

T.C.
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DIYARBAKIR İLİ DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAKİ FİTOPLAZMA
HASTALIKLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

SONGÜL ARAZ YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2020

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum ‘Diyarbakır İli Domates Üretim Alanlarındaki Fitoplazma Hastalıklarının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksınız tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım tüm kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde belirttiğimi onurumla doğrularım.

Songül ARAZ YILMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİYARBAKIR İLİ DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAKİ FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Songül ARAZ YILMAZ

Malatya Turgut Özal Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

38 + ix Sayfa

2020

Danışman: Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU

Diyarbakır ili domates üretim alanlarındaki fitoplazma hastalıklarının belirlenmesi amacıyla 2018 yılında survey çalışmaları yürütülmüş ve fitoplazma belirtisi gösteren ve göstermeyen toplam 278 adet yaprak örneği rastgele toplanmıştır. Toplanan örneklerde fitoplazma varlığı, R16mF2/R16mR1 ve R16F2n/R16R2 universal primerlerin kullanıldığı Nested qPCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Nested qPCR yöntemi ile testlenen örneklerin 7 (%2.5)'sinin fitoplazma etmeni ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Fitoplazma örneklerine ait 1.250 bp'lik amplifikasyon ürünü 16S rDNA dizilerinin BLAST ve sanal RFLP analizleri sonucunda 7 domates örneğinin 1'i '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16Sr group XII, subgroup A) ile 6'sının ise '*Candidatus Phytoplasma trifolii*' (16Sr group VI, subgroup A) ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Fitoplazma izolatlarının 16Sr DNA dizilerine yapılan çoklu dizi karşılaştırmasında Diyarbakır izolatlarının dünyadaki diğer fitoplazma izolatları ile %99-100 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yürütülen bu çalışma ile '*Ca. P. solani*' ile '*Ca. P. trifolii*' Diyarbakır ili domates üretim alanlarında ilk defa rapor edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Diyarbakır, Domates, Fitoplazma, Nested qPCR, Moleküler Karakterizasyon

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF PHYTOPLASMA DISEASES IN DIYARBAKIR TOMATO PRODUCTION AREAS BY MOLECULAR METHODS

Songül ARAZ YILMAZ

Malatya Turgut Özal University

Institute of Graduate Studies

Department of Plant Protection

38 + ix pages

2020

Supervisor: Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOĞLU

Survey studies were carried out in 2018 in order to determine phytoplasma diseases in tomato production areas of Diyarbakır, and a total of 278 leaf samples with and without phytoplasma symptoms were collected randomly. The presence of phytoplasma in the collected samples was investigated using the Nested qPCR method using universal primers R16mF2 / R16mR1 and R16F2n / R16R2. It was determined that 7 (2.5%) of the samples tested with Nested qPCR method were infected by phytoplasma agent. As a result of BLAST and virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences of 1,250 bp amplification product of phytoplasma samples, one of the seven tomato samples was identified as "*Candidatus Phytoplasma solani*" (16Sr group XII, subgroup A) and remaining 6 were "*Candidatus Phytoplasma trifolii*" (16Sr group VI, subgroup A). In multiple sequence comparison of phytoplasmal 16S rDNA sequences, it was found that Diyarbakır isolates were shared 99-100% similarity with other phytoplasma isolates in the world. With this work carried out '*Ca. P. solani*' and '*Ca. P. trifolii*' was reported for the first time in the tomato production areas of Diyarbakır.

KEYWORDS: Diyarbakır, Tomato, Phytoplasma, Nested qPCR, Molecular Characterization

TEŐEKKÜR

Yüksek Lisans çalıőmamda bilgi ve birikimi ile bana yol gösteren değerli hocam sayın Prof. Dr. Hikmet Murat SİPAHİOğLU'na en içten teőekkürlerimi sunarım. Çalıőmaların yürütölmesi sırasında bana yardımcı olan eőim Zir. Yük. Müh. Feyzullah YILMAZ'a ve arkadaşım Zir. Yük. Müh. Osman ÇİFTÇİ'ye çok teőekkür ederim.

'Diyarbakır İli Domates Üretim Alanlarındaki Fitoplazma Hastalıklarının Moleküler Yöntemler ile Araştırılması' adlı bu alıőma, Malatya Turgut Özal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından BAP-YL5 nolu proje ile desteklenmiőtir.

Songül ARAZ YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Türkiye’de fitoplazmalar ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar	5
2.2. Dünya’da fitoplazmalar ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar.....	8
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot	11
3.2.1. Arazi çalışmaları	11
3.2.2. Moleküler çalışmaları.....	12
3.2.2.1. DNA ekstraksiyonu	12
3.2.2.2. Yuvalanmış gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Nested qPCR)	13
3.2.2.3. Nested qPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde koşulması ...	15
3.2.2.4. DNA’nın görüntülenmesi ve analizi	15
3.2.2.5. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının benzerlik katsayıları ve sanal RFLP analizi	15
3.2.2.6. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının çoklu dizi karşılaştırması ve filogenetik analizi.....	16
3.2.2.7. 16S rDNA dizilerinin gen bankasına girilmesi.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	17
4.1. Arazi Çalışmaları.....	17
4.2. Moleküler Çalışmalar	18
4.2.1. Nested qPCR yöntemi ile testlenen örneklerin fitoplazma ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular	18
4.2.2. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının benzerlik katsayıları ve sanal RFLP analizi	24
4.2.3. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının çoklu dizi karşılaştırması ve filogenetik analizi	25
4.2.4. 16S rDNA dizilerinin gen bankasına girilmesi	29
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	30
6. KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.	2017 yılı dünya toplam domates üretim miktarı ve alanı.....	1
Şekil 1.2.	Ülkelere göre 2017 yılı domates üretim miktarları	2
Şekil 1.3.	2019 yılı itibari ile bölgelere göre salçalık ve sofralık domates üretim miktarları	2
Şekil 1.4.	Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki illerde salçalık ve sofralık domates üretim miktarları	3
Şekil 3.1.	Diyarbakır ilinde sürvey çalışmaları kırmızı renkle belirtilen ilçelerde yürütülmüştür	11
Şekil 4.1.	Domates bitkisinde gözlenen (a) yapraklarda şekil bozukluğu ve kayık şeklinde kıvrılma, (b) yapraklarda şekil bozukluğu ve sararma...17	
Şekil 4.2.	Domates bitkisinde gözlenen (c) bodurluk ve yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma, (d) yapraklarda sararma ve beyaz lekeler	17
Şekil 4.3.	Domates bitkisinde gözlenen (e) yapraklarda renk kırılması, (f) meyvede şekil bozukluğu.....	18
Şekil 4.4.	Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 1-94 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 29, 44: Pozitif bulunan örnek	19
Şekil 4.5.	Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 95-188 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 107, 115, 132, 162: Pozitif bulunan örnek.....	19
Şekil 4.6.	Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 189-278 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 219: Pozitif bulunan örnek	20
Şekil 4.7.	Fitoplazma varlığının araştırılması için Nested qPCR ile testlenen pozitif örnekler, pozitif kontroller ve su kontrole ait amplifikasyon eğrisi görüntüsü.....	20
Şekil 4.8.	Diyarbakır ilinden alınan domates örneklerinde fitoplazma varlığını tespit etmek için uygulanan Nested qPCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-3000 bp), P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 29, 44, 107, 115, 132, 162, 219: Pozitif örnek.....	21
Şekil 4.9.	' <i>Ca. P. trifolii</i> ' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü	23
Şekil 4.10.	' <i>Ca. P. trifolii</i> ' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü	23
Şekil 4.11.	' <i>Ca. P. solani</i> ' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü	23
Şekil 4.12.	DFT29 ve DFT132 izolatlarının pDRAW32 yazılımı kullanılarak sanal %1'li agaroz jelde sanal RFLP profillerinin oluşturulması. <i>SspI</i> kesim enzimi ile oluşan profillerdeki farklılık kutu içine alınmıştır. MW: 1kb Promega boyutunda marker.	25
Şekil 4.13.	' <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> ' izolatları (DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132, DFT219) ve ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ' izolatı (DFS162)'nin dünyada tespit edilmiş diğer fitoplazma izolatları ile CLC Main Workbench 20.0.3 programı aracılığıyla moleküler benzerliğini gösteren 1000 tekerrürlü olarak oluşturulmuş filogenetik ağaç ...	26
Şekil 4.14.	Domates bitkisinde tespit edilen ' <i>Candidatus Phytoplasma trifolii</i> ' izolatları(DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132, DFT219)'nın CLC Main Workbench 20.0.3 programı yardımı ile yapılmış çoklu nükleotit dizi karşılaştırması	29
Şekil 4.15.	Domates bitkisinde tespit edilen ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ' izolatı(DFS162)'nin CLC Main Workbench 20.0.3 programı yardımı ile yapılmış çoklu nükleotit dizi karşılaştırması	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Survey çalışmalarının yürütüldüğü Diyarbakır iline ait ilçeler ve toplanan domates bitkisi örneği sayıları	12
Çizelge 3.2. Nested qPCR testi için kullanılan primer dizilerine ait bilgiler.....	13
Çizelge 3.3. Nested qPCR testi için kullanılan bileşenlerin miktarı	14
Çizelge 3.4. Nested qPCR testi için kullanılan sıcaklık döngülerine ait bilgiler .	14
Çizelge 4.1. Diyarbakır ilinde sürveyler sonucu alınan örneklerde tespit edilen fitoplazma sayısı, bulunma oranları ve tespit edilen ilçeler	22
Çizelge 4.2. Filogenetik ağaçta ve nükleotit karşılaştırmasında kullanılan Gen Bankasında kayıtlı fitoplazma izolatlarına ait ulaşım numarası, ülke ve baz uzunluğu bilgileri	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ	: Mikron
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
Dk	: Dakika
Gr	: Gram
Kb	: Kilobyte
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Nm	: Nanometre
Pmol	: Pikomol
Rpm	: Dakikada devir sayısı
Sn	: saniye
U	: Ünite
V	: Volt
%	: Yüzde oran
°	: Derece
°C	: Santigrat Derece

Kısaltmalar

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AP	: Elma Çoklu Sürgün Hastalığı
AY	: Aster sarılığı
BO	: Bulaşıklık Oranı
Bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
Ca.	: Candidatus
Ct	: Eşik döngüsü
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole
DFS162	: Diyarbakır Fitoplazma solani 162 no'lu izolat
DFT29	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 29 no'lu izolat
DFT44	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 44 no'lu izolat
DFT107	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 107 no'lu izolat
DFT115	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 115 no'lu izolat
DFT132	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 132 no'lu izolat

DFT219	: Diyarbakır Fitoplazma trifolii 219 no'lu izolat
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
EBS	: Enfeksiyon Bulunma Oranı
ESFY	: Avrupa sert çekirdekli sarılık fitoplazması
FAO	: Dünya Tarım Örgütü
G	: Guanin
GPS	: Küresel Konumlama Sistemi
Kat. No.	: Katalog numarası
MLO	: Mikoplazma benzeri organizma
N	: Negatif kontrol
Nested PCR	: Yuvalanmış Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Nested qPCR	: Yuvalanmış Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NGS	: Yeni nesil dizileme
P	: Pozitif kontrol
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	: Armut Yıkım Fitoplazması
pGEM-T Easy	: Plazmid vektör
PTZ57R/T	: Plazmid vektör
rDNA	: Ribozomal DNA
rRNA	: Ribozomal RNA
RFLP	: Kesilen Parça Uzunluk Polimorfizmi
RFU	: Floresans unitesi
Real-time PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNAse	: Ribo Nükleaz enzim
S	: Su kontrol
Sp	: Tür
T	: Timin
TAE	: Tris Asetat EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
16SrI	: Fitoplazma grubu
16SrI-B	: Fitoplazma grubu
16SrV	: Fitoplazma grubu
16SrIX	: Fitoplazma grubu
16SrXII-A	: Fitoplazma grubu
16SrXIII-A	: Fitoplazma grubu

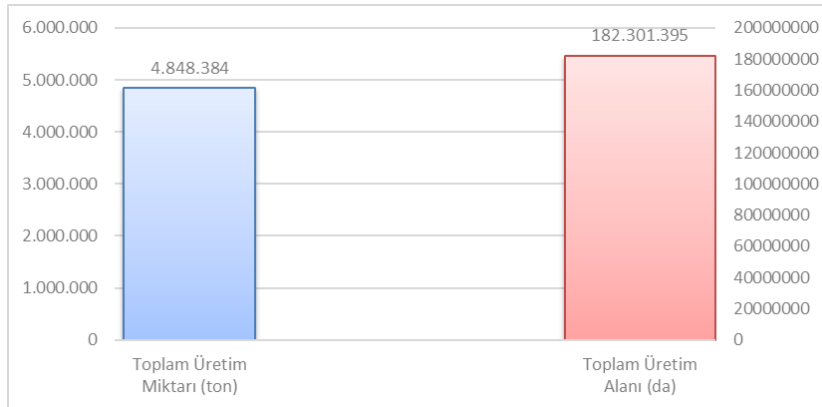
1. GİRİŞ

Dünyada yaygın olarak üretimi yapılan domates (*Solanum lycopersicum*)'in kültür bitkisi olarak kullanımı Peru kıyılarında başlamıştır (Günay, 1992). Benzer iklim koşullarına sahip ekvatorun 30° kuzey enlemi ile 30° güney enlemi arasında kalan bölgelerin bu kültür bitkisinin yetiştirilmesi için en uygun iklim şartlarına sahip olduğu belirlenmiştir (Günay, 2005). Avrupa'ya 16. yüzyılda getirilen domates (Díez ve Nuez, 2008), ülkemize ise 18. yüzyılda getirilmiştir (Bayraktar, 1973). Ülkemize getirilen domates, yaygın olarak yetiştirilen ve sevilerek tüketilen bir sebze durumuna gelmiştir (Yazgan ve Fidan, 1996).

