." Fresenius Environmental Bulletin 30, no. 10: 11220-11227.
- Güller, A., and Usta, M. 2020. "Stolbur and Clover Proliferation Phytoplasma Infections in Tomato from Bingöl Province, Turkey." Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 7, no. 4: 855-866.
- Hadidi, A., L. Levy, and E. V. Podleckis. 2017. "Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology." In Molecular Methods in Plant Pathology, 167-187. CRC Press.
- Hammer, D. A., and Kamat, N. P. 2012. "Towards an Artificial Cell." FEBS Letters 586, no. 18: 2882-2890.
- Hammond, C., E. Pérez-López, J. Town, C. Vincent, D. Moreau, and T. Dumonceaux. 2021. "Detection of Blueberry Stunt Phytoplasma in Eastern Canada Using cpn60-Based Molecular Diagnostic Assays." Scientific Reports 11(1): 22118.
- Herath, P., G. A. Hoover, E. Angelini, and G. W. Moorman. 2010. "Detection of Elm Yellows Phytoplasma in Elms and Insects Using Real-Time PCR." Plant Disease 94, no. 11: 1355-1360.

- Hodgetts, J. 2019. "Rapid Sample Preparation and LAMP for Phytoplasma Detection." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 187-201.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., and Namba, S. 2008. "Phytoplasmas: Bacteria That Manipulate Plants and Insects." *Molecular Plant Pathology* 9, no. 4: 403-423.
- Hollingsworth, C. R., L. M. Atkinson, D. A. Samac, J. E. Larsen, C. D. Motteberg, M. D. Abrahamson, ... and I. V. MacRae. 2008. "Region and Field Level Distributions of Aster Yellows Phytoplasma in Small Grain Crops." *Plant Disease* 92(4): 623-630.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., et al. 2009. "A Unique Virulence Factor for Proliferation and Dwarfism in Plants Identified from a Phytopathogenic Bacterium." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 15: 6416-6421.
- Hou, Y., Chen, S., Zheng, Y., Zheng, X., and Lin, J. M. 2023. "Droplet-Based Digital PCR (ddPCR) and Its Applications." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 158: 116897.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., and Lin, S. 2010. "Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal PCNA as the Model Gene." *PLOS ONE* 5, no. 3: e9545.
- Houghton, S. G., and F. R. Cockerill. 2006. "Real-Time PCR: Overview and Applications." *Surgery* 139(1): 1-5.
- Hren, M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden, and M. Ravnikar. 2007. "Real-Time PCR Detection Systems for Flavescence Dorée and Bois Noir Phytoplasmas in Grapevine: Comparison with Conventional PCR Detection and Application in Diagnostics." *Plant Pathology* 56, no. 5: 785-796.
- Huang, Y., H. Pan, X. Xu, P. Lv, X. Wang, and Z. Zhao. 2021. "Droplet Digital PCR (ddPCR) for the Detection and Quantification of *Ureaplasma* spp." *BMC Infectious Diseases* 21: 1-9.
- Huang, Y., X. Xu, P. Lv, and Z. Zhao. 2021. "Have the Same Pathogenicity of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in Non-Specific Cervicitis?—Based on Digital Droplet PCR Assay."
- ICSB International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. 1993. "Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa." *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 394–397.
- Ikten, C., M. Catal, E. Yol, R. Ustun, S. Furat, C. Toker, and B. Uzun. 2014. "Molecular Identification, Characterization and Transmission of Phytoplasmas Associated with Sesame Phyllody in Turkey." *European Journal of Plant Pathology* 139: 217-229.
- Ikten, C., Ustun, R., Catal, M., Yol, E., and Uzun, B. 2016. "Multiplex Real-Time qPCR Assay for Simultaneous and Sensitive Detection of Phytoplasmas in Sesame Plants and Insect Vectors." *PLOS ONE* 11, no. 5: e0155891.

