



**SALKIM SÖĞÜTTE (*Salix babylonica* Linn.)  
HASTALIĞA NEDEN OLAN  
FİTOPLAZMANIN PCR İLE TANILANMASI**

**Zohaib Ul HASSAN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Bitki Koruma Anabilim Dalı  
Fitopatoloji Bilim Dalı  
Prof. Dr. Hidayet BOSTAN  
2018  
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SALKIM SÖĞÜTTE (*Salix babylonica* Linn.) HASTALIĞA NEDEN  
OLAN FİTOPLAZMANIN PCR İLE TANILANMASI

Zohaib UI HASSAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
Fitopatoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2018

Her Hakkı Saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

SALKIM SÖĞÜTTE (*Salix babylonica* Linn.) HASTALIĞA NEDEN OLAN  
FİTOPLAZMANIN PCR İLE TANILANMASI

Prof. Dr. Hidayet BOSTAN danışmanlığında, Zohaib UI HASSAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 27.06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı – Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği / oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şaban KORDALI

İmza :

Üye : Doç.Dr. Ş. Evrim ARICI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05./07./2018 tarih ve 27./.../20..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Mehmet KARAKAN  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### SALKIM SÖĞÜTTE (*Salix babylonica*) HASTALIĞA NEDEN OLAN FİTOPLAZMANIN PCR İLE TANILANMASI

Zohaib Ul HASSAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı  
Fitopatoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

Erzurum, Erzincan, Tokat, Amasya, Sivas, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar ve Trabzon illerinde park ve bahçelerdeki salkım söğütlerde (*Salix babylonica* Linn) cadısüpürgesi, top benzeri yapılar, kısmen ve tamamen kuruma şeklinde fitoplazmalara özgü belirtiler gözlemlenmiştir. Bu illerden toplam 23 ağaçtan örnek alınıp fitoplazmalara spesifik universal primer çifti (P1/P7) ve nested-PCR (F16F2n ve R16R2) ile testlendiğinde belirtilmeli ağaçlardan alınan örneklerin tamamından sırasıyla 1800 ve 1200 bp'lik PCR ürünleri elde edilmiştir. Bu çalışma ile hastalık etmeni fitoplazma Türkiye'nin farklı bölgelerinde yer alan illerde ilk defa tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu illerde yapılan gözlemlerde salkım söğüt dışında diğer söğüt türlerinde (*Salix* spp.), kavaklarda (*Populus* spp.), huş ağaçlarında (*Betula* spp.), akçaağaç (*Acer* spp.), karaağaç (*Ulmus* spp.), dişbudak (*Fraxinus* spp.), böğürtlen (*Rubus* spp.) ve şakayık (*Paeonia* spp.) bitkilerinde de fitoplazmalara özgü belirtiler gözlemlenmiştir.

**2018, 51 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Salix babylonica*, Fitoplazma, Nested-PCR

## ABSTRACT

Post Graduate Thesis

### CHARACTERIZATION OF PHYTOPLASMA DISEASE ON THE WILLOW (*Salix babylonica*) WITH PCR

Zohaib Ul HASSAN

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

It was observed some symptoms on willow (*Salix babylonica* Linn.), peculiar to phytoplasma such as witches-broom, early yellowing and partial or complete drying, in the parks and gardens of Erzurum, Erzincan, Tokat, Amasya, Sivas, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar and Trabzon. To determine the agent causing these symptoms, a total of 23 trees were sampled from these places and tested with phytoplasma-specific universal primer pair (P1 / P7) and nested-PCR primer pair (F16F2n and R16R2). PCR products of 1800 and 1200 bp were obtained from all the samples taken from symptomatic trees, respectively. This study shows the presence of this pathogen in different regions of Turkey, that have been identified for the first time. In addition to these findings, the phytoplasma-specific symptoms were also observed on other willow species (*Salix* spp.) as well as, on other plants including; poplar (*Populus* spp.), birch trees (*Betula* spp.), maple (*Acer* spp.), elm (*Ulmus* spp.), ash (*Fraxinus* spp.), blackberry (*Rubus* spp.), and peony (*Paeonia* spp.).