Domates meyvesi besin içeriği olarak; karotenoidler, lipitler, organik asitler, proteinler, selüloz, pektin, polisakkaritler ve %93-95 oranında da su'dan oluşmaktadır (Minoia vd. 2010; Petro-Turza, 1986). Domates zengin bir mineral, organik asit, vitamin ve besin lifi kaynağıdır. Ayrıca vitamin A, C ve potasyum minerali bakımından zengindir. Domatesin kalori ve yağ oranı düşük olup, kolesterol içermez (Kabelka vd. 2004). Domates likopen, beta karoten, flavanoidler içerdiğinden dolayı koruyucu bir bitki olarak görülür. Özellikle likopenin anti-oksidatif faaliyetleri ve anti-kanser fonksiyonlarından dolayı son yıllarda popülerliği artmıştır (Raiola vd. 2014).

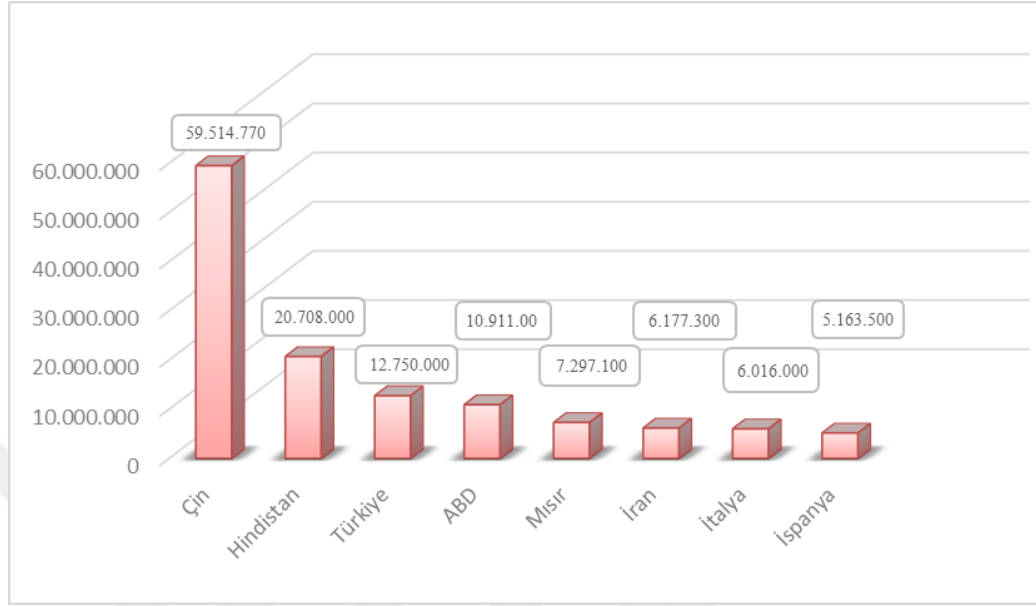
Dünyada ve ülkemizde domates en önemli sebzeler arasında yerini korumakta ve taze kullanımının yanı sıra gıda endüstrisinde ketçap, domates suyu, sos, püre, pestil, çorba, konserve gibi çeşitli işlenmiş ürünler olarak da tüketilebilmektedir (Razdan, 2006).

Dünya Tarım Örgütü (FAO)'nün verilerine göre, 2017 yılı itibari ile dünyada 4 848 384 dekar alanda 182 301 395 ton domates üretimi yapılmaktadır (Şekil 1.1).



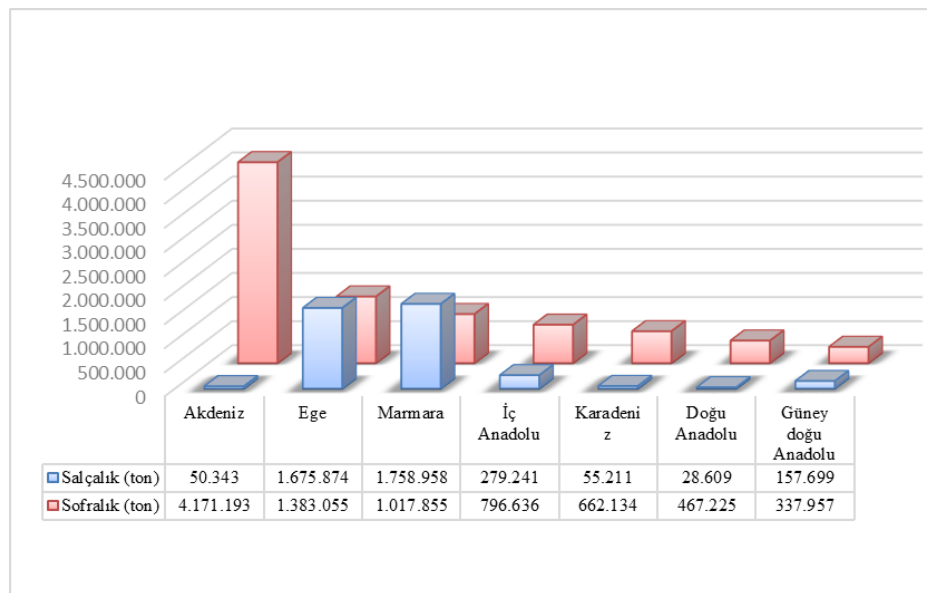
Şekil 1.1. 2017 yılı dünya toplam domates üretim miktarı ve alanı (Anonim, 2020a)

FAO verilerine göre dünyada domates üretiminin en fazla yapıldığı ülke 60 milyon ton ile Çin olurken, Hindistan 21 milyon ton üretim ile ikinci, ülkemiz 13 milyon ton domates üretimiyle üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.2).



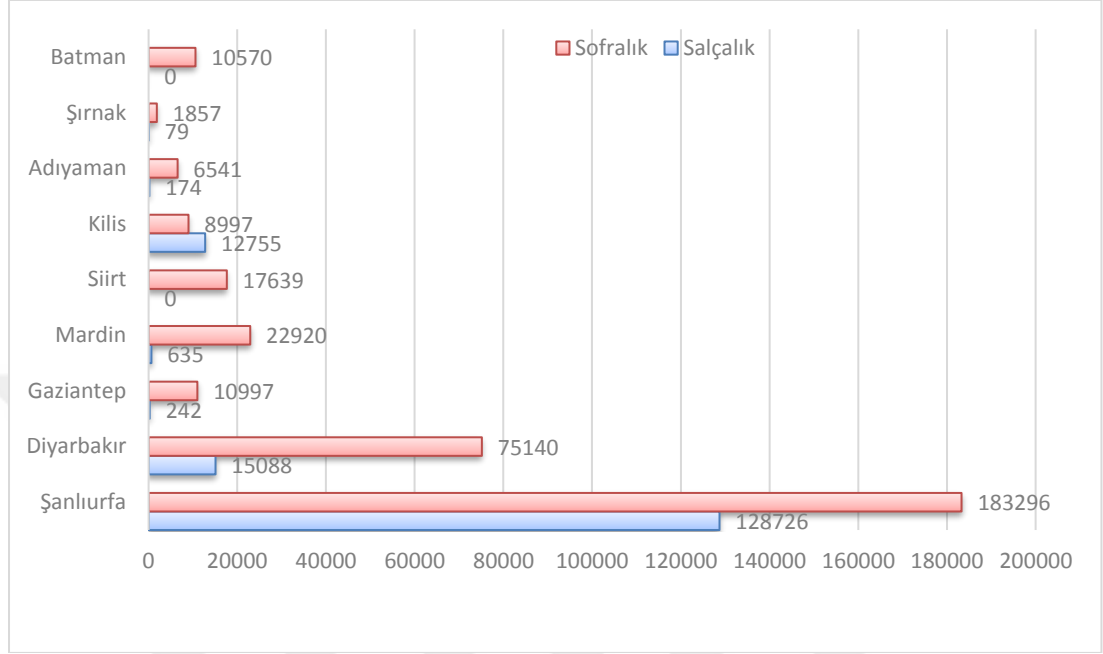
Şekil 1.2. Ünelere göre 2017 yılı domates üretim miktarları (Anonim, 2020b)

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2019 yılı verilerine göre Türkiye'de sofralık domates üretiminin en fazla yapıldığı bölge 4 171 193 ton ile Akdeniz bölgesi iken, salçalık domates üretimi 1 758 958 ton ile en fazla Marmara bölgesinde yapılmıştır. Güneydoğu Anadolu bölgesi 495 656 ton toplam domates üretimiyle en az üretiminin yapıldığı bölge konumundadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. 2019 yılı itibari ile bölgelere göre salçalık ve sofralık domates üretim miktarları (Anonim, 2020c)

TÜİK verilerine göre Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 312 bin ton toplam domates üretimi ile en fazla domatesin üretildiği il Şanlıurfa iken, 75 bin ton sofralık ve 15 bin ton salçalık olmak üzere toplam 90 bin ton üretim ile ikinci sırada Diyarbakır ili yer almaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki illerde salçalık ve sofralık domates üretim miktarları (Anonim, 2020d)

Birçok kültür bitkisinde olduğu gibi domates üretiminin yapıldığı alanlarda hastalıklar çok ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpların bir kısmına da fitoplazma hastalıkları neden olmaktadır.

Fitoplazmalar başta virüs veya virüs benzeri hastalık etmeni olarak değerlendirilmiş (Spaldon, 1958) ama daha sonra mikoplazmalara benzemesi nedeni ile mikoplazma benzeri organizma (MLO: Mycoplasma-like organism) olarak adlandırılmışlardır (Doi vd. 1967). Mollicute Taksonomisi Alt Komitesi tarafından bitki patojeni mollicute'leri ifade etmek için bu patojenlerin “phytoplasma (fitoplazma)” olarak adlandırılması kabul edilmiştir (Çarpar ve Sertkaya, 2015). Daha sonra moleküler teknikler ile tanımlaması yapılan türler “*Candidatus* phytoplasma sp.” olarak isimlendirilmiştir (Çarpar ve Sertkaya, 2015).

Fitoplazmalar yaklaşık 500 nm çapında, tek bir hücre membranı ile çevrili olup, belirgin bir şekli mevcut değildir. Cicadellidae, Fulgoridae, ve Psyllidae familyasına ait böcek türleri ile taşınan ve bitki floeminde sınırlı bakteriyel patojenlerdir (Lee vd.

2000; Bertaccini, 2007; Weintraub vd. 2006). Sürekli olarak bitki ve böcekler arasındaki geçişleri sayesinde canlılıklarını ve yayılışlarını sürdürebilmektedirler (Hogenhout vd. 2008).

Fitoplazma varlığı bitkide ciddi belirtilerin gelişmesine neden olur. Enfekteli bitkide ortaya çıkan belirtiler; yapraklarda kloroz, nekroz, kızarma, sararma, yaprak boyutunda küçülme, aşağı doğru kıvrılma veya yukarı doğru kayık şeklinde belirtiler oluşturabilir (Bertaccini vd. 2009; Sugio vd. 2011). ieklerdeki belirtiler ciddi malformasyonlara, mevsim dışında çiçeklenmeye, bor eksikliği ile karıştırılabilen iek nekrozuna neden olabilir (Lee vd. 2000). Meyvede ise kantitatif ve kalitatif kayıplara, meyve ağırlığında %30-60 oranında azaltma, meyvelerde küçülme, taşlaşma ve meyve olgunlaşmasında gecikmelere neden olabilir. Çoğu durumda fitoplazma enfeksiyonları bitkilerin normal büyümesini de etkileyebilir. Bu anormal gelişmeler bitkide cücelik, alılaşma ve cadısprgesi yapısına neden olabilir (Seemüller vd. 2011).

Domates retim alanlarında görülen fitoplazma hastalıklardan bazıları; ‘*Ca. P. australasia*’, ‘*Ca. P. solani*’, ‘*Ca. P. aurantifolia*’ ve ‘*Ca. P. trifolii*’ (Singh vd. 2012; Usta vd. 2018; Dong vd. 2013) olup, ekonomik olarak bitkilerde ciddi hastalıklara ve ürün kayıplarına neden olmaktadır.

Bu alışma ile Diyarbakır ili ve ilçelerinde domates üretimini yoğun olarak yapıldığı alanlardaki fitoplazma hastalık etmenlerinin Nested qPCR yöntemi ile araştırılması ve yaygınlık durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ekonomik olarak bitkilerde ciddi hastalıklara ve ürün kayıplarına neden olan fitoplazma hastalıkları ilgili ülkemizde ve dünyada birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar ile farklı konukçu desenlerinde birçok fitoplazma hastalığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları ile ilgili bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.1. Türkiye’de fitoplazmalar ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar

Özdemir vd. 2007 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Marmara bölgesinde 2004 ile 2007 yılları arasında, domates tarlalarından ve tarla kenarlarından toplanan bitki ve zararlı böcek örneklerindeki fitoplazma varlığının saptanması için Nested PCR yöntemi kullanılmış. Bu testlemeler sonucu domates üretim alanlarında stolbur hastalığı tespit edilmiş. *Cuscuta campestris*, *Orobanche ramosa*, *Datura stramonium*, *Polygonum persicaria*, *Setaria* spp., *Chenopodium album*, *Amaranthus albus* gibi yabancı otlar domates alanlarında alternatif konukçu olarak belirlenmiş. Domates tarlalarından toplanan 22 böcek türü arasında *Typhlocyba quercus*'un domates stolbur hastalığının potansiyel vektörü olduğu bildirilmiştir.

Canik, 2007 yılında Isparta, Yalova ve Ankara illerindeki elma ve armut bahçelerinden hastalık belirtileri gösteren 201 adedi elma, 133 adedi armut olmak üzere toplam 334 adet örnek Apple Proliferation Fitoplazma (AP) ve Pear Decline Fitoplazma (PD) enfeksiyonları açısından incelenmiş. Elde edilmiş tüm örnekler DAPI boyama, Nested PCR ve RFLP' ye tabi tutulmuş. Yapılan çalışmalar sonucunda, Isparta ve Ankara'dan toplanan örneklerden toplam 9 adet elma örneğinde ‘*Ca. P. mali*’ tespit edilmiştir. Yalova ve Ankara'dan toplanan toplam 11 adet armut örneğinde ‘*Ca. P. pyri*’ saptanmıştır. Bu çalışma ile elmada ‘*Ca. P. mali*’ enfeksiyonu Türkiye' de ilk kez saptandığı bildirilmiştir.