- Iriti, M., F. Quaglino, D. A. R. I. O. Maffi, P. Casati, P. A. Bianco, and F. Faoro. 2008. "Solanum Malacoxylon, a New Natural Host of Stolbur Phytoplasma." *Journal of Phytopathology* 156, no. 1: 8-14.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team–Phytoplasma Taxonomy Group. (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1243-1255.
- Ivanov, A. V., I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev. 2021. "The Potential Use of Isothermal Amplification Assays for In-Field Diagnostics of Plant Pathogens." *Plants* 10, no. 11: 2424.
- Jawhari, M., P. Abrahamian, A. A. Sater, H. Sobh, P. Tawidian, and Y. Abou-Jawdah. 2015. "Specific PCR and Real-Time PCR Assays for Detection and Quantitation of 'Candidatus Phytoplasma Phoenicium'." *Molecular and Cellular Probes* 29, no. 1: 63-70.
- Jensen, J. S., Cusini, M., Gomberg, M., Moi, H., Wilson, J., and Unemo, M. 2022. "2021 European Guideline on the Management of Mycoplasma genitalium Infections." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 36, no. 5: 641-650.
- Jomantiene, R., R. E. Davis, A. Alminaite, D. Valiūnas, and R. Jasinskaite. 2002. "First Report of Oat as Host of a Phytoplasma Belonging to Group 16SrI, Subgroup A." *Plant Disease* 86(4): 443-443.
- Jomantiene, R., R. E. Davis, I. M. Lee, Y. Zhao, K. Bottner-Parker, D. Valiunas, and R. Petkauskaite. 2010. "Onion Is Host for Two Phytoplasma Lineages, Subgroups 16SrI-a and 16SrI-(B/L) L, in Lithuania: A HinfI Site Revealed a SNP Marking Divergent Branches of Evolution." *Journal of Plant Pathology* 92: 461-470.
- Karapınar, B., M. Gazel, and K. Çağlayan. 2021. "Detection and Characterization by PCR/RFLP Analyses of Phytoplasmas in Sweet Cherry Orchards in Kahramanmaraş Province and Determination of Possible Vectors." In *VIII Plant Protection Congress*, 254. August 24–28.
- Koinuma, H., Maejima, K., Tokuda, R., Kitazawa, Y., Nijo, T., Wei, W., et al. 2020. "Spatiotemporal Dynamics and Quantitative Analysis of Phytoplasmas in Insect Vectors." *Scientific Reports* 10, no. 1: 4291.
- Kube, M., Siewert, C., Migdoll, A. M., Duduk, B., Holz, S., Rabus, R., et al. 2014. "Analysis of the Complete Genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and Their Comparison to the Obligate Parasites from 'Candidatus Phytoplasma'." *Microbial Physiology* 24, no. 1: 19-36.
- Kumar, S., V. Singh, and S. Lakhanpaul. 2010. "First Report of Candidatus Phytoplasma asteris (16SrI) Associated with Little Leaf of Cotton and Luffa in India." *Australasian Plant Disease Notes* 5, no. 1: 117-119.

- Kumar, S., V. Singh, and S. Lakhanpaul. 2010a. "First Report of 'Candidatus Phytoplasma Asteris' Associated with Green Ear Disease of 'Bajra' (Pearl Millet) in India." *New Disease Reports* 22(1): 27-27.
- Kumari, S., K. Nagendran, A. B. Rai, B. Singh, G. P. Rao, and A. Bertaccini. 2019. "Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops." *Frontiers in Microbiology* 10: 441347.
- Lamilla, J., Galvez, A., and Franco-Lara, L. 2023. "Simultaneous Detection and Quantification by Multiplex qPCR of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and 'Candidatus Phytoplasma fraxini' in a Plant Host and Insect Vectors." *Tropical Plant Pathology* 48, no. 5: 564-574.
- Lanao, A. E., Chakraborty, R. K., and Pearson-Shaver, A. L. 2019. "Mycoplasma Infections."
- Le, D. T., and N. T. Vu. 2017. "Progress of Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique in Molecular Diagnosis of Plant Diseases." *Applied Biological Chemistry* 60, no. 2: 169-180.
- Lee, H. J., K. B. Park, Y. S. Han, and R. D. Jeong. 2021. "Application of Reverse Transcription Droplet Digital PCR for Detection and Quantification of Tomato Spotted Wilt Virus." *Research in Plant Disease* 27(3): 120-127.
- Lee, I. M., A. Bertaccini, M. Vibio, and D. E. Gundersen. 1995. "Detection of Multiple Phytoplasmas in Perennial Fruit Trees with Decline Symptoms in Italy." *Phytopathology* 85(6): 728-735.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, and I. M. Bartoszyk. 1998. "Revised Classification Scheme of Phytoplasmas Based on RFLP Analyses of 16S rRNA and Ribosomal Protein Gene Sequences." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48(4): 1153-1169.
- Lee, I. M., J. Polashock, K. D. Bottner-Parker, P. G. Bagadia, C. Rodriguez-Saona, Y. Zhao, and R. E. Davis. 2014. "New Subgroup 16SrIII-Y Phytoplasmas Associated with False-Blossom Diseased Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Plants and with Known and Potential Insect Vectors in New Jersey." *European Journal of Plant Pathology* 139: 399-406.
- Lee, I. M., R. W. Hammond, R. E. Davis, and D. E. Gundersen. 1993. "Universal Amplification and Analysis of Pathogen 16S rDNA for Classification and Identification of Mycoplasma-like Organisms." *Phytopathology* 83(8): 834-842.
- Leilah, A. A., M. A. Badawi, E. M. Said, M. H. Ghonema, and M. A. E. Abdou. 2005. "Effect of Planting Dates, Plant Population and Nitrogen Fertilization on Sugar Beet Productivity under the Newly Reclaimed Sandy Soils in Egypt."
- Liao, P. Q., Y. K. Chen, H. M. Mejia, Y. Y. Chien, Y. C. Lee, C. M. Tan, et al. 2022. "Detection, Identification, and Molecular Characterization of a 16SrII-V Subgroup Phytoplasma Associated with *Nicotiana plumbaginifolia*." *Plant Disease* 106, no. 3: 805-809.