**2018, 51 pages**

**Keywords:** *Salix babylonica*, Phytoplasma, Nested-PCR

## TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, tez konumu belirleyen, Türkiye’de bulunduğum süre içerisinde çalışmalarım dahil her konuda desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Hidayet BOSTAN (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanı); Laboratuar çalışmalarında yardımcı olan değerli arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Aiperi MURATBEKOVA (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü), Sayın Dr. Arash Hossein POUR (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü), Mustafa Özkan BALTACI (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) ve bitkilerin tanısını yapan Sayın Prof. Dr. Fariz KARHAN’a’ (Atatürk Üniversitesi, Mimarlık ve Tasarım Fakültesi, Pyzaj Mimarlığı Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkür derim.

**Zohaib UI HASSAN**

**Haziran, 2018**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>8</b>
2.1. Türkiye’de Fitoplazma ile İlgili Yapılmış Çalışmaları.....	15
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>21</b>
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Çalışmalarda kullanılan bitki materyali.....	21
3.1.2. Yararlanılan cihazlar.....	22
3.1.3. Yararlanılan sarf malzemeleri.....	23
3.2. Ekstraksiyonda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı.....	24
3.2.1. CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide).....	24
3.2.2. PCR Çalışmalarında Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanışları.....	25
3.2.3. 5 mM dNTP.....	26
3.2.4. Primerler.....	26
3.3. Elektroforez Aşamasında Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanışı.....	26
3.3.1. DNA’nın Kalitesi ve Miktarının Tayini.....	28
3.4. PCR Çalışmaları.....	29
3.4.1. Direkt-PCR.....	29
3.4.2. Nested-PCR.....	30
3.4.4. Elektroforez Çalışmaları.....	31
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>33</b>
<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	52

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

<	küçük
>	büyük
°C	santigrat derece
µl	mikrolitre
bç	baz çifti
cm	santimetre
dk	dakika
g	gram
Gbç	giga baz çift
ha	hektar
kb	kilobase pair (kilobaz çifti=kbç=1000 bç)
kg	kilogram
m	metre
M	molar
Mbç	mega baz çift
mg	miligram
MgCl <sub>2</sub>	magnezyum klorür
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
n	döngü sayısı
ng	nanogram
pmol	piko mol
rpm	revolutions per minute (dakikada devir)
sn	saniye
Taq	taq polymerase (Thermus aquaticus'dan izole edilen enzim)
V	volt

v/v	hacim / hacim
w/v	ağırlık / hacim
µg	mikrogram

### Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluk Polimorfizmi)
CH <sub>3</sub> COONH	Amonyum Asetat
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksi-Nükleotit Trifosfat
EDTA	Disodyum etilenediaminetetra-asetat
EST	Expressed Sequence Tags (İfade edilen dizi etiketi)
FAO	Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
GMS	Genetic Male Sterility
He	Expected heterozygosity (Beklenen heterozigotluk)
NaAC	Sodyum Asetat
NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	Sodyum asetat trihidrat
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rasgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotit polimorfizmi)
STR	Short Tandem Repeats (Kısa bitişik tekrarlar)
TBE	Tris-Borat-EDTA bafırı

TE	Tris-EDTA tamponu
TRAP	Target Region Amplification Polymorfisim (Hedef bölge çoğaltım polimorfizmi)
Tris-HCl	Tris-hidroklörür