Sertkaya vd. 2008 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2004 tarihinde Adana, Mersin ve Niğde illerindeki elma bahçelerinde simptomlu ve simptomsuz 10 farklı elma çeşidinden 28 örnek toplanmış ve Nested PCR yöntemi ile testlenmiş. 28 elma örneğinden 6'sının ‘*Ca. P. mali*’ tespit edilmiş. Bu çalışma ile ‘*Ca. P. mali*’nin Türkiye'deki ilk kaydı olduğu bildirilmiştir.

Eroglu vd. 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2003-2010 yılları arasında Erzurum ve Şanlıurfa illerinde patates bitkisinde fitoplazma belirtisi gösteren 8 bitki örneği toplanmış ve Nested PCR testi uygulanmış. Pozitif örnekler sanal RFLP

analizine tabi tutulmuş. Patates bitkilerinde stolbur fitoplazması tespit edildiği belirtilmiştir.

Özdemir ve Saygılı, 2012 yılında Bursa ve Çanakkale illerinin domates üretimi yapılan alanlarında survey çalışmaları yapmış. Stolbur hastalığının görüldüğü dönemde araziden simptom gösteren ve göstermeyen domates bitkilerinden tohumlar alınmış. Çalışmalar sonucunda, stolbur hastalığının yoğun olarak görüldüğü bölgeler saptanmış ve domates stolbur hastalığının tohumla taşınmadığı belirtilmiştir.

Catal vd. 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında toplam 20 Susam (*Sesamum indicum* L.) örneğine Nested PCR testi uygulanmış. Pozitif bulunan 4 örnek pTZ57R / T Vektörü içerisinde klonlanmış ve Beckman Coulter 8000 CEQ Genetik Analiz Sistemi kullanılarak sekanslanmış. BLAST analizi sonucunda örnekler 16SrIX grubu fitoplazma olduğu belirlenmiş. Türkiye'de 16SrIX grubundan bir fitoplazmanın susamda enfeksiyonunun ilk kaydı olduğunu bildirilmiştir.

Çağlayan vd. 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2011 yılında Uşak ilinde mevsim dışı çiçeklenme gösteren kiraz ağaçlarından 15 örnek toplanmış ve Nested PCR testi uygulanmış. Örneklerin 7'sinin pozitif olduğu belirlenmiş. PCR ürünleri RFLP analizi yapılmış. BLAST analiz sonucunda pozitif örneklerin '*Ca. P. asteris*' olduğu belirlenmiş. '*Ca. P. asteris*'in Türkiye'de kiraz ağaçlarındaki ilk kaydı olduğu bildirilmiştir.

Ertunc vd. 2015 yılında Türkiye'de bağcılığın yoğun olarak yapıldığı alanlarda 309 bitki örneği toplanmış ve fitoplazma varlığının saptanması ve tanımlanması için Nested PCR ve RFLP analizleri yapılmış. Testlemeler sonucunda fitoplazma enfeksiyonu oranı %18.33 olarak belirlenmiş. Pozitif örneklerden 16SrXII-A, 16SrV, 16SrI-B ve 16SrIX grubuna ait fitoplazmalar tespit edildiği belirtilmiş. Çalışma kapsamında Diyarbakır ilinden alınan 10 bağ örneğinin 3'ünde 16SrXII-A grubu fitoplazma tespit edildiği bildirilmiştir.

Sarı, 2015 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2013 ile 2014 yıllarında Hatay ilinde bulunan nar ağaçlarından 154 bitkiden yaprak ve sürgün örnekleri toplanmış. Yapılan PCR analizlerinde testlenen nar bitkilerinin hiçbirisinde fitoplazma tespit edilemediği bildirilmiştir.

Alp vd. 2016 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2014 yılında Van ili süs bahçelerinde kadife çiçeği bitkilerinde kızarıklık belirtileri tespit edilmiş. PCR ile test

edilen örnekler beklenen 1.2 kb DNA fragmentleri elde edilmiş. Amplifiye edilmiş PCR fragmentleri bir plazmid vektörüne klonlanmış. Rekombinant plazmid DNA izole edilmiş ve çift taraflı olarak dizilenmiş. 16S rDNA dizilerinin BLAST analizi ve sanal RFLP analizi sonucu '*Ca. P. solani*' fitoplazmasının varlığı tespit edilmiş. Kadife çiçeği '*Ca. P. solani*'nin konukçusu olduğunun ilk kaydı olduğu bildirilmiştir.

Usta vd. 2017 yılında Van ilinden toplanan 8 hıyar örneğine Nested PCR testi uygulanmış. 16S rDNA fragmentleri çoğaltılmış ve test edilen sekiz örneğin dördünde 1.25 kb uzunluğunda DNA fragmentleri elde edilmiş. Beklenen band büyüklüğünü veren örneklerden rastgele seçilen iki örnek bir plasmid vektörde klonlanmış. Saflaştırılan rekombinant plasmid DNA'sı çift yönlü olarak dizilenmiş ve 16S rDNA dizisinin BLAST ve sanal RFLP analizleri yapılmış. Hıyar numunelerinin birinde '*Ca. P. solani*' ve '*Ca. P. trifolii*' saptanmış. Yazarların bilgisine göre, Türkiye'de hıyarları doğal olarak enfekte eden '*Ca. P. solani*' ve '*Ca. P. trifolii*' fitoplazma etmenleri ilk defa bu çalışma ile rapor edildiği bildirilmiştir.

Usta vd. 2018 yılında Van ilindeki domates tarlalarından alınan örnekler Nested PCR yöntemi ile testlenmiş. Test edilen 100 domates örneğinden 11'inde 1.25 kb'lık bir DNA bandı elde edilmiş. Amplifiye edilmiş PCR ürünleri daha sonra pGEM T-Easy vektörüne klonlanmış ve yeni nesil DNA sekanslama (NGS) sistemi kullanılarak sekanslanmış. 16S rDNA dizilerinin moleküler tespitleri sanal RFLP analizi ile karakterize edilmiş. Pozitif örneklerin '*Ca. P. trifolii*' ve '*Ca. P. solani*' olduğu belirlenmiş. Bu çalışma ile Türkiye'de domateste '*Ca. P. trifolii*' ilk kez rapor edildiği bildirilmiştir.

Korkmazoğlu, 2018 yılında Şanlıurfa ilinde top akasya ağaçlarında fitoplazma hastalıklarını belirlemek amacıyla toplanan örneklere Nested PCR yöntemi uygulanmış. Testler sonucunda bazı örneklerde beklenen düzeyde bant (1250 bp) gözlenmiş. PCR ürünleri üzerinden yapılan RFLP sonuçlarına göre etmenin fitoplazma olduğu belirlenmiş fakat tür teşhisleri yapılmamıştır.

Kaçar, 2019 yılında yayınladığı tez çalışmasında, Diyarbakır ili mısır üretim alanlarındaki fitoplazma hastalıklarını araştırmak amacıyla 2016 yılında survey çalışmaları yürütülmüş. Toplanan 225 mısır örneği Nested PCR yöntemi ile testlenmiş. Diyarbakır ili mısır alanlarında fitoplazma hastalığına rastlanmadığını bildirmiştir.

Alar, 2019 yılında Diyarbakır iline bağlı Çınar, Bismil ve Sur ilçelerindeki

biber üretim alanlarından alınan örnekler Nested PCR yöntemiyle testlenmiş. Nested PCR sonucu ürünleri EcoRI restriksiyon enzimiyle RFLP yapılmış. Bu çalışma ile Diyarbakır ilinde biber bitkilerinde fitoplazma enfeksiyonu ilk kez saptandığını bildirmiş fakat tür teşhisleri yapılmamıştır.

2.2. Dünya’da fitoplazmalar ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar

Menon ve Pandalai, 1960 yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmaların bitki floeminde yaşayan hücre duvarında yoksun bakteriler olduğu belirtilmiş, floem sistemi ile embriyolar arasında doğrudan bir bağlantının olmaması nedeniyle fitoplazmaların tohumlara geçemediğini bildirmişlerdir.

Doi vd. 1967 yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmalar enfekteli bitkilerin floem dokularında bulunan çok küçük hücrelerinin elektron mikroskopunda gözlemlenmeden önce virüs olduğu düşünüldüğü belirtilmiş. Elektron mikroskobu gözlemlerine dayanarak, enfekteli bitkilerin dokularındaki hücre duvarından yoksun yapılar mikoplazmalara benzetilerek öyle adlandırıldığını bildirmişlerdir.

Okuda vd. 1972 yılında yayınladıkları çalışmada, 1603 yılında Japonya’da bulunan ilk fitoplazma hastalığını olduğu sonradan belirlenen ve kayıtlara geçen Dut bodurluk hastalığı (Mulberry dwarf disease) olarak geçen, kültüre alınamayan bir virüs tarafından oluşturulduğu düşünüldüğünü bildirmişlerdir.

Clark vd. 1989 yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmalar bitkilerin farklı organlarında tespit edildiğini ve otsu konukçu bitkilerin çiçek yapılarında genellikle yüksek konsantrasyonda olduğunu bildirmişlerdir.

McCoy vd. 1989 yılında yaptıkları çalışmada, fitoplazmaların çiçek anormalliklerine ve meyve malformasyonlarına neden olduğu için enfekte olmuş bitkilerden elde edilen tohumların çimlenmediğini belirtmişlerdir.

Bertaccini vd. 1992 yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmaların; vektör böcekler, aşılama, budama, yumru kökler, rizomlar ve küskütler ile taşınabildiğini belirtmişlerdir.

Davis ve Sinclair, 1998 yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmaların neden olduğuna inanılan birçok bitki hastalığı, fitoplazma gruplarının moleküler analizlerle tanımlanmadan önce simptomolojik olarak tanımlandığını belirtmişler. Ayrıca bazı fitoplazmaların botanik konukçu aralıklarının vektörler ve vektör besleme tercihleri ile

iletimde özgülükleri yansıttığını da bildirmişlerdir.

Lee vd. 1998a yılında yayınladıkları çalışmada, fitoplazmalar birkaç endonükleaz restriksiyon enzimi kullanıp RFLP analizi uygulanarak sınıflandırılabilir. Tüm fitoplazmaların RFLP deseni korunduğundan, bilinmeyen fitoplazmalar tüm referans fitoplazmaların RFLP desenleriyle karşılaştırılarak teşhisi yapılabileceği belirtilmiştir.

Lee vd. 1998b yılında yayınladıkları çalışmada, 16S ribozomal RNA (rRNA) sekanslarının analizine dayanan kapsamlı filogenetik çalışmalar, fitoplazmaların filogenetik olarak Mollicutes sınıfı üyesi olarak oluşturulduğunu belirtmişlerdir.

Del Serrone vd. 2001 yılında yaptıkları çalışmada, 1999-2000 yılları arasında İtalya'da fitoplazma hastalıklarıyla ilişkili olduğu düşünülen domates bitkileri tespit edilmiş. PCR ve RFLP kullanılarak karakterize edilen örneklerde, bunların 16S rRNA grup I, III, V ve XII'ye ait fitoplazmalar olduğu belirlenmiş. Tespit edilen grup III ve grup V fitoplazmaları, domateste ilk kayıt olduğu bildirilmiştir.

Jiang vd. 2004 yılında yayınladıkları çalışmalarında, dut çüce fitoplazma hastalığının dut çekirdeklerinde tespit edildiğini, (Nečas vd. 2008) yaptıkları çalışmada ESFY ile enfekte olan kayısı bitkisinin çekirdeklerinde de bu hastalığı barındırdığı, (Nipah vd. 2007) yaptıkları çalışmada 'Ca. P. asteris' ile enfekteli mısır bitkisinin tohumlarında da bu etmenin tespit edildiği, (Olivier vd. 2006, 2010) yaptıkları çalışmalarda aster sarılığı (AY) etmeninin *Brassica rapa* tohumlarında da tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Holguín-Peña vd. 2007 yılında Meksikaya bağlı Baja California'da yürütülen bu çalışmada fitoplazma belirtileri gösteren domates bitkilerine Nested PCR ve sonrasında RFLP uygulanmış. Pozitif domates örneklerinin %85'inin 16SrI-B alt grubu olan 'Ca. P. asteris', %10'u 16SrXIII-A grubu bir fitoplazma olduğu belirlenmiş. Baja California'da fitoplazma varlığının ilk moleküler kaydı olduğu bildirilmiştir.

Vellios ve Lioliopoulou, 2007 yılında yayınladıkları çalışmada, 2005 ile 2006 yılları arasında domates bitkisindeki fitoplazma hastalıklarını belirlemek amacıyla Yunanistan'ın farklı bölgelerindeki domates tarlalarında survey gerçekleştirilmiş. PCR analizi ile testlenen bitkiler daha sonra gruba özgü primerler kullanılarak testlenmiş. Bu testler sonucunda aster sarısı (16SrI) ve stolbur (16SrXII-A) fitoplazmaları tespit edildiği bildirilmiş.

Contaldo vd. 2012 yılında yayınladıkları çalışmada, Obligat bir parazit olan fitoplazmalar, in-vitro koşullarında kültüre alınamazken, yaptıkları çalışmada Fitoplazmaları axenic ortamında kültüre alınabilindiğini bildirmişler.

Singh vd. 2012 yılında Hindistan'da batı Uttar Pradesh'in Meerut bölgesindeki fitoplazma belirtisi gösteren 8 domates bitkisi Nested PCR yöntemi ile testlenmiş. Sekans analizleri sonra BLAST analizi yapılan pozitif örnekler '*Ca. P. aurantifolia*' olduğu belirlenmiş. Hindistan'da domates bitkisini enfekte eden bu fitoplazmanın ilk kaydı olduğu bildirilmiştir.