- Lim, P. O., and B. B. Sears. 1989. "16S rRNA Sequence Indicates That Plant-Pathogenic Mycoplasma-like Organisms Are Evolutionarily Distinct from Animal Mycoplasmas." *Journal of Bacteriology* 171(11): 5901-5906.
- Loftis, A. D., and W. K. Reeves. 2012. "Principles of Real-Time PCR." In *Veterinary PCR Diagnostics*, 3.
- Lu, A., H. Liu, R. Shi, Y. Cai, J. Ma, L. Shao, et al. 2020. "Application of Droplet Digital PCR for the Detection of Vector Copy Number in Clinical CAR/TCR T Cell Products." *Journal of Translational Medicine* 18: 1-7.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., et al. 2011. "Phytoplasma Effector SAP54 Induces Indeterminate Leaf-Like Flower Development in Arabidopsis Plants." *Plant Physiology* 157, no. 2: 831-841.
- Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., et al. 2014. "Recognition of Floral Homeotic MADS Domain Transcription Factors by a Phytoplasmal Effector, Phylogen, Induces Phyllody." *The Plant Journal* 78, no. 4: 541-554.
- Maejima, K., K. Oshima, and S. Namba. 2014. "Exploring the Phytoplasmas, Plant Pathogenic Bacteria." *Journal of General Plant Pathology* 80: 210-221.
- Maheshwari, Y., V. Selvaraj, K. Godfrey, S. Hajeri, and R. Yokomi. 2021. "Multiplex Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and *Spiroplasma citri* by qPCR and Droplet Digital PCR." *PLoS One* 16(3): e0242392.
- Maheshwari, Y., V. Selvaraj, S. Hajeri, and R. Yokomi. 2017. "Application of Droplet Digital PCR for Quantitative Detection of *Spiroplasma citri* in Comparison with Real Time PCR." *PLoS One* 12(9): e0184751.
- Majumdar, N., S. Banerjee, M. Pallas, T. Wessel, and P. Hegerich. 2017. "Poisson Plus Quantification for Digital PCR Systems." *Scientific Reports* 7(1): 1-10.
- Manimekalai, R., S. Nair, V. P. Soumya, O. M. Roshna, and G. V. Thomas. 2011. "Real-Time PCR Technique-Based Detection of Coconut Root (Wilt) Phytoplasma." *Current Science* 1209-1213.
- Manoj, P. 2016. "Droplet Digital PCR Technology Promises New Applications and Research Areas." *Mitochondrial DNA Part A* 27(1): 742-746.
- Mao, X., C. Liu, H. Tong, Y. Chen, and K. Liu. 2019. "Principles of Digital PCR and Its Applications in Current Obstetrical and Gynecological Diseases." *American Journal of Translational Research* 11(12): 7209-7220.
- Marcone, C., and G. P. Rao. 2016. "Elm and Alder Yellows: Etiology, Symptomatology, and Epidemiology." *Phytopathogenic Mollicutes* 6, no. 2: 63-70.
- Marcone, C., L. Franco-Lara, and I. Toševski. 2018. "Major Phytoplasma Diseases of Forest and Urban Trees." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and*

- Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases, 287-312. Edited by A. Bertaccini, M. G. Bellardi, and C. Marcone. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Marcone, C., M. G. Bellardi, and A. Bertaccini. 2016. "Phytoplasma Diseases of Medicinal and Aromatic Plants." *Journal of Plant Pathology* 98: 379-404.
- Martini, M., D. DeliĆ, L. Liefing, and H. Montano. 2018. "Phytoplasmas Infecting Vegetable, Pulse and Oil Crops." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 31-65.
- Martini, M., I. M. Lee, K. D. Bottner, Y. Zhao, S. Botti, A. Bertaccini, and R. Osler. 2007. "Ribosomal Protein Gene-Based Phylogeny for Finer Differentiation and Classification of Phytoplasmas." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, no. 9: 2037-2051.
- Martini, M., K. D. Bottner-Parker, and I. M. Lee. 2019. "PCR-Based Sequence Analysis on Multiple Genes Other Than 16S rRNA Gene for Differentiation of Phytoplasmas." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 97-115.
- Martini, M., Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., and Pastore, M. 2007. "A Real-Time PCR Method for Detection and Quantification of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' in Its Natural Hosts." *Bulletin of Insectology* 60, no. 2: 251.
- Marzachi, C., A. Coulibaly, N. Coulibaly, A. Sangare, M. Diarra, T. De Gregorio, and D. Bosco. 2009. "Cotton Virescence Phytoplasma and Its Weed Reservoir in Mali." *Journal of Plant Pathology* 91: 717-721.
- Marzachi, C., and Bosco, D. 2005. "Relative Quantification of Chrysanthemum Yellows (16Sr I) Phytoplasma in Its Plant and Insect Host Using Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Molecular Biotechnology* 30: 117-127.
- Marzachi, C., R. G. Milne, and D. Bosco. 2004. "Phytoplasma-Plant-Vector Relationships." In *Recent Research Developments in Plant Pathology*, vol. 3, 211-241.
- Maurin, M. 2012. "Real-Time PCR as a Diagnostic Tool for Bacterial Diseases." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 12(7): 731-754.
- Mazraie, M. A., K. Izadpanah, H. Hamzehzarghani, M. Salehi, and M. M. Faghihi. 2019. "Spread and Colonization Pattern of 'Candidatus Phytoplasma Aurantifolia' in Lime Plants [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] as Revealed by Real-Time PCR Assay." *Journal of Plant Pathology* 101: 629-637.
- Mehle, N., P. Nikolić, K. Gruden, M. Ravnika, and M. Dermastia. 2013. "Real-Time PCR for Specific Detection of Three Phytoplasmas from the Apple Proliferation Group." In *Phytoplasmas: Methods and Protocols*, 269-281.
- Mehle, N., T. Dreö, and M. Ravnika. 2014. "Quantitative Analysis of 'Flavescence Dorée' Phytoplasma with Droplet Digital PCR." *Phytopathogenic Mollicutes* 4(1): 9-15.

- Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., et al. 2014. "The Phytoplasmal Virulence Factor TENGU Causes Plant Sterility by Downregulating the Jasmonic Acid and Auxin Pathways." *Scientific Reports* 4, no. 1: 7399.
- Minguzzi, S., Terlizzi, F., Lanzoni, C., Poggi Pollini, C., and Ratti, C. 2016. "A Rapid Protocol of Crude RNA/DNA Extraction for RT-qPCR Detection and Quantification of 'Candidatus Phytoplasma prunorum'." *PLOS ONE* 11, no. 1: e0146515.
- Mitrović, J., S. Paltrinieri, N. Contaldo, A. Bertaccini, and B. Duduk. 2011. "Occurrence of Two 'Candidatus Phytoplasma asteris'-Related Phytoplasmas in Poplar Trees in Serbia." *Bulletin of Insectology* 64, Supplement: S57-S58.
- Mohammed, S., G. Birhan, B. Admassu, A. Shite, and H. Yeneneh. 2015. "Review on Polymerase Chain Reaction and Its Diagnostic Merit Over Conventional Techniques in Animal Disease." *African Journal of Basic & Applied Sciences* 7(5): 262-281.
- Monti, M., M. Martini, and R. Tedeschi. 2013. "EvaGreen Real-Time PCR Protocol for Specific 'Candidatus Phytoplasma Mali' Detection and Quantification in Insects." *Molecular and Cellular Probes* 27, no. 3-4: 129-136.
- Morcia, C., R. Ghizzoni, C. Delogu, L. Andreani, P. Carnevali, and V. Terzi. 2020. "Digital PCR: What Relevance to Plant Studies?" *Biology* 9(12): 433.
- Moussa, A., A. Passera, F. Sanna, M. Faccincani, P. Casati, P. A. Bianco, and F. Quaglino. 2020. "Bacterial Microbiota Associated with Insect Vectors of Grapevine Bois Noir Disease in Relation to Phytoplasma Infection." *FEMS Microbiology Ecology* 96, no. 11: fiae203.
- Murray, R. G. E., and Schleifer, K. H. 1994. "Taxonomic Notes: A Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Prokaryotes." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, no. 1: 174-176.
- Musetti, R. 2010. "Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas." In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, 132-146.
- Nair, S., and R. Manimekalai. 2021. "Phytoplasma Diseases of Plants: Molecular Diagnostics and Way Forward." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(6): 102.
- Namba, S. 2019. "Molecular and Biological Properties of Phytoplasmas." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 95(7): 401-418.
- NEB, New England Biolabs (Erişim tarihi 31.05.2024)
<https://www.neb.com/en/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp>
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. "Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA." *Nucleic Acids Research* 28, no. 12: e63-e63.

- Notomi, T., Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda. 2015. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Principle, Features, and Future Prospects." *Journal of Microbiology* 53, no. 1: 1-5.
- Oksal, H. D., Apak, F. K., Oksal, E., Tursun, N., and Sipahioglu, H. M. 2017. "Detection and Molecular Characterization of Two 'Candidatus Phytoplasma trifolii' Isolates Infecting Peppers at the Same Ecological Niche."
- Orioles, M., M. Bulfoni, E. Saccà, D. Cesselli, J. G. Schmidt, and M. Galeotti. 2022. "Development and Application of a Sensitive Droplet Digital PCR for the Detection of Red Mark Syndrome Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).*" Aquaculture* 551: 737910.
- Öner, N., S. Erşahin, S. Ayan, and H. B. Özel. 2016. "İç Anadolu'da Yarıkurak Alanların Rehabilitasyonu." *Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi* 2, no. 1-2: 32-44.
- Padovan, A. C., K. S. Gibb, A. Bertaccini, M. Vibio, R. E. Bonfiglioli, P. A. Magarey, and B. B. Sears. 1995. "Molecular Detection of the Australian Grapevine Yellows Phytoplasma and Comparison with Grapevine Yellows Phytoplasmas from Italy." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, no. 1: 25-31.
- Pandian, V., R. Velazhahan, S. Suresh, S. Robin, R. Rabindran, and G. P. Rao. 2015. "Subgroup Level Identification of Rice Orange Leaf Phytoplasma and Its Natural Transmission through Zigzag Leafhopper (*Recilia Dorsalis*) in India." *Phytopathogenic Mollicutes* 5(2): 107-112.
- Panno, S., S. Matić, A. Tiberini, A. G. Caruso, P. Bella, L. Torta, and S. Davino. 2020. "Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology." *Plants* 9, no. 4: 461.
- Parida, M., S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita. 2008. "Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A New Generation of Innovative Gene Amplification Technique; Perspectives in Clinical Diagnosis of Infectious Diseases." *Reviews in Medical Virology* 18, no. 6: 407-421.
- Peh, C. R., J. Danielewski, T. P. Chua, K. Bodiyaadu, D. A. Machalek, S. M. Garland, et al. 2023. "Quantitation of *Mycoplasma genitalium* Using Droplet Digital PCR." *Letters in Applied Microbiology* 76(6): ovad064.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X., and Malembic-Maher, S. 2009. "Triplex Real-Time PCR Assay for Sensitive and Simultaneous Detection of Grapevine Phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A Groups with an Endogenous Analytical Control." *Vitis* 48, no. 2: 87-95.
- Perez, J. C. 2019. "Epigenetics Theoretical Limits of Synthetic Genomes: The Cases of Artificial *Caulobacter* (C. eth-2.0), *Mycoplasma Mycoides* (JCVI-Syn 1.0, JCVI-Syn 3.0 and JCVI_3A), *E-coli* and *YEAST* chr XII."
- Pérez-López, E., and T. J. Dumonceaux. 2016. "Detection and Identification of the Heterogeneous Novel Subgroup 16SrXIII-(A/I) I Phytoplasma Associated with