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Cadı süpürgesi simptomu gösteren salkım söğüt ( <i>Salix babylonica</i> ) .....	22
Şekil 3.2. Spektrofotometre cihazı (NanoDrop Technologies, USA).....	29
Şekil 3.3. PCR çalışmaları .....	31
Şekil 4.1. Etmenin salkım söğütlerin ( <i>Salix babylonica</i> ) taze sürgün ve yapraklarındaki simptomları .....	33
Şekil 4.2. Simptomlu salkım söğüt ağacı( <i>Salix babylonica</i> ) .....	34
Şekil 4.3. Salkım söğütlerde ( <i>Salix babylonica</i> ) cadı süpürgesi .....	35
Şekil 4.4. Salkım söğütlerde ( <i>Salix babylonica</i> ) küçük yaprak teşekkülü .....	35
Şekil 4.5. Direkt-PCR sonuçları: M: Marker, 1: İzolat 1, 2: İzolat 2, 3: İzolat 3, 4: İzolat 4, 5: İzolat 5, 6: Sağlıklı, 7: PCR control.....	36
Şekil 4.6. Farklı izolatlardan nested-PCR (F16F2n ve R16R2) ile elde edilen sonuçlar .....	37
Şekil 4.7. Direkt-PCR (P1 ve P7 ile) Marker, 2 Erzurum (Salkım Söğüt: <i>Salix babylonica</i> ), 3, Erzurum ( <i>Salix spp</i> ) Yapraklarında genel kızarıklık simptomu 4: Erzincan Salkım Söğüt, 5: Sivas söğüt, 6: Tokat söğüt, 7: Amasya Söğüt, 8: Ankara salkım söğüt, Eskişehir söğüt, Kütahya Söğüt, 9: Afyon söğüt, 10: Simptomsuz salkım söğüt, 11: Simptomsuz söğüt, 12: Negatif PCR kontrol .....	38
Şekil 4.8. Nested-PCR sonuçları: Marker, 2 Erzurum (Salkım Söğüt: <i>Salix babylonica</i> ), 3, Erzurum ( <i>Salix spp.</i> ) Yapraklarında genel kızarıklık simptomu 4: Erzincan Salkım Söğüt, 5: Sivas söğüt, 6: Tokat söğüt, 7: Amasya Söğüt, 8: Ankara salkım söğüt, Eskişehir söğüt, Kütahya Söğüt, 9: Afyon söğüt, 10: Simptomsuz salkım söğüt, 11: Simptomsuz söğüt, 12: Negatif PCR kontrol .....	38

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda belirlenen fitoplazmalar.....	16
<b>Çizelge 3.1.</b> Yararlanılan cihazlar ve markaları.....	22
<b>Çizelge 3.2.</b> Sarf malzemeleri ve markaları.....	23
<b>Çizelge 3.3.</b> PCR reaktifleri ve bir örnek için kullanılan miktarları.....	30
<b>Çizelge 3.4.</b> direkt-PCR döngü sıcaklıkları .....	30
<b>Çizelge 3.5.</b> Nested-PCR döngü sıcaklıkları.....	31
<b>Çizelge 4.1.</b> Farklı ağaçlarda gözlemlenen siptomlar ve iller.....	39

## 1. GİRİŞ

Hücre içi obligat patojen olan fitoplazmalar (genus ‘*Candidatus* Phytoplasma’) Mollicutes sınıfı içerisinde yer almaktadır (Bertaccini *et al.* 2014; Satta *et al.* 2017).

Bitkilerin floem dokusunda kolonize olan, hücre duvarı olmayan fitoplazmalar aşı ve küskütle (*Cuscuta* spp) taşınabilmekle birlikte en etkin şekilde *Cicadellidae*, *Cixidae*, *Psyllidae* *Delphacidae* ve *Derbidae* familyalarına ait böcek türleri tarafından taşınarak bitkilerde ciddi derecede zararlara neden olmaktadır (Lee *et al.* 2000; Nejat and Vadamalai 2013).