Khalil vd. 2019 yılında yayınladıkları çalışmada, 2017 yılında Suriye'nin Humus eyaletinde fitoplazma belirtileri gösteren toplanan 12 domates bitkisi örneği Rusya Fitopatoloji Araştırma Enstitüsü'ne gönderilmiş. Nested PCR ve RFLP analizi uygulanan örnekler '*Ca. P. trifolii*' etmeni olduğu belirlenmiş. Suriye'deki domatesleri enfekte eden bu fitoplazmanın ilk kaydı olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

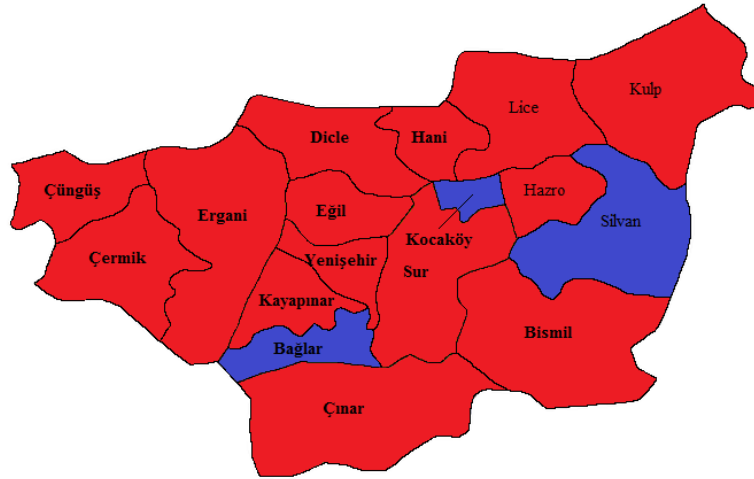
3.1. Materyal

Diyarbakır ili domates üretim alanlarından alınan 278 bitki örneği çalışmanın ana materyali olarak kullanılmıştır. Arazi çalışmaları ve moleküler çalışmalarda kullanılan termalcycler, mikropipet, mikropipet uçları, PCR tüpleri, primerler, SYBR Green, polietilen torba, etiket, GPS cihazı, diğer çeşitli kimyasallar ve sarf malzemeler çalışmanın diğer materyallerini oluşturmuştur.

3.2. Metot

3.2.1. Arazi çalışmaları

Diyarbakır ili ve ilçeleri arazi çalışmalarının sürvey alanını oluşturmuştur (Şekil 3.1). 2018 yılında yürütülen bu çalışma ile güdümlü örnek alma yöntemine göre örnekleme yapılmış (Bora ve Karaca, 1970) ve tesadüfi olarak seçilen domates tarlalarından en az bir adet olmak üzere, fitoplazma simptomu gösteren veya göstermeyen bitkilerden örnekler alınmıştır (Çizelge 3.1). Alınan domates örneklerinin GPS koordinatları kaydedilerek, etiket bilgileriyle beraber polietilen torbalara konup laboratuvara getirilmiş ve moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Diyarbakır ilinde sürvey çalışmaları kırmızı renkle belirtilen ilçelerde yürütülmüştür

Çizelge 3.1. Survey çalışmalarının yürütüldüğü Diyarbakır iline ait ilçeler ve toplanan domates bitkisi örneği sayıları

İlçeler	Toplanan Örnek Sayısı
Bismil	16
Çermik	21
Çınar	17
Çüngüş	13
Dicle	21
Eğil	10
Ergani	91
Hazro	5
Hani	1
Kayapınar	11
Kulp	23
Lice	25
Sur	9
Yenişehir	15
Toplam	278

3.2.2. Moleküler çalışmalar

3.2.2.1. DNA ekstraksiyonu

Toplanan domates örneklerinden fitoplazma varlığının araştırılması için DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyon çalışmaları Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Kat. No: 69106) kullanılarak yürütülmüştür. DNA izolasyonu için firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır. Buna göre; toplanan domates yaprakları sıvı azot yardımıyla ezilerek 0.1 gram'ı 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır. Eppendorf tüplere alınan örneklerin üzerine 400 µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A ilave edilerek kuru blok ısıtıcıda 65°C'de 10 dk süreyle inkübe edilmiştir. Eppendorf tüplere daha sonra 130 µl AP2 buffer ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dk buzda inkübe edilmiştir. Bitki dokularının çökmesi için 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş üstte kalan sıvı mikropipet yardımı ile alınarak pembe kolon (QIAshredder spin colon)'a aktarılmış ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Pembe kolon atılmış ve biriktirme tüpünde kalan sıvınının 1.5 katı kadar AP3/E bufferdan ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. Biriktirme tüpündeki yaklaşık 650 µl olan sıvıyı beyaz kolon (DNeasy Mini spin colon)'a transfer edip, 15 dk oda sıcaklığında beklettikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Biriktirme tüpü,

içindeki sıvı ile beraber atılmış ve beyaz kolon yeni bir biriktirme tüpüne yerleştirilmiştir. Beyaz kolon'a 500 µl AW bufferdan ilave edildikten sonra 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Biriktirme tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve tekrar 500 µl AW bufferdan ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Yeni bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne beyaz kolon yerleştirilmiş ve 100 µl AE bufferden ilave edilerek 10-15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Eppendorf tüpüne yerleştirilmiş beyaz kolon 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Beyaz kolon atılmış ve eppendorf tüpün içinde toplanan 100 µl DNA solüsyonu -80°C'de muhafazaya alınmıştır.

3.2.2.2. Yuvalanmış Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Nested qPCR)

Domates örneklerinde fitoplazma varlığını araştırmak için Lee vd. (1993)'nin yaptıkları çalışma modifiye edilerek Nested qPCR yöntemi uygulanmıştır. İki aşamalı olarak gerçekleştirilen bu yöntemde birinci aşamada R16mF2/R16mR1 primerleri kullanılarak örneklere Real-time PCR testi uygulanmıştır. İkinci aşamada ise birinci aşamada elde edilen PCR ürünleri 1/50 oranda sulandırılıp R16F2n/R16R2 primerleri kullanılarak Nested qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Fitoplazmaların teşhisinde kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Nested qPCR testi için kullanılan primer dizilerine ait bilgiler

	Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu
1.Aşama	R16mF2	5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'	1800 bp
	R16mR1	5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3'	
2.Aşama	R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	1250 bp
	R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	

Fitoplazmaların teşhisi için steril bir PCR tüpüne toplam 20 µl hacimde olacak biçimde Çizelge 3.3'teki PCR bileşenleri konularak Nested qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sıcaklık döngülerine ait bilgiler Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Nested qPCR testi için kullanılan bileşenlerin miktarı

Kullanılan bileşenler	1.Aşama	2.Aşama
SYBR® Green Master Mix	10 µl	10 µl
Primer Forward (10 pmol)	0.4 µl	0.4 µl
Primer Reverse (10 pmol)	0.4 µl	0.4 µl
Su	7.2 µl	7.2 µl
DNA	2 µl	2 µl (¹ / ₅₀ oranında sulandırılmış)
Toplam	20 µl	20 µl

Çizelge 3.4. Nested qPCR testi için kullanılan sıcaklık döngülerine ait bilgiler

Etmen		Sıcaklık Döngüleri		Çoğaltılan DNA Uzunluğu	
1.Aşama	Fitoplazma	95°C	5 dk	40 Döngü	1800 bp
		95°C	40 sn		
		55°C	60 sn		
		72°C	90 sn		
		72°C	10 dk		
		4°C	∞		
2.Aşama	Fitoplazma	95°C	5 dk	40 Döngü	1250 bp
		95°C	40 sn		
		55°C	60 sn		
		72°C	90 sn		
		72°C	10 dk		
		4°C	∞		

Asimetrik bir siyanin boyası olan SYBR Green ile yapılan Nested qPCR analizinde, pozitif numuneler bir floresan boya reaksiyonu ile tespit edilir. C_t (cycle threshold), gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarında floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısı (eşik döngüsü) olarak tanımlanır (Anonim, 2020e).

- Ct değeri 29 döngünün altında ise, analiz edilen numunede bol miktarda hedef nükleik asid olduğunu gösteren güçlü pozitif bir reaksiyon meydana gelmiştir.
- Ct değeri 30-37 döngü aralığında ise, analiz edilen numunede orta miktarlarda hedef nükleik asidin olduğunu gösteren pozitif bir reaksiyon meydana gelmiştir.
- Ct değeri 38-40 döngü aralığında ise, bir enfeksiyon durumu veya çevresel kontaminasyonu temsil edebilecek minimum miktarda hedef nükleik asidi gösteren zayıf bir reaksiyon meydana gelmiştir.

Fitoplazma etmenlerinin teşhisi için yapılan Nested qPCR testinde Ct değeri 38'den az olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Nested qPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde koşulması

qPCR yönteminde jel elektroforez işlemine ihtiyaç olmamasına rağmen SYBR Green boyası ile yapılan qPCR yönteminde, istenmeyen PCR ürünlerinin çoğalmasıyla da floresan boya açığa çıkabileceğinden yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (Günel, 2007). Yanlış pozitif sonuçların önüne geçmek için Nested qPCR sonucu elde edilen DNA ürünleri %1'lik agaroz jel hazırlanarak elektroforez yapılmıştır. Jelin hazırlanması için 1 gr agaroz (SeaKem® LE) ile 100 ml 1X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tampon çözeltisi mikrodalga fırında çözülmesi sağlanmıştır. Jel tepsisine tarak takılmış ve jel hava oluşturmada yavaşça dökülmüştür. Jelin soğuyup katılaşması için yaklaşık 30 dk beklenmiştir. Soğuyan jelden tarak dikkatlice çıkarılmış ve jel elektroforez tankına alınmıştır. Jel çukurlarına GeneDireX marka 100 bp DNA marker (Kat. No. DM003-R500), fitoplazmaya ait pozitif örnek (Agdia), su kontrol ve PCR ürünleri yükleme tamponu (Thermo marka 6X loading buffer) ile jele yüklenmiştir. Güç kaynağı 90Volt'a ayarlanıp 70 dakika süre ile elektrik akımı uygulanmıştır.

3.2.2.4. DNA'nın görüntülenmesi ve analizi

Elektroforez işleminden sonra jel, etidyum bromide içeren çözeltide boyanmıştır. DNA'lar jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiş ve 1250 bp uzunluğundaki fragmentler pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kabul edilen örnekler steril bistürü yardımıyla kesilerek 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alınmış ve dizilemelerinin yapılması için firmaya gönderilmiştir.

3.2.2.5. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının benzerlik katsayıları ve sanal RFLP analizi

Moleküler çalışmalar sonucu elde edilen fitoplazmalara ait 16SrDNA'ların çift yönlü dizilenmesi için BM labosis firmasına gönderilmiştir. 16S rDNA dizileri sanal bir jel çizim yazılımı olan pDRAW32 (AcaClone) kullanılarak Kesilen Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) analizine tabi tutulmuş ve bilgisayar simülasyon modeli elde edilmiştir. Yaklaşık 1250 bp uzunluğundaki her bir 16S rDNA dizisi on yedi farklı kesim enzimi (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* ve *TaqI*) ile kesilerek elde edilen DNA fragmentleri program yardımı ile % 1.0'lik sanal agaroz jelde koşulmuş ve hakiki

jel görüntüsü oluşturulmuştur (Lee vd. 1998a). Sanal RFLP benzerlik katsayısı 16Sr DNA dizileri web tabanlı iPhyClassifier (Zhao vd. 2009) programı yardımıyla elde edilmiştir.

3.2.2.6. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının çoklu dizi karşılaştırması ve filogenetik analizi

Tespit edilen fitoplazma izolatlarının 16Sr DNA dizileri CLC Main Workbench bioinformatik programlarını ile çoklu karşılaştırmaları Neighbor Joining algoritması ile yapılmış elde edilen filogenetik ağaç ise 1000 tekrar analizi ile oluşturulmuştur. 16Sr DNA dizileri tespit edilen fitoplazma etmenleri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankasından BLAST programı ile araştırılmış ve farklı ülkelere ait farklı izolatlar ile benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir.

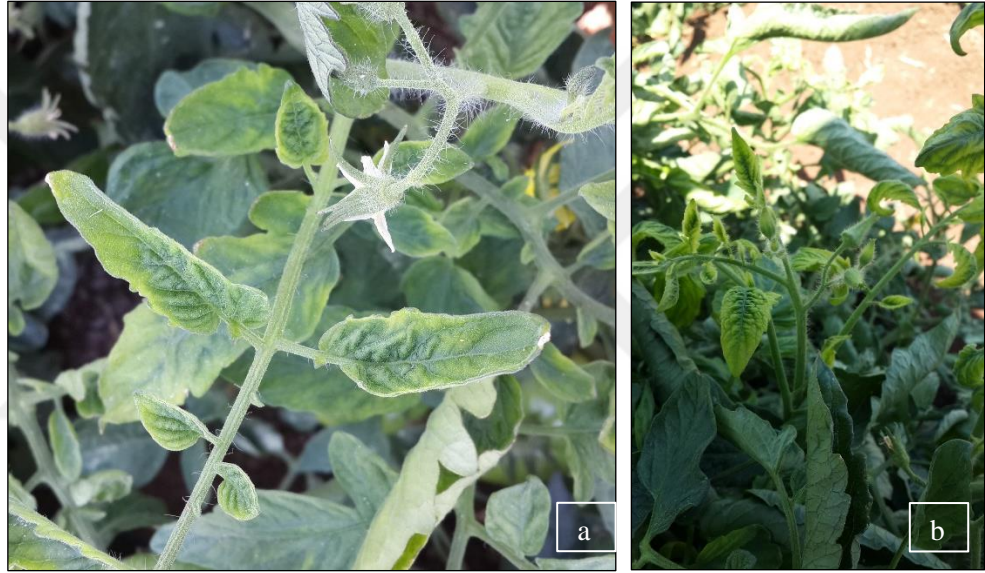
3.2.2.7. 16S rDNA dizilerinin gen bankasına girilmesi