- Strawberry Green Petal Disease and Mexican Periwinkle Virescence." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, no. 11: 4406-4415.
- Pérez-López, E., C. Y. Olivier, M. Luna-Rodríguez, Y. Rodríguez, L. G. Iglesias, A. Castro-Luna, ... and T. J. Dumonceaux. 2016. "Maize Bushy Stunt Phytoplasma Affects Native Corn at High Elevations in Southeast Mexico." *European Journal of Plant Pathology* 145: 963-971.
- Pérez-López, E., D. Rodríguez-Martínez, C. Y. Olivier, M. Luna-Rodríguez, and T. J. Dumonceaux. 2017. "Molecular Diagnostic Assays Based on cpn60 UT Sequences Reveal the Geographic Distribution of Subgroup 16SrXIII-(A/I) I Phytoplasma in Mexico." *Scientific Reports* 7(1): 950.
- Pfaffl, M. W. 2004. "Quantification Strategies in Real-Time PCR." In *AZ of Quantitative PCR*, 89-113.
- Pinheiro, L. B., V. A. Coleman, C. M. Hindson, J. Herrmann, B. J. Hindson, S. Bhat, and K. R. Emslie. 2012. "Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification." *Analytical Chemistry* 84(2): 1003-1011.
- Purcell, M. K., R. G. Getchell, C. A. McClure, and K. A. Garver. 2011. "Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of Aquatic Animal Pathogens in a Diagnostic Laboratory Setting." *Journal of Aquatic Animal Health* 23(3): 148-161.
- Qu, X. S., L. A. Wanner, and B. J. Christ. 2011. "Multiplex Real-Time PCR (TaqMan) Assay for the Simultaneous Detection and Discrimination of Potato Powdery and Common Scab Diseases and Pathogens." *Journal of Applied Microbiology* 110(3): 769-777.
- Quoc, N. B., N. T. T. Xuan, N. M. Nghiep, N. D. N. Phuong, T. B. Linh, N. N. B. Chau, and M. Dickinson. 2021. "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Detection of Sesame Phyllody Phytoplasmas in Vietnam." *Folia Microbiologica* 66: 273-283.
- Rao, G. P., and M. Kumar. 2017. "World Status of Phytoplasma Diseases Associated with Eggplant." *Crop Protection* 96: 22-29.
- Rao, G. P., C. Marcone, M. G. Bellardi, and Madhupriya. 2018. "Phytoplasma Diseases of Medicinal Crops." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 235-266. Edited by A. Bertaccini, M. G. Bellardi, and C. Marcone. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Rao, G. P., E. Alvarez, and A. Yadav. 2018. "Phytoplasma Diseases of Industrial Crops." In *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases*, 91-121.
- Rao, G. P., S. Mall, and C. Marcone. 2012. "Recent Biotechnological Approaches in Diagnosis and Management of Sugarcane Phytoplasma Diseases." *Functional Plant Science and Biotechnology* 6, no. 2: 19-29.