Mekaniksel olarak taşınmayan fitoplazmalar daha önceleri simptomlarının virüslere benzemesi ve vektörlerle taşınması nedeniyle virüs benzeri hastalık etmenleri (Spaldon, 1958); morfolojik özellikleri ve hücre duvarının olmaması nedeniyle mikoplazma benzeri organizmalar (MBO: MLO: Mycoplasma-Like Organism) olarak adlandırılmıştır (Doi *et al.* 1967). 1992 yılında Mollicute Taksonomisi Alt Komitesi (The Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes) tarafından geçici olarak “phytoplasma”; 2004 yılında ise ‘*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma sp.’ olarak mollicutes sınıfı içerisinde konumlandırılmışlardır (IRPCM 2004).

Bitkilerdeki simptomları bitki türü ve fitoplazmaya göre değişmekle birlikte genel olarak çiçek oluşumunu sağlayan genin işleyişini etkileyerek petal hücrelerinde pigment kaybı sonucu ‘phyllody’ (leaf-like petals), normal çiçeklenme yerine yeşil yaprak benzeri oluşumlar ‘virescence’ (green flowers), steril çiçek oluşumu ve düzensiz çiçeklenme (Lee *et al.* 2000; Bertaccini 2007; Nejat *et al.* 2009); fotosentezde rol oynayan klorofil ve karatonid sentezine neden olduğu modifikasyon ve inhibisyon sonucu Aster sarılık (Lee *et al.* 2000; Bertamini and Nedunchezian 2001; Bertaccini 2007; Nejat *et al.* 2009; Alfaro-Fernández *et al.* 2011); büyüme hormonları üzerinde etkisi sonucu yan tomurcularda anormallik, internotlarda kısılma cadı süpürgesi (witches broom), çalılışma, deformasyon, sürgünlerde yassılaşıma ve cüceleşme

oluşumlarının fitoplazmalara özgü en yaygın simptom tipleri olduğu kaydedilmiştir (Bertaccini 2007; Nejat *et al.* 2009; Li *et al.* 2013a; Abou-jawdah *et al.* 2014; Ren *et al.* 2017; Rao *et al.* 2018). Bu genel simptomlara ilaveten fitoplazmaların top benzeri yapı oluşumu (Alfaro-Fernández *et al.* 2011); yapraklarda küçülme, yaprak kenarlarında boşluk (Li *et al.* 2014), çiçek saplarında kalınlaşma, çiçeklerde kümeleşme, düzensiz çiçeklenme (Jakovljevic *et al.* 2015; Příbylová *et al.* 2015); yapraklarda kızarıklık, sarılık, kök dokularında kahverengileşme ve çürüklük gibi simptomlara da neden olduğu rapor edilmiştir (Yang *et al.* 2016). Bunlara ilaveten bazı konukçuların fitoplazma ile enfekteli olduğu halde herhangi bir simptom göstermediği tespit edilmiştir (Jakovljevic *et al.* 2015; Katanić *et al.* 2016; Fugita *et al.* 2017).

Hücre duvarı olmaması, sadece tek bir hücre membranı ile çevrili olması nedeniyle belli bir şekle sahip olmayan fitoplazmalar sadece canlı konukçu hücresi içerisinde tomurcuklanıp bölünerek çoğalabilmektedirler. Genom uzunlukları 530-1600 kb arasında değişen fitoplazmalar yaklaşık 500 nm çapında obligat patojenler olup ancak elektron mikroskopta görülebilmekte, vektörleri ile konukçu bitkileri arasındaki geçişleri sayesinde varlık ve yayılışlarını devam ettirmektedirler (Seemüller and Schneider 2004; Lee *et al.* 2005; Bertaccini 2007).

Mollikuteslerin diğer üyeleri gibi, fitoplazmalar da dairesel çift sarmallı kromozomal DNA'ya ilaveten bakterilerdeki plazmidlere benzer patojenite ve virülanslıkta önemli rol oynayan küçük DNA parçalarına sahiptirler. Diğer taraftan farklı guruplarda yer alan bazı fitoplazma türlerininin 16Sr'ın farklı bölgelerinin Gemini virüslerindeki genlerle önemli derecede ortak sekans benzerliği gösteren kısa dairesel plasmid benzeri ekstra kromozomal DNA (EC-DNA: Encoded-DNA) içerdikleri (Kuboyama *et al.* 1998; Rekab *et al.* 1999; Nishigawa *et al.* 2002a); ve bu DNA parçalarının fitoplazma ile vektör böcek arasındaki etkileşimde rol oynadığı rapor edilmiştir (Ishii *et al.* 2009).