Domates numunelerinde tespit edilen fitoplazma etmenlerine ait 16Sr DNA dizileri Gen Bankası (NCBI)'na kaydedilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Diyarbakır iline bağlı; Çermik, Çüngüş, Eğil, Ergani, Çınar, Sur, Kayapınar, Yenişehir, Hazro, Kulp, Lice, Bismil, Dicle ve Hani ilçelerindeki domates alanlarında fitoplazmaların varlığının ve yaygınlığını tespit etmek amacıyla domates bitkilerinde rozetleşme, yaprak kıvrılması, morarma, çiçek sterilitesi, yapraklarda şekil bozukluğu, yapraklarda sararma, meyvelerde şekil bozukluğu ve bodurlaşma gibi belirtiler gösteren ve göstermeyen 278 bitkiden yaprak örneği toplanmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Domates bitkisinde gözlenen (a) yapraklarda şekil bozukluğu ve kayık şeklinde kıvrılma, (b) yapraklarda şekil bozukluğu ve sararma



Şekil 4.2. Domates bitkisinde gözlenen (c) bodurluk ve yaprak yüzeyinde kabarcıklaşma, (d) yapraklarda sararma ve beyaz lekeler

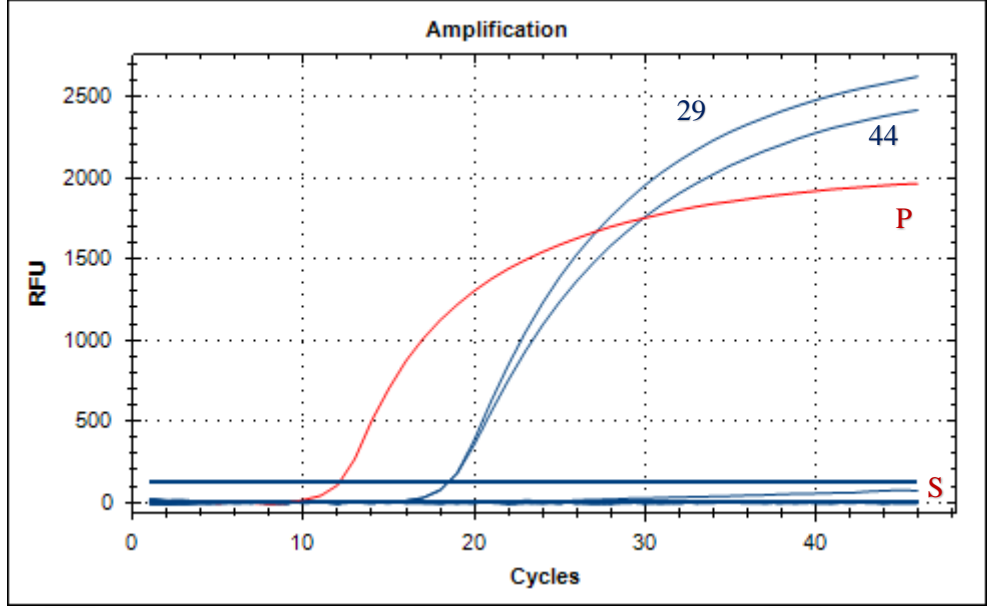


Şekil 4.3. Domates bitkisinde gözlenen (e) yapraklarda renk kırılması, (f) meyvede şekil bozukluğu

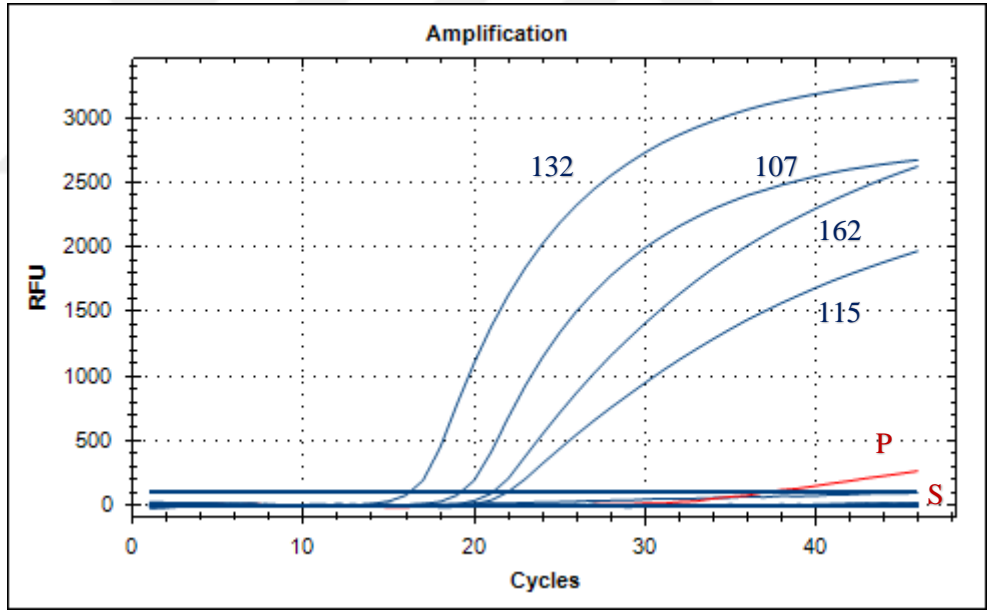
4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Nested qPCR yöntemi ile testlenen örneklerin fitoplazma ile enfekteli olup olmadığının tespit edilmesine dair bulgular

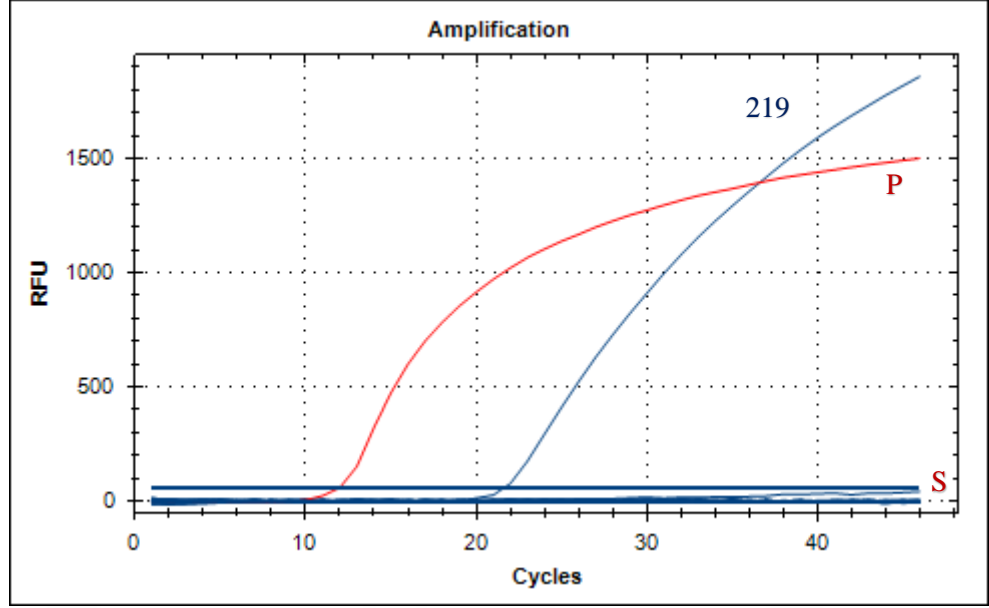
2018 yılında Diyarbakır ili domates alanlarından toplanan örneklerde fitoplazma varlığını tespit etmek amacı ile bitkilerden izole edilen total DNA numunelerine Nested qPCR testi uygulanmıştır. Yürütülen testlerde su kontrol kullanılırken, pozitif kontrol olarak Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen '*Ca. P. solani*', '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. prunorum*' ve '*Ca. P. vitis*' etmenleri kullanılmıştır. Testlenen 278 domates yaprak örneğinden 7'sinin fitoplazma ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6). Ertunc vd. 2015 yılında Diyarbakır ilindeki bağ alanlarında yaptıkları bir çalışmada fitoplazma tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu Diyarbakır ilindeki ilk fitoplazma varlığının kaydı olarak geçmiştir. Alar, 2019 yılında yaptığı çalışmasında Diyarbakır iline bağlı Çınar, Bismil ve Sur ilçelerindeki biber bitkilerinde fitoplazma enfeksiyonu saptandığını bildirmiş ve bunun Diyarbakır ilinde bulunan biberlerdeki fitoplazma varlığının ilk kaydı olduğunu belirtmiştir.



Şekil 4.4. Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 1-94 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 29, 44: Pozitif bulunan örnek

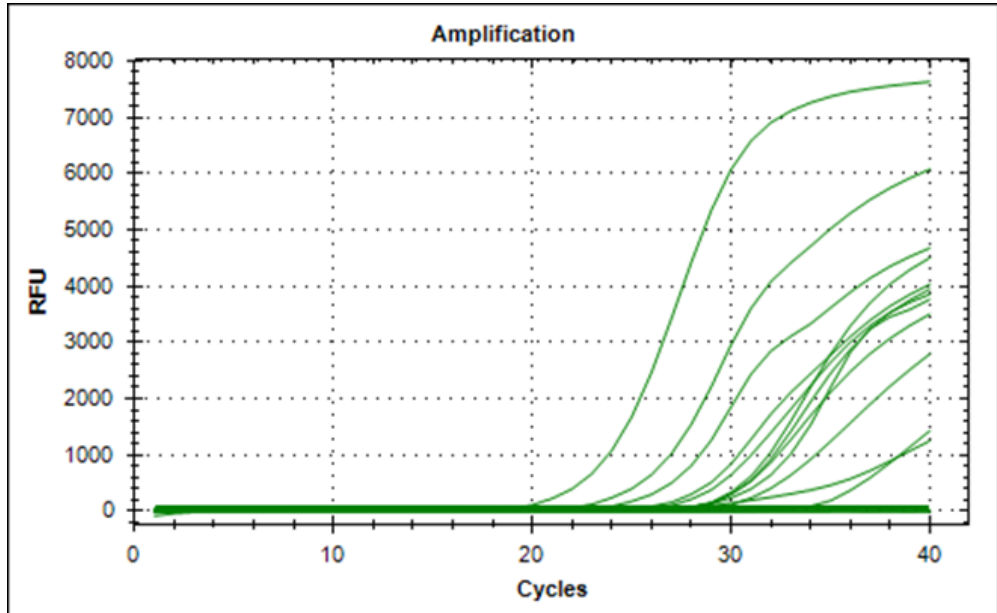


Şekil 4.5. Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 95-188 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 107, 115, 132, 162: Pozitif bulunan örnek



Şekil 4.6. Fitoplazma varlığının araştırılması için qPCR ile testlenen 189-278 no'lu örneklerin amplifikasyon eğrisi görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, S: Su Kontrol, 219: Pozitif bulunan örnek

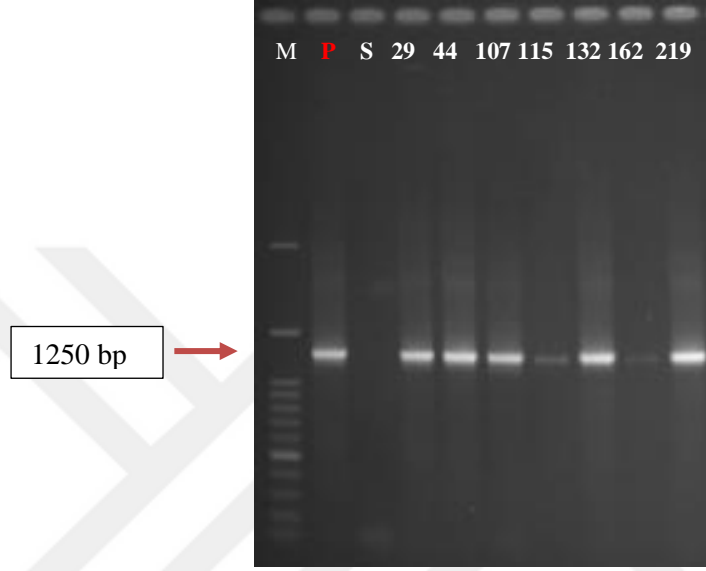
qPCR sonucu pozitif bulunan örnekler 1/50 oranında sulandırılarak Nested qPCR yöntemi ile testlenmişlerdir. Yürütülen testte su kontrol kullanılırken, pozitif kontrol olarak Agdia firmasından temin edilen '*Ca. P. solani*', '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. prunorum*' ve '*Ca. P. vitis*' etmeni kullanılmıştır. Su kontrol Ct değerinin altında kalırken, pozitif kontroller ve pozitif örnekler Ct değerinin üstüne çıkmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Fitoplazma varlığının araştırılması için Nested qPCR ile testlenen pozitif örnekler, pozitif kontroller ve su kontrolüne ait amplifikasyon eğrisi görüntüsü

Nested qPCR yöntemi ile testlenen ve enfekteli olduğu tespit edilen domates

örneklerine ait sonuçların kontrol edilmesi ve moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere DNA dizilemelerinin yapılması amacıyla 'Ca. P. solani' etmenine ait pozitif kontrol örneği ile birlikte jel elektroforezde koşturulmuştur. Nested qPCR testinde pozitif kontrol ve pozitif tespit edilen 7 örnek 1250 bp büyüklüğünde DNA bandı oluştururken, su kontrolde herhangi bir bant oluşmamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Diyarbakır ilinden alınan domates örneklerinde fitoplazma varlığını tespit etmek için uygulanan Nested qPCR testinin agaroz jel görüntüsü, M: Marker (100-3000 bp), P: Pozitif kontrol, S: Su kontrol, 29, 44, 107, 115, 132, 162, 219: Pozitif örnek

Testlenen 278 domates yaprağı örneğinden 7(%2.5)'sinin fitoplazma etmeni ile bulaşık oldukları tespit edilmiştir. Nested qPCR yöntemi ile testlenen örneklerden fitoplazma bulaşıklık oranının en yüksek bulunduğu ilçe %9.5 bulaşıklık oranı ile Çermik olurken, onu %9 bulaşıklık oranı ile Kayapınar, %5.9 bulaşıklık oranı ile Çınar ve %3.3 bulaşıklık oranıyla Ergani takip etmiştir. Bismil, Çüngüş, Dicle, Eğil, Lice, Hazro, Hani, Kulp, Sur ve Yenişehir ilçelerinden alınan domates örneklerinde fitoplazma etmeni tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1). Özdemir vd. 2007 yılında Marmara bölgesindeki domates üretim alanlarında, Eroglu vd. 2010 yılında Erzurum ve Şanlıurfa illerindeki patates bitkilerinde, Özdemir ve Saygılı, 2012 yılında Bursa ve Çanakkale illerindeki domates üretim alanlarında ve Alp vd. 2016 yılında Van ili süs bahçelerindeki kadife çiçeği bitkilerinde 'Ca. P. solani' tespit etmişlerdir. Vellios ve Lioliopoulou, 2007 yılında Yunanistan'ın farklı bölgelerindeki domates tarlalarında

'*Ca. P. asteris*' ve '*Ca. P. solani*' tespit ettiklerini bildirmiş, Santos-Cervantes vd. 2008 yılında Meksika'daki biber ve domates bitkilerinde '*Ca. P. asteris*' tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Singh vd. 2012 yılında Hindistan'nın batı Uttar Pradesh'in Meerut bölgesinde domates bitkilerinde '*Ca. P. aurantifolia*' tespit etmişlerdir. Zamora vd. 2014 yılında Küba'nın San José bölgesindeki domates tarlalarında '*Ca. P. asteris*' tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Usta vd. 2017 yılında Van ilinde hıyar bitkilerinde ve Usta vd. 2018 yılında yine aynı ildeki domates bitkilerinde '*Ca. P. solani*' ve '*Ca. P. trifolii*' etmenlerinin saptandığını belirtmişlerdir. Khalil vd. 2019 yılında Suriye'nin Humus eyaletindeki domates bitkilerinde '*Ca. P. trifolii*' etmeni bulmuşlardır.