- Rao, G. P., T. L. Prakasha, M. Priya, V. Thorat, M. Kumar, V. K. Baranwal, and A. Yadav. 2017. "First Report of Association of Candidatus Phytoplasma cynodontis (16SrXI-B Group) with Streak, Yellowing, and Stunting Disease in Durum and Bread Wheat Genotypes from Central India." *Plant Disease* 101, no. 7: 1314.
- Rid, M., C. Mesca, M. Ayasse, and J. Gross. 2016. "Apple Proliferation Phytoplasma Influences the Pattern of Plant Volatiles Emitted Depending on Pathogen Virulence." *Frontiers in Ecology and Evolution* 3: 152.
- Rizzoli, A., L. Jelmini, G. B. Pezzatti, M. Jermini, O. Schumpp, C. Debonneville, and M. Conedera. 2022. "Impact of the 'Flavescence dorée' Phytoplasma on Xylem Growth and Anatomical Characteristics in Trunks of 'Chardonnay' Grapevines (*Vitis vinifera*)." *Biology* 11, no. 7: 978.
- Ruijter, J. M., Barnewall, R. J., Marsh, I. B., Szentirmay, A. N., Quinn, J. C., van Houdt, R., et al. 2021. "Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting." *Clinical Chemistry* 67, no. 6: 829-842.
- Ruiz-Villalba, A., Jan M. R., ve Mark J. B. van den Hoff. 2021. "Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting." *Life* 11, no. 6: 496.
- Salehi, M., and K. Izadpanah. 2005. "Partial Characterization of a Phytoplasma Associated with Witches' Broom Disease of Sugar Beet in Iran." *Iranian Journal of Plant Pathology* 41, no. 1.
- Salehi, M., R. Rasoulpour, and K. Izadpanah. 2016. "Molecular Characterization, Vector Identification and Partial Host Range Determination of Phytoplasmas Associated with Faba Bean Phyllody in Iran." *Crop Protection* 89: 12-20.
- Santa Olga Cacciola, A. B., Pane, A., and Furneri, P. M. 2017. "Spiroplasma spp.: A Plant, Arthropod, Animal and Human Pathogen." *Citrus Pathology* 31.
- Saraya, T., Kurai, D., Nakagaki, K., Sasaki, Y., Niwa, S., Tsukagoshi, H., et al. 2014. "Novel Aspects on the Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae Pneumonia and Therapeutic Implications." *Frontiers in Microbiology* 5: 103316.
- Sasaki, Y. 2006. "Mycoplasma." In *Bacterial Genomes and Infectious Diseases*, 175-190.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., et al. 2002. "The Complete Genomic Sequence of Mycoplasma penetrans, an Intracellular Bacterial Pathogen in Humans." *Nucleic Acids Research* 30, no. 23: 5293-5300.
- Sato, W., Zajkowski, T., Moser, F., and Adamala, K. P. 2022. "Synthetic Cells in Biomedical Applications." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 14, no. 2: e1761.
- Schaad, N. W., and R. D. Frederick. 2002. "Real-Time PCR and Its Application for Rapid Plant Disease Diagnostics." *Canadian Journal of Plant Pathology* 24(3): 250-258.

- Schneider, B., E. Seemueller, C. D. Smart, and B. C. Kirkpatrick. 1995. "Phylogenetic Classification of Plant Pathogenic Mycoplasma-Like Organisms or Phytoplasmas." In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, 369-380.
- Schneider, B., E. Torres, M. P. Martín, M. Schröder, H. D. Behnke, and E. Seemüller. 2005. "'Candidatus Phytoplasma pini', a Novel Taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, no. 1: 303-307.
- Serçe, Ç. U., and S. Yılmaz. 2020. "First Report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' (16SrVI Group) Infecting Cabbage (*Brassica oleracea*) in Turkey." *Journal of Plant Pathology* 102, no. 2: 553-553.
- Serçe, Ç. U., M. Gazel, K. Çağlayan, M. Baş, and L. Son. 2006. "Phytoplasma Diseases of Fruit Trees in Germplasm and Commercial Orchards in Turkey." *Journal of Plant Pathology* 88: 179-185.
- Sertkaya, G., M. Martini, R. Musetti, and R. Osler. 2007. "Detection and Molecular Characterization of Phytoplasmas Infecting Sesame and Solanaceous Crops in Turkey." *Bulletin of Insectology* 60, no. 2: 141.
- Sertkaya, G., R. Osler, R. Musetti, P. Ermacora, and M. Martini. 2003. "Detection of Phytoplasmas in *Rubus* spp. by Microscopy and Molecular Techniques in Turkey." In *X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases* 656: 181-186.
- Sinclair, W. A. 2000. "Elm Yellows in North America." In *The Elms: Breeding, Conservation, and Disease Management*, 121-136. Edited by D. M. Hillier. Boston, MA: Springer US.
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., and Nikolausz, M. 2007. "Effect of Primer Mismatch, Annealing Temperature and PCR Cycle Number on 16S rRNA Gene-Targeting Bacterial Community Analysis." *FEMS Microbiology Ecology* 60, no. 2: 341-350.
- Starović, M., S. Kojic, S. T. Kuzmanovic, S. D. Stojanovic, S. Pavlovic, and D. Josic. 2013. "First Report of Blueberry Reddening Disease in Serbia Associated with 16SrXII-A (Stolbur) Phytoplasma." *Plant Disease* 97, no. 12: 1653.
- Sugio, A., and Hogenhout, S. A. 2012. "The Genome Biology of Phytoplasma: Modulators of Plants and Insects." *Current Opinion in Microbiology* 15, no. 3: 247-254.
- Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., and Hogenhout, S. A. 2011. "Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects." *Annual Review of Phytopathology* 49: 175-195.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., and Kubista, M. 2015. "How Good Is a PCR Efficiency Estimate: Recommendations for Precise and Robust qPCR Efficiency Assessments." *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
- Sze, M. A., and P. D. Schloss. 2019. "The Impact of DNA Polymerase and Number of Rounds of Amplification in PCR on 16S rRNA Gene Sequence Data." *MSphere* 4, no. 3: 10-1128.