Standart metabolik fonksiyonlardan sorumlu pek çok genden yoksun olan fitoplazmaların metabolik fonksiyonlarını kodlayan gen sayısı mikoplazmalarla mukayese edildiğinde daha azdır (Bai *et al.* 2006; Razin 2007). Bu nedenle şeker gibi

ihtiyaç duyduğu metabolit ürünlerin çoğunu hücre içi parazit olarak doğrudan konukçu hücresinden alırlar (Oshima *et al.* 2004; Christensen *et al.* 2005; Bai *et al.* 2006; Razin 2007). Çoğu proteinin yapı taşlarından birisi olan triptofanın (trp) fitoplazmalarda UGG, mikoplazma ve spiroplazmaları da kapsayan diğer prokaryotlarda UGA tarafından kodlanması (Bertaccini *et al.* 2009); fitoplazmaların 16S ve 23S ribozomal bölgeler arasında isoleucine tRNA (tRNA<sup>Ile</sup>) ve Alanine tRNA'yı (tRNA<sup>Ala</sup>) kodlayan yaklaşık 300 bp'lik bir ara bölgeye sahip olması fitoplazmalar ile mikoplazmalar arasındaki farklılıklardan bir diğeridir (Bertaccini *et al.* 2009).

Diğer taraftan fitoplazmalar nispeten küçük genoma sahip olmasına karşın, birçok genin çok sayıda kopyasına ve heterojen iki tRNA operon bölgesine sahip olup farklı konukçularda ve vektörlerde etmenin canlı kalmasından, genetik çeşitlilikten sorumlu kendilerine özgü çok sayıda transposable gen ile transkripsiyonun sonlamasında rol oynadığı sanılan Tandem (tekrar eden) palindromlara (REP:repetitive palindromes) sahiptir (Bai *et al.* 2006; Jomantiene and Davis 2006; Jomantiene *et al.* 2007).

Fitoplazmalar genetik olarak birçok yönden mikoplazma, bakteri ve virüslerden farklı olması yanında fitoplazma türleri arasında kromozom boyutlarında da farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Nitekim patates ve domateste stolbur hastalığına neden olan *Candidatus Phytoplasma cynodontis*'in patates ırkının kromozomu 530 kb, domates ırkının kromozomununun 1,350 kb olduğu ve bu farklılığın ise gen duplikasyonlarından ileri geldiği tespit edilmiştir (Marcone *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005).

Diğer taraftan fitoplazmaların membranları üzerinde fitoplazma türüne özgü, birbirinden farklı, homolog olmayan, konukçu ve vektör hücrelerine tutunmada, konukçu hücreleri ile interaksiyonda, enfeksiyon ve kolonizasyonda, vektörle taşınmada, patojenite ve konukçu dayanıklılığının tetiklenmesinde belirleyici rol oynayan ve toplam hücrel membran proteininin önemli bir bölümünü oluşturan son derece antijenik proteinler bulunduğu tespit edilmiştir (Yu *et al.* 1998; Berg *et al.* 1999; Blomquist *et al.* 2001; Barbara *et al.* 2002; Morton *et al.* 2003; Kakizawa *et al.* 2004). Birbirinden farklı bu hücre yüzey proteinlerinin mevcudiyeti fitoplazmaların serolojik

olarak ayırımına imkân verdiği gibi vektörlerle taşınmasında ve enfeksiyonlarında da rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Seemüller and Schneider 2004; Suzuki *et al.* 2006; Hoshi *et al.* 2007).