Çizelge 4.1. Diyarbakır ilinde sürveyler sonucu alınan örneklerde tespit edilen fitoplazma sayısı, bulunma oranları ve tespit edilen ilçeler

Sürvey yapılan ilçeler	Örnek sayıları	Tespit edilen fitoplazma sayısı, oranı ve türleri			
		EBS	BO	' <i>Ca. P. trifolii</i> '	' <i>Ca. P. solani</i> '
Bismil	16	-	-	-	-
Çermik	21	2	%9.5	2	-
Çınar	17	1	%5.9	1	-
Çüngüş	13	-	-	-	-
Dicle	21	-	-	-	-
Eğil	10	-	-	-	-
Ergani	91	3	%3.3	2	1
Hazro	5	-	-	-	-
Hani	1	-	-	-	-
Kayapınar	11	1	%9	1	-
Kulp	23	-	-	-	-
Lice	25	-	-	-	-
Sur	9	-	-	-	-
Yenişehir	15	-	-	-	-
TOPLAM	278	7	%2.5	6	1

Moleküler testler sonucunda fitoplazma etmeninin tespit edildiği bazı bitkilerde gözlemlenen sararma, yaprakta deformasyonu ve içeri doğru kıvrılma gibi belirtilere ait resimler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4.9. '*Ca. P. trifolii*' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü



Şekil 4.10. '*Ca. P. trifolii*' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü



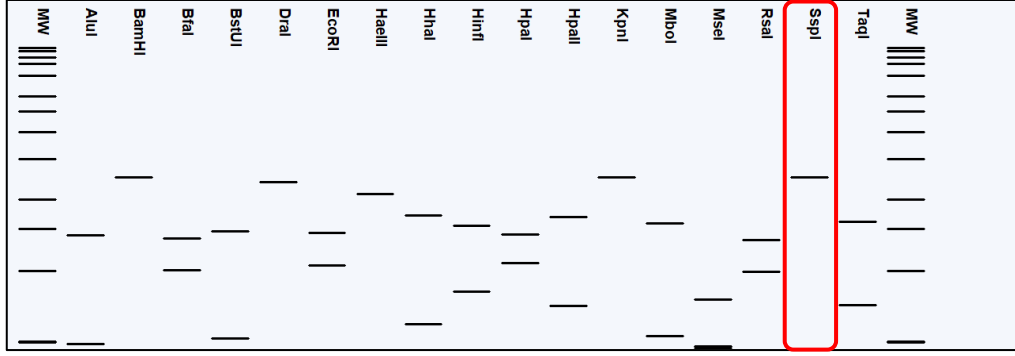
Şekil 4.11. '*Ca. P. solani*' ile enfekteli domates bitkisi görüntüsü

4.2.2. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının benzerlik katsayıları ve sanal RFLP analizi

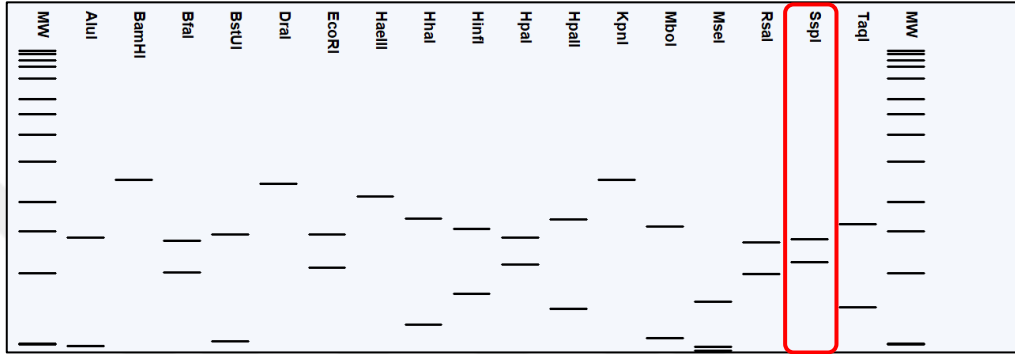
Pozitif bulunan 7 örneğin 16S rDNA dizi analizleri iki farklı firmaya dört kez yaptırılmasına karşın, sadece DFT29 ve DFT132 izolatlarına ait numunelerden beklenen boyutta nükleotid dizileri elde edilebilmiştir. Bu iki izolatın 16S rDNA nükleotid dizileri web temelli iPhyClassifier programı ile analiz edilerek etmenlerin fitoplazma türleri ve bağlı oldukları grup ile alt grupları tespit edilmiştir. Aynı program ile Gen Bankasındaki referans izolat (Ulaşım no: AY390261) dizisi kullanılarak her iki izolata ait RFLP benzerlik katsayıları oluşturulmuştur. Bu analizde DFT29 ve DFT132 izolatu '*Ca. P. trifolii*' olarak tespit edildiğinden, bu izolatlara ait 16S rDNA dizilerine ait sanal RFLP modeli, aynı türün referans izolatu ile karşılaştırılmış ve DFT29 izolatının benzerlik katsayısının 1.00 olduğu tespit edilmiştir. iPhyClassifier ile yürütülen analizde DFT29 nolu fitoplazma izolatlarının 16SrVI fitoplazma grubu ve A alt grubunun birer üyesi olduğu belirlenmiştir. DFT132 izolatına ait 16S rDNA dizisinin benzerlik katsayısı ise 0.97 olarak tespit edilmiştir. Bu izolatın 16SrVI içinde bir varyant yada yeni bir alt grup üyesi olabileceği belirlenmiştir.

On yedi farklı kesim enzimi (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI (ThaI)*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfl*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI (MboI)*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* ve *TaqI*) kullanılarak DFT29 izolatının 16S rDNA dizisine ait sanal RFLP profili oluşturulduğunda referans izolat ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte DFT132'nin sanal RFLP profili referans izolat ile karşılaştırıldığında büyük oranda benzerlik gösterirken sadece *SspI* kesim enzimi ile kesimde farklılık tespit edilmiştir (Şekil 4.12). *SspI* kesim enzimi ile kesimde referans izolatta 1 bant gözlenirken DFT132 nolu izolatta 2 bant olduğu gözlenmiştir.

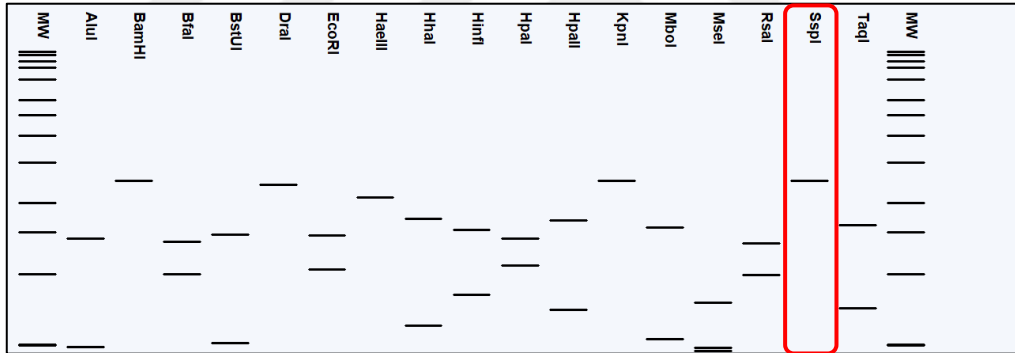
Candidatus Phytoplasma trifolii DFT29 nolu izolat (Ulaşım no: MT434684)



Candidatus Phytoplasma trifolii DFT132 nolu izolat (Ulaşım no: MT434685)



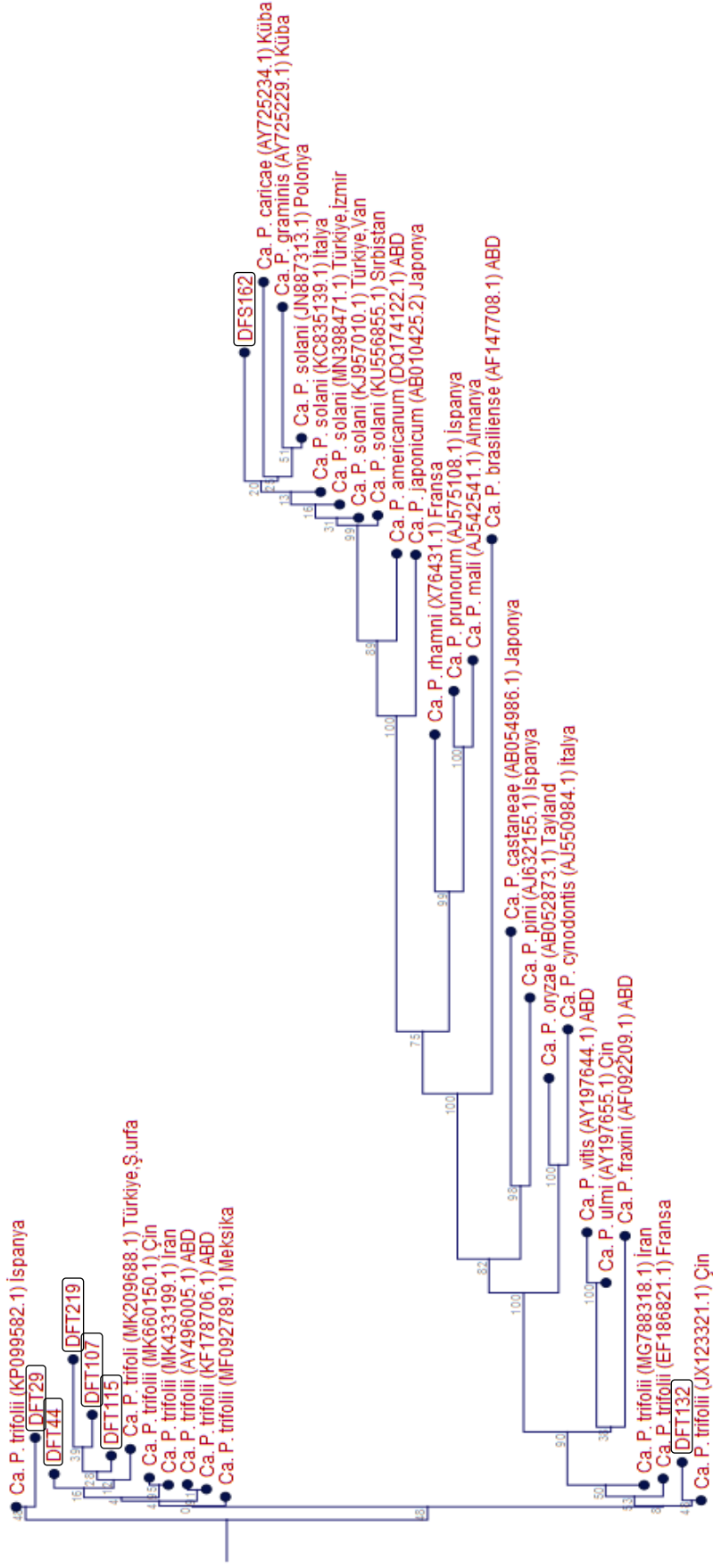
Candidatus Phytoplasma trifolii referans izolat (Ulaşım no: AY390261)



Şekil 4.12. DFT29 ve DFT132 izolatlarının pDRAW32 yazılımı kullanılarak sanal %1’li agaroz jelde sanal RFLP profillerinin oluşturulması. *SspI* kesim enzimi ile oluşan profillerdeki farklılık kutu içine alınmıştır. MW: 1kb Promega boyutunda marker.