- Tago, Y. I., Imai, M., Ihara, M., Atofujii, H., Nagata, Y., and Yamamoto, K. 2005. "Escherichia coli Mutator Δ polA Is Defective in Base Mismatch Correction: The Nature of In Vivo DNA Replication Errors." *Journal of Molecular Biology* 351, no. 2: 299-308.
- Thilagavathi, R., R. Ramjegathesh, L. Rajendran, S. Sivakumar, G. Karthikeyan, S. Nakkeeran, and R. Samiyappan. 2011. "First Report of Little Leaf Disease Associated with Phytoplasma on Sugar Beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* var. *altissima* Doll) in India." *Journal of General Plant Pathology* 77: 139-141.
- Tomlinson, J. 2013. "In-Field Diagnostics Using Loop-Mediated Isothermal Amplification." In *Phytoplasma: Methods and Protocols*, 291-300.
- Toohy-Kurth, K., M. M. Reising, R. L. Tallmadge, L. B. Goodman, J. Bai, S. R. Bolin, and B. M. Crossley. 2020. "Suggested Guidelines for Validation of Real-Time PCR Assays in Veterinary Diagnostic Laboratories." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 32(6): 802-814.
- Trivellone, V., and Dietrich, C. H. 2021. "Evolutionary Diversification in Insect Vector–Phytoplasma–Plant Associations." *Annals of the Entomological Society of America* 114, no. 2: 137-150.
- Tsokana, C. N., I. Symeonidou, G. Sioutas, A. I. Gelasakis, and E. Papadopoulos. 2023. "Current Applications of Digital PCR in Veterinary Parasitology: An Overview." *Parasitologia* 3(3): 269-283.
- Tully, J. G., R. F. Whitcomb, D. L. Rose, J. M. Bove, P. Carle, N. L. Somerson, et al. 1994. "Acholeplasma Brassicae sp. nov. and Acholeplasma Palmae sp. nov., Two Non-Sterol-Requiring Mollicutes from Plant Surfaces." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, no. 4: 680-684.
- TÜRKİYE SÜS BİTKİLERİ VE MAMULLERİ SEKTÖR RAPORU 2023 (Erişim tarihi 31.05.2024) <http://www.susbitkileri.org.tr/images/d/library/98e54002-0285-47c4-ad9f-09d2fddb7f65.pdf>
- Urbanaviciene, L., R. Jomantiene, and R. E. Davis. 2005. "First Report of Barley as Host of a Phytoplasma Belonging to Group 16SrI, Subgroup B, and Ribosomal Protein Subgroup rpI-B in Lithuania." *Plant Disease* 89(3): 339.
- Urbanavičienė, L., R. Jomantiene, D. Valiūnas, and R. E. Davis. 2007. "Molecular Identification of 16SrI-A, 16SrI-B, 16SrI-C, and 16SrI-L Subgroups of Phytoplasmas in Gramineous Plants in Lithuania." *Bulletin of Insectology* 60: 127–128.
- Usta, M., A. Güller, and H. M. Sipahioğlu. 2017. "Detection and Characterization of Two Phytoplasma Lineages on Cucumber (*Cucumis sativus* L.) with Same Symptomatology Based on Virtual RFLP and Nucleotide Sequence Analysis of 16S rDNA." *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences* 27, no. 3: 299-308.
- Usta, M., A. Güller, and H. M. Sipahioğlu. 2018. "Molecular Analysis of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' and 'Candidatus Phytoplasma solani' Associated with Phytoplasma Diseases of Tomato (PDT) in Turkey."

- Usta, M., and Güller, A. 2020. "Detection and Molecular Characterization of 'Candidatus Phytoplasma Trifolii', a Member of the Clover Proliferation Group, Infecting Tomato Plants from Iğdır Province in Turkey." *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 8, no. 12: 2533-2540.
- Usta, M., Güller, A., and Sipahioğlu, H. M. 2021. "First Report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' Associated with Leaf Reddening and Upright Growth in Pears (*Pyrus communis* L.)." *Plant Protection Science*.
- Valasevich, N., and B. Schneider. 2017. "Rapid Detection of 'Candidatus Phytoplasma Mali' by Recombinase Polymerase Amplification Assays." *Journal of Phytopathology* 165, no. 11-12: 762-770.
- Valones, M. A. A., R. L. Guimarães, L. A. C. Brandão, P. R. E. D. Souza, A. D. A. T. Carvalho, and S. Crovela. 2009. "Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields: A Review." *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 1-11.
- Venbrux, M., S. Crauwels, and H. Rediers. 2023. "Current and Emerging Trends in Techniques for Plant Pathogen Detection." *Frontiers in Plant Science* 14: 1120968.
- Waites, K. B., and Xiao, L. 2015. "Mycoplasmas and Ureaplasmas of Humans." In Elsevier eBooks, 1587–1609. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00089-5>.
- Webster, R. K., and P. S. Gunnell, eds. 1992. *Compendium of Rice Diseases*. pp. viii+-62.
- Wei, W., and Y. Zhao. 2022. "Phytoplasma Taxonomy: Nomenclature, Classification, and Identification." *Biology* 11(8): 1119.
- Wei, W., Inaba, J., Zhao, Y., Mowery, J. D., and Hammond, R. 2022. "Phytoplasma Infection Blocks Starch Breakdown and Triggers Chloroplast Degradation, Leading to Premature Leaf Senescence, Sucrose Reallocation, and Spatiotemporal Redistribution of Phytohormones." *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 3: 1810.
- Weintraub, P. G., and Beanland, L. 2006. "Insect Vectors of Phytoplasmas." *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.
- Wong, Y. K., H. F. Tsang, V. W. Xue, C. M. Chan, T. C. Au, W. C. Cho, et al. 2017. "Applications of Digital PCR in Precision Medicine." *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* 2(3): 177-186.
- Wu, Y., X. Hao, Z. Li, P. Gu, F. An, J. Xiang, and Y. Xiang. 2010. "Identification of the Phytoplasma Associated with Wheat Blue Dwarf Disease in China." *Plant Disease* 94, no. 8: 977-985.
- Yasuhara-Bell, J., S. Costanzo, and V. Mavrodieva. 2023. "Validation of a Modified Quantitative PCR and Synthetic DNA gBlocks Control for Detection of 'Candidatus Phytoplasma mali'." *Phytopathogenic Mollicutes* 13, no. 1: 143-144.
- Yilmaz, S., Caglar, B. K., and Djelouah, K. 2019. "Molecular Characterization of Phytoplasma Diseases of Pepper in Turkey." *Journal of Phytopathology* 167, no. 9: 479-483.