Fitoplazmaların hücre içi obligat patojen olmaları ve sistemik olarak taşınmalarına karşın bitki dokuları içerisindeki dağılımları da farklılık göstermektedir. Nitekim bitkilerin meristem dokularının fitoplazmalardan arı olduğu, konsantrasyonlarının ise bitki tür ve çeşidine, fitoplazma tür ve ırkına, bitki aksamına ve mevsime göre değişim gösterdiği, genellikle kök dokularında düşük, sürgün ve dallarda orta, olgun yapraklarda ise köklere oranla yaklaşık 40 kat daha yoğun bulunduğu tespit edilmiştir (Berges *al.* 2000; Sinclair and Griffiths 2000; Christensen *et al.* 2004; Musetti *et al.* 2005; Bertaccini 2009).

Yayılış ve taşınmaları vektörlere bağıllık gösteren fitoplazmalar vektörlerin bünyesine vektörler enfekteli bitkiyle beslenirken bitki özsuyu ile geçmekte, sindirim sistemine takiben vektörün kanına geçip tükrük bezlerinde kolonize olarak enfeksiyonu gerçekleştirecek konsantrasyona ulaşması haftalarca sürmekte ve bu dönem latent periyot olarak adlandırılmaktadır (Danielli *et al.* 1996; Alma *et al.* 1997; Kawakita *et al.* 2000; Hanboonsong *et al.* 2002; Tedeschi *et al.* 2006).

Fitoplazmaların mekaniksel olarak taşınmaması, bitki dokusu içerisindeki konsantrasyonlarının düşük olması, konsantrasyonlarının mevsim ve bitki aksamına göre değişim göstermesi, hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona neden olan mikoplazmaların aksine *in vitro* kültürde çoğaltılamaması onların moleküler teknikler dışındaki geleneksel yöntemlerle tanı ve sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktadır (Lee and Davis 1986). Geçmişte fitoplazmalar bitkilerdeki belirtilerine, bitkilerin floem dokusundan alınan kesitin elektron mikroskopi görüntüsüne ve serolojik reaksiyonlarına göre (İmmunofluorescence, immunosorbent elektron mikroskopi, dot blot ve ELISA) tanılanmaya çalışılmıştır. Gözleme dayalı belirtiler ve elektron mikroskopi görüntüsü ilk tanı ve diğer hastalık etmenlerinden ayırım için yeterli olsa da kesin tanılama için yetersiz, serolojik testler ise tür ve ırk düzeyinde hassasiyet ve güvenilirlikten uzak

kalmaktadır. Ancak fitoplazma DNA'sı klonlanıp sekans verileri belirlendikten sonra bu guruptaki hastalık etmenlerinin kesin, güvenilir ve hızlı şekilde ayırımında gelişen teknolojiye bağlı olarak moleküler tekniklerin kullanımı geleneksel yöntemlerin yerini almıştır (Kirkpatrick *et al.* 1987).

Günümüzde fitoplazmalar nükleik aside dayalı moleküler tekniklerle (PCR, PCR-RFLP, hibridizasyon, kısmi sekans dizilimi) hem bitki dokularından hemde vektörlerinden geleneksel yöntemlere göre daha hızlı, hassas, güvenilir ve ekonomik şekilde belirlenebilmektedir (Hogenhout *et al.* 2008).

Bununla birlikte ırk ve tür düzeyinde ayrımların yapılmasında ve fitoplazmaların sınıflandırmasının önündeki sorunların başında gen bankasındaki veri azlığı geldiği söylenebilir. Bir diğer sorun ise fitoplazmaların taşınmalarında rol oynayan vektörlerle ilgili çalışmaların yetersizliğidir.