4.2.3. Tespit edilen fitoplazma izolatlarının çoklu dizi karşılaştırması ve filogenetik analizi

Domates bitkisinde tespit edilen 7 pozitif örneğe ait 16S rDNA dizileri NCBI web tabanlı veri bankasından BLAST analizleri gerçekleştirilmiştir. Altı ‘*Ca. P. trifolii*’ izolatı (DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132, DFT219) ve bir ‘*Ca. P. solani*’ izolatı (DFS162) isimlendirilmiştir



Şekil 4.13. 'Candidatus Phytoplasma trifolii' izolatları (DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132, DFT219) ve 'Candidatus Phytoplasma solani' izolatu (DFS162)'nin dünyada tespit edilmiş diğer fitoplazma izolatları ile CLC Main Workbench 20.0.3 programı aracılığıyla moleküler benzerliğini gösteren 1000 tekrerrülü olarak oluşturulmuş filogenetik ağaç

Filogenetik ağaç CLC Main Workbench 20.0.3 programı yardımı ile yapılmıştır. İzolatlar arasındaki nükleotit benzerlikler ve farklılıklar ağaçta dallanmalara neden olmuştur. Fitoplazma izolatlarının dizisi bugüne kadar gen bankasından yayımlanmış diğer fitoplazma izolatları ile karşılaştırıldığında farklı oranlarda benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

'*Ca. P. trifolii*' olarak tespit edilmiş izolatlar ile dünyadaki bazı '*Ca. P. trifolii*' izolatları arasında yapılan karşılaştırmada en az benzerlik gösteren izolat %98.9 benzerlik oranıyla (JX123321.1 ulaşım numaralı Çin izolatı) DFT29 izolatı, en fazla benzerlik gösteren izolat ise %99.8 (MK433199.1 ulaşım numaralı İran izolatı) benzerlik oranıyla DFT44 izolatı olmuştur ve oluşturulan filogenetik ağaçta bu izolatlarla gruplanmışlardır. '*Ca. P. solani*' olarak tespit edilmiş DFS162 izolatı ise dünyadaki bazı '*Ca. P. solani*' izolatları ile yapılan karşılaştırmada en fazla benzerliği %99.7 benzerlik oranıyla MN398471.1 ulaşım numaralı Türkiye (İzmir) izolatı olmuştur ve oluşturulan filogenetik ağaçta bu izolat ile gruplanmıştır. Filogenetik ağaçta ve nükleotit karşılaştırmasında kullanılan fitoplazma izolatları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

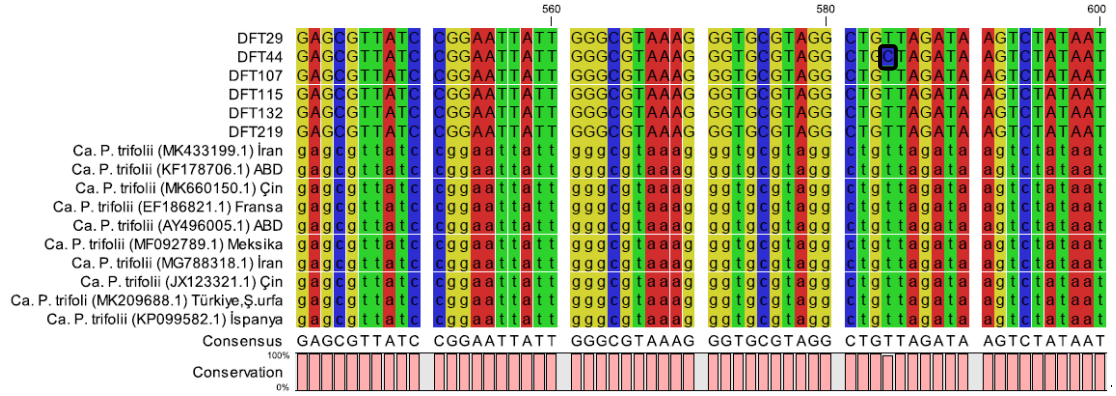
Çizelge 4.2. Filogenetik ağaçta ve nükleotit karşılaştırmasında kullanılan Gen Bankasında kayıtlı fitoplazma izolatlarına ait ulaşım numarası, ülke ve baz uzunluğu bilgileri

Sayı	Ulaşım Numarası	Ülke	Baz uzunluğu (bp)
1	MF092789.1	Meksika	1415
2	JX123321.1	Çin	1250
3	MK660150.1	Çin	1810
4	MG788318.1	İran	1250
5	KC835139.1	İtalya	1244
6	MN398471.1	Türkiye (İzmir)	1244
7	KU556855.1	Sırbistan	1169
8	KJ957010.1	Türkiye (Van)	1244
9	JN887313.1	Polonya	1648
10	MK433199.1	İran	1707
11	EF186821.1	Fransa	1532
12	KF178706.1	ABD	1705
13	MK209688.1	Türkiye (Ş.urfa)	1195

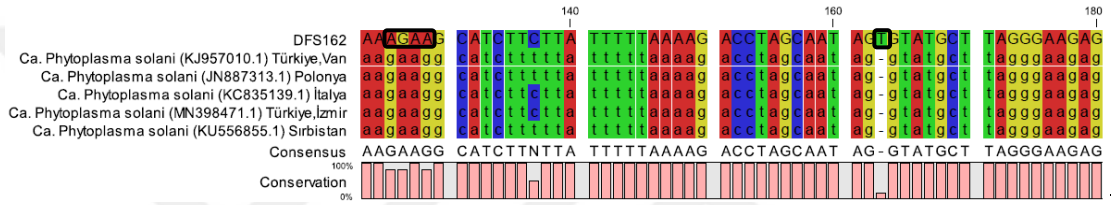
(Çizelge 4.2.'nin devamı)

14	AY496005.1	ABD	1504
15	KP099582.1	İspanya	1114
16	AY197655.1	Çin	1527
17	AF092209.1	ABD	1722
18	AB052873.1	Tayland	1360
19	AJ550984.1	İtalya	1780
20	AB054986.1	Japonya	1522
21	AJ632155.1	İspanya	1811
22	AF147708.1	ABD	1808
23	AJ542541.1	Almanya	1784
24	X76431.1	Fransa	1473
25	AB010425.2	Japonya	1521
26	DQ174122.1	ABD	1503
27	AY725229.1	Küba	1521
28	AY725234.1	Küba	1516
29	AY197644.1	ABD	1527
30	AJ575108.1	İspanya	1556

Tespit edilen fitoplazma izolatlarına ait nükleotitlerin dünyadaki bazı fitoplazma izolatları ile karşılaştırılması CLC Main Workbench 20.0.3 programı ile gerçekleştirilmiştir. Bu karşılaştırma ile DFT29 izolatında 8 nükleotitte yer değiştirme mutasyonu, 3 nükleotitte ekleme mutasyonu ve 3 nükleotitte ise silme mutasyonu olduğu gözlenmiştir. DFT44 izolatında 1, DFT107 izolatında 3, DFT115 izolatında 2 ve DFT219 izolatında ise 7 nükleotitte yer değiştirme mutasyonu olduğu gözlenmiştir. DFT132 izolatında ise 2 nükleotit ekleme ve 2 nükleotit silme mutasyonuna uğramışken 3 nükleotidinde yer değiştirme mutasyonu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14). DFS162 izolatının 3 nükleotidinde yer değiştirme mutasyonu ve 1 nükleotitte ekleme mutasyonu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15). Oksal vd. 2017, Malatya ilinde yaptıkları çalışmada biberde buldukları '*Ca. P. trifolii*' etmeninin iki farklı izolatından birini diğerinden 8 nükleotit daha uzun olduğunu bildirmişlerdir. Quaglino vd. 2013, yaptıkları çalışmada '*Ca. P. solani*' izolatları arasında 1 nükleotitte değişim olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.14. Domates bitkisinde tespit edilen *Candidatus* *Phytoplasma trifolii* izolatları(DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132, DFT219)’nın CLC Main Workbench 20.0.3 programı yardımı ile yapılmış çoklu nükleotit dizi karşılaştırması



Şekil 4.15. Domates bitkisinde tespit edilen *Candidatus* *Phytoplasma solani* izolatı(DFS162)’nın CLC Main Workbench 20.0.3 programı yardımı ile yapılmış çoklu nükleotit dizi karşılaştırması

4.2.4. 16S rDNA dizilerinin gen bankasına girilmesi

Domates bitkisinde tespit edilen altı ‘*Ca. P. trifolii*’ izolatı DFT29, DFT44, DFT107, DFT115, DFT132 ve DFT219 (Gen bankası Ulaşım No. MT434684, MT434685, MT438464, MT438465, MT438466, MT438467) ve bir ‘*Ca. P. solani*’ izolatı DFS162 (Gen bankası Ulaşım No. MT437042) Gen Bankasına kayıtları gerçekleştirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyarbakır ili domates alanlarındaki fitoplazma hastalıklarının belirlenmesini hedefleyen bu çalışma ile 2018 yılında Diyarbakır iline bağlı 17 ilçenin 14'ünde toplam 278 adet domates yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler R16mF2/R16mR1 ve R16F2n/R16R2 üniversal primerlerin kullanıldığı Nested qPCR yöntemiyle test edilmiştir. Nested qPCR yöntemi ile testlenen 278 domates yaprak örneğinden 7 (%2.5)'sinin fitoplazma ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Fitoplazma izolatlarını karakterize etmek için, 1.250 bp'lik Nested qPCR amplifikasyon ürününe ait 16S rDNA dizisinin iPhyClassifier yazılımı, BLAST ve sanal RFLP analizleri yapılmıştır. iPhyClassifier yazılımı, BLAST ve sanal RFLP analizleri sonucunda pozitif bulunan 7 domates örneğinin 1'i '*Ca. P. solani*' ile 6'sının '*Ca. P. trifolii*' ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile '*Ca. P. solani*' ve '*Ca. P. trifolii*' Diyarbakır ili domates alanlarında ilk defa rapor edilmiştir. DFT29 izolatına ait 16S rDNA dizisinden oluşturulan sanal RFLP modeli, önceden tespit edilmiş olan 16SrVI-A alt grubunun referans modeli ile benzerlik katsayısı 1.00 çıkmıştır. DFT29 fitoplazma izolatı 16SrVI-A'nın fitoplazma alt grubunun bir üyesi olduğu belirlenmiştir. DFT132 izolatına ait 16S rDNA dizisinden oluşturulan sanal RFLP modeli, önceden tespit edilmiş tüm 16Sr gruplarının/alt gruplarının referans modellerinden farklı çıkmıştır. En çok benzediği grup ise 16SrVI-A alt grubunun referans modeli ile 0.97 benzerlik katsayısına sahip bulunmuştur. Bu strain kesim enzimi *SspI*, referans izolatı ile önemli farklılıklar sergilemiş ve 16SrVI grubu içinde yeni bir alt grubu temsil edebileceği belirlenmiştir.

Tespit edilen '*Ca. P. trifolii*' (Gen bankası Ulaşım No. MT434684, MT434685, MT438464, MT438465, MT438466, MT438467) ve '*Ca. P. solani*' (Gen bankası Ulaşım No. MT437042) Gen Bankasına kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Nested qPCR yöntemi ile testlenen örneklerden fitoplazma bulaşıklık oranının en yüksek bulunduğu ilçe %9.5 bulaşıklık oranı ile Çermik olurken, onu %9 bulaşıklık oranı ile Kayapınar, %5.9 bulaşıklık oranı ile Çınar ve %3.3 bulaşıklık oranıyla Ergani takip etmiştir. Bismil, Çüngüş, Dicle, Eğil, Lice, Hazro, Hani, Kulp, Sur ve Yenişehir ilçelerinden alınan domates örneklerinde fitoplazma tespit edilmemiştir.

'*Ca. P. trifolii*' olarak tespit edilmiş izolatlar ile dünyadaki bazı '*Ca. P. trifolii*' izolatları arasında yapılan karşılaştırmada en az benzerlik gösteren izolat %98.9

benzerlik oranıyla (JX123321.1 ulaşım numaralı Çin izolatu) DFT29 izolatu, en fazla benzerlik gösteren izolat ise %99.8 (MK433199.1 ulaşım numaralı İnan izolatu) benzerlik oranıyla DFT44 izolatu olmuştur ve oluşturulan filogenetik ağaçta bu izolatlarla gruplanmışlardır. 'Ca. P. solani' olarak tespit edilmiş DFS162 izolatu ise dünyadaki bazı 'Ca. P. solani' izolatları ile yapılan karşılaştırmada en fazla benzerliği %99.7 benzerlik oranıyla MN398471.1 ulaşım numaralı Türkiye (İzmir) izolatu olmuştur ve oluşturulan filogenetik ağaçta bu izolat ile gruplanmıştır.

Tespit edilen fitoplazma izolatlarının nükleotitlerinin dünyadaki bazı fitoplazma izolatları ile yapılan karşılaştırmasında DFT29 izolatında 8 nükleotitte yer değiştirme mutasyonu, 3 nükleotitte ekleme mutasyonu ve 3 nükleotitte ise silme mutasyonu olduğu gözlenmiştir. DFT44 izolatında 1, DFT107 izolatında 3, DFT115 izolatında 2 ve DFT219 izolatında ise 7 nükleotitte yer değiştirme mutasyonu olduğu gözlenmiştir. DFT132 izolatında ise 2 nükleotit ekleme ve 2 nükleotit silme mutasyonuna uğramışken 3 nükleotidinde yer değiştirme mutasyonu olduğu gözlenmiştir. DFS162 izolatının 3 nükleotidinde yer değiştirme mutasyonu ve 1 nükleotitte ekleme mutasyonu olduğu belirlenmiştir.

Fitoplazma hastalıkları dünyada ve ülkemizde birçok kültür bitkisinde ekonomik boyutlarda kayıplara neden olmakta bu nedenle fitoplazma kaynaklı hastalıkların listesi gün geçtikçe büyümeye devam etmektedir. Fitoplazmaların yayılmasında enfekteli bitki materyali ile yapılan aşılama büyük önem taşımaktadır (Marwitz vd. 1974; Heintz, 1986; Seemüller, 1990). Bu nedenle çok yıllık bitkilerde aşılama kullanılacak olan bitki materyallerinin fitoplazmalardan ari olması, taşınma ve yayılmanın engellenmesi açısından önemlidir. En önemli yayılma yollarından biri de vektörlerdir. Fitoplazmalar Cicadellidae, Fulgoridae, ve Psyllidae familyasına ait böcek türleri ile taşınabilmektedirler (Lee vd. 2000; Bertaccini, 2007; Weintraub vd. 2006). Sürekli olarak bitki ve böcekler arasındaki geçişleri sayesinde canlılıklarını ve yayılışlarını sürdürebilmektedirler (Hogenhout vd. 2008). Bu vektör böceklerin özellikle kışlayan erginleri fitoplazmaların taşınmasında etkin rol oynadıkları belirtilmiştir (Tedeschi ve Alma, 2004). Vektör böcekler tarafından yayılmasının engellenmesi için kışlaklar ve ara konukçuların ortadan kaldırılması ve insektisitler kullanılarak mücadele edilmesi gerekmektedir. Bu mücadelenin yürütülmesi için çalışmanın yapıldığı alandaki fitoplazma vektörü böceklerin belirlenmesi kapsamlı bir çalışma ile ortaya konulması gerekmektedir.