- Yu, S. S., X. C. Zhang, W. W. Song, and W. Q. Qin. 2022. "Accurate and Sensitive Detection of Areca Palm Yellow Leaf Phytoplasma in China by Droplet Digital PCR Targeting *tuf* Gene Sequence." *Annals of Applied Biology* 181(2): 152-159.
- Yvon, M., G. Thébaud, R. Alary, and G. Labonne. 2009. "Specific Detection and Quantification of the Phytopathogenic Agent 'Candidatus Phytoplasma Prunorum'." *Molecular and Cellular Probes* 23, no. 5: 227-234.
- Zamharir, M. G. 2011. "Phytoplasmas Associated with Almond Witches' Broom Disease: An Overview." *African Journal of Microbiology Research* 5, no. 33: 6013-6017.
- Zhao, H., C. Yan, Y. Feng, B. Du, J. Feng, X. Cui, et al. 2023. "Absolute Quantification of *Mycoplasma pneumoniae* in Infected Patients by Droplet Digital PCR to Track Disease Severity and Treatment Efficacy." *Frontiers in Microbiology* 14: 1177273.
- Zhao, Y., W. Wei, I. M. Lee, J. Shao, X. Suo, and R. E. Davis. 2013. "The i PhyClassifier, an Interactive Online Tool for Phytoplasma Classification and Taxonomic Assignment." In *Phytoplasma: Methods and Protocols*, 329-338.
- Zhao, Y., W. Wei, I. M. Lee, J. Shao, X. Suo, and R. E. Davis. 2009. "Construction of an Interactive Online Phytoplasma Classification Tool, i PhyClassifier, and Its Application in Analysis of the Peach X-Disease Phytoplasma Group (16SrIII)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(10): 2582-2593.
- Zhao, Y., Xia, Q., Yin, Y., and Wang, Z. 2016. "Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*." *PLOS ONE* 11, no. 7: e0159004.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yiğit Sabri ÜNLÜ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Botanik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı

Makale ve Bildiriler	
Ünlü, Y., Morgil Gerçek, H., Gerçek, Y., & Kösesakal, T. 2024, Algal Lipid Metabolism: Recent Advances in Growth and Adaptation. Advances in Biology vol.6 pp.103-132.	
Sarayloo, E., S. Simsek, Y. S. Unlu, G. Cevahir, C. Erkey, and I. H. Kavakli. 2018. "Enhancement of the Lipid Productivity and Fatty Acid Methyl Ester Profile of Chlorella vulgaris by Two Rounds of Mutagenesis." Bioresource Technology 250: 764-769.	
Sarayloo, E., Tardu, M., Unlu, Y. S., Simsek, S., Cevahir, G., Erkey, C., and Kavakli, I. H. 2017. "Understanding Lipid Metabolism in High-Lipid-Producing Chlorella vulgaris Mutants at the Genome-Wide Level." Algal Research 28: 244-252.	
Tuğcu, T. F., Topçul, M. R., Çetin, R., Gerçek, Y. C., Morgil H., Ünlü, Y. S., Çalışkan, M., Öz, G. C. 2016. "Investigation of Cytotoxic Effects of Some Novel	

Synthesized Iminothiazolidinone Derivatives on HeLa Cell Line (CCL2)." European Journal of Biology 75, no. 1: 39-49

Unlu Y.S., Boztas, K., Oz, G.C.,Tulum, I., 2022. Spreading status of ‘Candidatus Phytoplasma’ in tomato and grapevine plants in Western Marmara region of Turkey, 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022). p:65, November 23-25.

Unlu Y.S., Boztas, K., Tulum, I., 2023. Molecular detection of phytoplasma associated disease in Türkiye, 2nd International Molecular Plant Protection Congress-IMPPC2023. p:105, May 15-18, Bursa- Türkiye.

Unlu Y.S., Boztas, K., Oz, G.C.,Tulum, I., 2022. Survey of the detection and characterization of ‘Candidatus Phytoplasma in Western Marmara region of Turkey, 8th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyoKon’22), p:112, June 9- 12, İstanbul.

Unlu Y.S., Tulum, I., 2023. Development of Droplet Digital PCR (ddPCR) Technique for Quantitative Detection of Phytoplasmas, 24th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (Associated with the Japanese Society of Mycoplasmaology) p:38 July 16th–20th, 2023, Osaka, Japan