Mevcut verilerin doğrultusunda günümüze kadar fitoplazmaların sınıflandırılması, gruplandırılması ve tanıları çoğunlukla P7/P1 universal primer çiftinin amplifiye ettiği 1.8 kb'lık 16S rRNA (P7) ve 23S rRNA (P1) arasında kalan bölgenin sekans dizilimleri baz alınarak gerçekleştirilmektedir. Buna göre fitoplazmalar 33 gurup ve 133 alt guruba ayrılmıştır (IRPCM 2004). P1/P7 primerlerinin amplifiye ettiği fragmentin farklı restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen fragment sayısı ile fragmentlerin konumu ise türlerin ayırımında ve konumlandırılacağı alt gurubların belirlenmesinde ilave olarak kullanılmaktadır (Pérez-López *et al.* 2016, 2017).

Tür düzeyinde 16S rRNA bölgesindeki sekans benzerliği %97.5'den daha az ise fitoplasma tür, benzerlik (>1200 bp) <97.5%'den fazla ise 'Ca. Phytoplasma species'olarak kabul edilmektedir. Herhangi bir alt guruba yerleştirilemeyen türler ise IRPCM (Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group) tarafından eksik tanımlanmış prokaryotlar 'Candidatus (Ca) phytoplasma sp' statüsü altındaki türler olarak konumlandırılmaktadır (IRPCM 2004; Lee *et al.* 2006b; Valiuans *et al.* 2006; Al-Saady *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2009; Fránová *et al.* 2018).

Tanılamalarda 16S-23S ara bölgesine (Internal Transcribed Spacer:ITS) ilaveten nispeten değişken bölgeler olan rp (ribosomal protein), tuf (elongation factor Tu), rplV (rpl22)–rpsC (rps3), secY (a protein translocase subunit), map, uvrB–degV, nusA, secA, ve rpoB gen bölgeleri baz alınarak dizayn edilen primer çiftleri de fitoplazmaların ayrımı için önerilmektedir (Marccone *et al.* 2000; Botti *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006; Wei *et al.* 2004a; Bertaccini *et al.* 2007; Martini *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2009).

Fitoplazmaların dünya genelinde 700'den fazla bitki türünde (sebze, meyve, süs bitkileri, kereste, gölge ağaçları, yabancı ot) hastalığa neden olarak ciddi derecede verim kayıplarına neden olduğu rapor edilmiştir (Bertaccini 2007; Hoshi *et al.* 2007; Bertaccini and Duduk 2009; Nejat and Vadamalai 2013; Abou-Jawdah *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014). Her geçen gün fitoplazma kaynaklı hastalıklara tek ve çok yıllık bitki türlerinde yenilerinin ilave edilmesi ve yayılışlarının artması çoğu fitoplazma kaynaklı hastalığın ülkelerin karantina listesinde yer almasına yol açmıştır (Lee *et al.* 2000; Chen *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2009). Diğer taraftan bilinen konukçularına ilave olarak tek yada çok yıllık çok sayıda yabancı ot türü ve süs bitkisinin siptomlu yada siptomsuz fitoplazmalara konukçuluk ettiği ve edebileceği belirtilmektedir (Weintraub and Jones 2010; Jakovljevic' *et al.* 2015).

Fitoplazmaların varlıklarını sürdürmesinde konukçuları kadar vektörleri de kritik öneme sahiptir. Zira fitoplazmalar taşınma ve yayılmalarında vektörlerine bağımlılık göstermektedir (Lee *et al.* 2000; Weintraub and Beanland 2006; Bertaccini and Duduk 2009; Nejat and Vadamalai 2013). Bu nedenle fitoplazmaların kontrolünde konukçu çevresi, rezerv konukçularının belirlenmesi kadar, potansiyel doğal vektörleri ve bu vektörlerin etkinliklerinin de tespiti önem taşımaktadır (Jakovljevic *et al.* 2015).

Son yıllarda Erzurum'da salkım söğütte (*Salix babylonica* Linn) cadısüpürgesi, top benzeri yapılar ile kısmi kuruma şeklinde fitoplazmalara özgü siptomlar gözlenmiştir.