Yapılan bu çalışma ile söz konusu fitoplazmaların örnek sayısı dikkate alındığında henüz düşük düzeyde olduğu değerlendirilebilir. Fakat bulaşmanın engellenmesi konusunda gerekli önlemler alınmadığı takdirde söz konusu fitoplazma enfeksiyonları gelecekte önemli sorunlara neden olabilecektir. Özellikle fitoplazma ara konukçuları arasında yer alan tarla içinde ve kenarında yetişen yabancı otlarla mücadele, fitoplazma etmenlerine karşı testlenmiş sertifikalı fide, fidan, aşı materyali ve tohum kullanımı, etmenin vektörü olan böcekler ile mücadele ve üreticilerin fitoplazma hastalığının yayılma yolları ve belirtilerine karşı bilgilendirilmesi bu hastalıklarla mücadele açısından son derece önemlidir.



6. KAYNAKLAR

- Alar, Y. (2019). Diyarbakır ilinde biber üretim alanlarında bulunan fitoplazmaların moleküler yöntemlerle saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 33p
- Alp, Ş., Usta, M., Sipahioğlu, H. M., Güller, A. (2016). First report of *Candidatus Phytoplasma solani* on a new host marigold (*Tagetes erecta* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(3), 311-318.
- Anonim, (2020a). Dünya Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (Erişim tarihi: 15/02/2020).
- Anonim, (2020b). Dünya Bitkisel Üretim İstatistikleri <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (Erişim tarihi: 15/02/2020).
- Anonim, (2020c). Türkiye Bitkisel Üretim İstatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (Erişim tarihi: 15/02/2020).
- Anonim, (2020d). Türkiye Bitkisel Üretim İstatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. (Erişim tarihi: 15/02/2020).
- Anonim, (2020e). <https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2013/01/WVDL.Info.PCR.Ct.Values1.pdf> (Erişim tarihi: 07/05/2020).
- Bayraktar, K. (1973). Sebze Yetiştirme. pp. 169-276. Cilt. I (Sebzeçiliğe Ait Temel Bilgiler). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova.
- Bertaccini A, Davis RE, Lee I-M (1992) In vitro micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected plant tissues. *Horticultural Science*, 27, 1041–1043.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front Biosci.* 12(2), 673-689.
- Bertaccini, A., Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia mediterranea*, 48(3), 355-378.
- Bora, T. ve Karaca, G. (1970). Bitki Hastalıkları Surveyi, Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı*, Yayın No: 167, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova.
- Canik, D., (2007). Isparta, Yalova, Ankara illeri ve çevresinde elma ve armut bahçelerinde sorun olan fitoplazma enfeksiyonlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 81p.
- Catal, M., Ikten, C., Yol, E., Üstün, R., Uzun, B. (2013). First report of a 16SrIX group (pigeon pea witches'-broom) phytoplasma associated with sesame phyllody in Turkey. *Plant disease*, 97(6), 835-835.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H. M., Windsor, G.D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 51 (3): 607–617.
- Clark, M. F., Morton, A., Buss, S. L. (1989). Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO- associated antigens. *Annals of Applied Biology*, 114(1), 111-124.

- Çaglayan, K., Gazel, M., Küçükgöl, C., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Bertaccini, A. (2013). First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris'(group 16SrI-B) infecting sweet cherries in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 95(4, Supplement).
- Çarpar, H., Sertkaya, G. (2015). Situation of phytoplasma diseases in East Mediterranean Region, Turkey. *Ziraat Fakültesi Dergisi, Mustafa Kemal Üniversitesi*, 20(2), 76-82.
- Davis, R. E., Sinclair, W. A. (1998). Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88(12), 1372-1376.
- Del Serrone, P., Marzachi, C., Bragaloni, M., Galeffi, P. (2001). Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(2), 137-142.
- Díez, M. J., Nuez, F. (2008). Tomato. pp. 249-323. In: Jaime Prohens, Fernando Nuezin (Ed.), *Vegetables II*. Springer, New York, NY.
- Doi, Y. O. J. I., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (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(4): 259-266.
- Dong, J. H., Zhang, L., Li, W. H., McBeath, J. H., Zhang, Z. K. (2013). 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' related strain associated with tomato yellows disease in China. *Journal of General Plant Pathology*, 79(5), 366-369.
- Eroglu, S., Ozbek, H., Sahin, F. (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(11), 1374-1374.
- Ertunc, F., Orel, D. C., Bayram, S., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Topkaya, S., Soylemezoglu, G. (2015). Occurrence and identification of grapevine phytoplasmas in main viticultural regions of Turkey. *Phytoparasitica*, 43(3), 303-310.
- Günay, A. (1992). Özel Sebze Yetiştiriciliği. pp. 81-91. In: Atilla Günay (Ed.). Cilt 4. Çağ Matbaası, Ankara. 531p
- Günay, A. (2005). Özel Sebze Yetiştiriciliği II. pp. 318-343. In: Atilla Günay (Ed.). Domates yetiştiriciliği, Meta basımevi, İzmir. 530p
- Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5), 763-767.
- Heintz, W. (1986). *Cuscuta odorata*: An effective vektor for MLO. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 38, 138-141.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular plant pathology*, 9(4), 403-423.
- Holguín-Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R. C., Martínez-Soriano, J. P. (2007). First report of a 16SrI-B group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting tomato plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, 91(3), 328-328.
- Jiang, H., Wei, W., Saiki, T., Kawakita, H., Watanabe, K., Sato, M. (2004). Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive

- organs, winter buds, and roots of mulberry trees. *Journal of General Plant Pathology*, 70(3), 168-173.
- Kabelka, E., Yang, W., Francis, D. M. (2004). Improved tomato fruit color within an inbred backcross line derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* involves the interaction of loci. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(2), 250-257.
- Kaçar, M., (2018). Diyarbakır ili mısır üretim alanlarında görülen fitoplazma hastalıklarının moleküler yöntemler ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 42p.
- Khalil, H., Yousef, R. N., Girsova, N. V., Bogoutdinov, D. Z., Kastalyeva, T. B., Aldenkawe, S. (2019). First Report of Tomato “Big Bud” Disease in Syria Caused by ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ Related Strain. *Plant disease*, 103(3), 578-578.
- Korkmazoğlu, G., (2018). Şanlıurfa ili peyzaj mimari alanlarında bulunan akasya ağaçlarında fitoplazma hastalığının moleküler yöntemlerle saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 39p.
- Lee, I. M., R.W. Hammond, R.E. Davis, D.E. Gundersen, (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*. 83, 834-842
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M., (1998a). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1153-1169.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertaccini, A. (1998b). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*. 88(12), 1359-1366.
- Lee, I. M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E., (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1), 221-255.
- Marwitz, R., Petzold, H., Kunze, L. (1974). Investigation on the transfer of possible causal agent of Apple Proliferation to a herbaceous host. *Phytopathologische Zeitschrift*. 81, 85-91.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowskyi, L.N., Cousin, M.T., Dale, De., Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Shina, R.H., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E., (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pp. 545–640. *In: The Mycoplasmas*. (Ed) Whitcomb, R.F., Tully, J.G. Academic Press, New York, United States of America
- Menon, K. P. V., Pandalai, K. M., (1960). The Coconut Palm, A Monograph. *Indian Central Coconut Committee, Ernakulam, India*. 133.
- Minoia, S., Petrozza, A., D'Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Carriero, F. (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by Tilling technology. *BMC research notes*, 3(1), 69.
- Nečas, T., Mašková, V., Krška, B. (2008). The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. *Acta Horticulturae*. 781, 443-448.

- Nipah, J. O., Jones, P., Hodgetts, J., Dickinson, M. (2007). Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology*. 60(2), 385.
- Okuda, S., (1972). Occurrence of diseases caused by mycoplasma-like organisms in Japan. *PlantProt*. 26, 180-183
- Oksal, H. D., Apak, F. K., Oksal, E., Tursun, N., Sipahioglu, H. M. (2017). Detection and molecular characterization of two 'Candidatus Phytoplasma trifolii' isolates infecting peppers at the same ecological niche. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(6), 1372-1378.
- Olivier, C. Y., Séguin-Swartz, G., Hegedus, D., Barasubiye, T. (2006). First report of "Candidatus Phytoplasma asteris" related strains in Brassica rapa in Saskatchewan, Canada. *Plant Disease*. 90(6), 832-832.
- Olivier, C. Y., Galka, B., Séguin-Swartz, G. (2010). Detection of aster yellows phytoplasma DNA in seed and seedlings of canola (*Brassica napus* and *B. rapa*) and AY strain identification. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 32(3), 298-305.
- Özdemir, N., Saygili, H., Sahin, F., Karsavuran, Y., Bayrak, O. F., Oral, B., (2007). Host range and genetic characterization of a phytoplasma causing tomato stolbur disease in Turkey (pp. 255-262). *II International Symposium on Tomato Diseases*, October 8, 2007, Kuşadası (Turkey).
- Özdemir, N., Saygili, H. (2012). Batı Anadolu Bölgesi domates üretim alanlarında görülen stolbur hastalığının tohumla taşınıp taşınmadığı ile ilgili bir araştırma. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 26(1), 63-72.
- Petro- Turza, M., (1986). Flavor of tomato and tomato products. *Food Reviews International*. 2(3), 309-351.
- Raiola, A., Dominiotto, A., Varaldo, R., Ghiso, A., Galaverna, F., Bramanti, S., Santoro, A., (2014). Unmanipulated haploidentical BMT following non-myeloablative conditioning and post-transplantation CY for advanced Hodgkin's lymphoma. *Bone marrow transplantation*. 49(2), 190-194.
- Razdan, M. K., (2006). Genetic improvement of solanaceous crops volume 2: tomato. pp. 524-637. *In: M.K., Razdan, A.K., Mattoo (Ed.). Experimental Agriculture*. Enfield, N. H., USA.
- Santos-Cervantes, M. E., Chávez-Medina, J. A., Mendez-Lozano, J., Leyva-Lopez, N. E., (2008). Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*. 92(7), 1007-1011.
- Sarı, K., (2015). Hatay ili nar alanlarında olası fitoplazma hastalıklarının moleküler yöntemlerle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 37p.
- Seemüller, E., (1990). Apple Proliferation. Compendium of Apple and Pear Diseases. *American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, USA. 67-68
- Seemüller E, Carraro L, Jarausch W., (2011) Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits: Apple proliferation phytoplasma. pp 67–75. *In: Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann W (Ed.)*, APS Press, St. Paul, MN.

- Sertkaya, G., Martini, M., Osler, R. (2008). First report of *Candidatus* phytoplasma mali in Turkey. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 26, 421-428.
- Singh, J., Rani, A., Kumar, P., Baranwal, V. K., Saroj, P. L., Sirohi, A., (2012). First report of a 16SrII-D Phytoplasma '*Candidatus* Phytoplasma australasia' associated with a tomato disease in India. *New Disease Reports*. 14.
- Spaldon, E., (1958). Stolbur and similar virus diseases causing seedlessness of plants. (pp. 25-33). In. E. Spaldon, C. Blattny, and V. Bojnansky, (Ed.) Proc. Conf. On Stolbur, Smolenice, Slovak Acad. Publishing House. Bratislava.
- Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., Hogenhout, S. A., (2011). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual review of Phytopathology*. 49, 175-195.
- Tedeschi, R., Alma, A., (2004). Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of economic entomology*. 97(1), 8-13.
- Usta, M., Güller, A., Sipahioğlu, H. M., (2017) Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Bitkisinde Aynı Simptomatolojiye Sahip İki Farklı Fitoplazma etmeninin 16S rDNA'sının RFLP ve Nükleotid Dizi Analizleri ile Teşhisi ve Karakterizasyonu. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 27(3), 299-308.
- Usta, M., Güller, A., Sipahioğlu, H. M., (2018). Molecular Analysis of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' and '*Candidatus* Phytoplasma solani' Associated with Phytoplasma Diseases of Tomato (PDT) in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*. 20, 1991-1996.
- Vellios, E., Lioliopoulou, F., (2007). Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology*. 60(2), 157.
- Yazgan, A., Fidan, S., (1996). Tokat koşullarına uygun kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *cerasiforme*) çeşitlerinin belirlenmesi (pp. 19- 23). *GAP I. Sebze Tarımı Sempozyumu*, 7-10 Mayıs, Şanlıurfa.
- Zamora, L., Acosta, K., Pinol, B., Quinones, M., Bertaccini, A., (2014). First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris (16SrI group) causing stunt of tomato in Cuba. *New Disease Reports*. 30, 10-10.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, M., Shao, J., Suo, X., Davis, R. E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(Pt 10), 2582.
- Weintraub, P. G., Beanland, L., (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 91-111.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W., Davis, R. E. (2013). '*Candidatus* Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur-and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(8), 2879-289

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Songül ARAZ YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Mardin/Ömerli-07.11.1987

Adres: Kooperatif Mah. Cahit Sıtkı Tarancı Sok. Gelecek apt. kat:2 no:7
Yenişehir/Diyarbakır

E-Posta: araz_sngl@hotmail.com

Lisans (Mezun olduğu Fakülte, Bölüm ve Yıl): Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki koruma bölümü, 2012

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

- Turkcell TİM satış danışmanı (2006-2008)
- Reform tarımsal danışmanlık, Ziraat mühendisi (2013-2014)
- TEB-Türk Ekonomi Bankası, Tarım bankacılığı portföy yönetimi, Tarım müşteri ilişkileri yetkilisi (2014-2017)
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Sason İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Ziraat mühendisi, (2020-Aktif olarak çalışmakta)