Hastalık belirtilerinin fitoplazmalara özgü oluşu, yapılan literatür taraması sonucunda daha önce Türkiye'de salkım söğütte fitoplazmalarla ilgili herhangi bir araştırma

kaydına rastlanılmamış olması üzerine farklı illerdeki ağaçlardan alınan örnekler üzerinden etmenin fitoplazmalara sipesifik universal pirimerler kullanılarak PCR ile tanılanması amaçlanmıştır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de bitkilerde hastalığa neden olan fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri ile mukayese edildiğinde fitoplazma kökenli hastalıklarla ilgili yapılmış araştırma sayısının az olduğu söylenebilir. Bunun en önemli göstergesi de yine aynı hastalık etmenleri ile kıyaslandığında hala fitoplazmaların sınıflandırma, konukçu çevreleri, vektörleri ve bu vektörlerin etkinlikleri ile ilgili sorunların devam ediyor olmasıdır. Bunun temelinde ise fitoplazmaların taşınma şekillerinin, vektörlerine bağlılık göstermesi, hücre içi obligat patojen oluşları ve hücre duvarlarının olmayışı nedeniyle belli bir şekle sahip olmayışlarıdır. Yine hücre içi obligat patojen olan virüslerle karşılaştırıldığında fitoplazmaların gen sayısının fazla ve genomlarının çok daha uzun oluşu, tür ve ırk düzeyinde sekans dizilimlerinin belirlenmesini zorlaştıran faktörlerden bir diğeridir. Zira genlerin dizilim ve fonksiyonlarının belirlenmesinin ciddi derecede iş gücü, maliyet, zaman, bilgi ve teknolojik destek gerektirmesi bu hastalık etmenleri ile ilgili çalışmalarını sınırlandıran faktörler arasında sayılabilir.

Nitekim bitkilerde hastalık oluşturan fitoplazmalarla ilgili dünyada yapılmış araştırmalara bakıldığında büyük çoğunluğunun tanılama ve konukçu çevresinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiş olması bu fikri desteklemektedir.

Han *et al.* (2013), Kore’de dişbudak ağaçlarında internodlarda kısılma ve cadı süpürgesi belirtilen ağaçlardan aldıkları örnekleri P1/P7 primerleri ile testleyip sekans dizilimlerini belirlediklerinde etmenin marul fitoplazması ile %99.6, altın yağmur ile %100 oranında özdeş olduğunu belirlemişlerdir.

Franova and Spak (2013), çiçeklerinde anormallik, sürgünlerde gelişme geriliği, yapraklarda morluk ve beyazlık görülen *Apium graveolens* L. bitkilerden aldıkları floem örneklerini elektron mikroskopunda incelediklerinde fitoplazmaları görüntüleyip, PCR ile testleyip RFLP analizi ve sekans dizilimlerini tespit ettiklerinde etmenin aster sarılık grubundan, 16SrI-C alt grubunda yer aldığını saptamışlardır.

Du *et al.* (2013), Çin'in Sincan şehrinde tomurcuklarda irileşme belirtileri gösteren domates bitkilerinden aldıkları örnekleri PCR ile testlediklerinde yaklaşık 1.2 ve 1.8 kb'lık PCR ürünü elde etmişlerdir. Sekans karşılaştırması yaptıklarında etmenin "*Candidatus Phytoplasma trifolii*" (16S rVI grubu) ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Biswas *et al.* (2013), Hindistan'ın farklı lokasyonlarında fitoplazmalara özgü belirti gösteren lif bitkisinden (*Hibiscus sabdariffa*) topladıkları örnekleri universal primer çiftleriyle (P1/P7 ve R16F2n/16R2) testlediklerinde sırasıyla 1850, 1200 bp ve 1023 bp'lik fragmentler elde etmişlerdir.

Abou-Jawdah *et al.* (2014), Lübnan'ın kıyı bölgelerinde 1200 metreyi aşan yüksekliklere kadar hızla yayılış gösteren ve yirmi yıl içerisinde 150.000'in üzerinde badem, şeftali ve nektarin ağacının ölümüne neden olan etmenin *Candidatus Phytoplasma phoenicium almond* cadı süpürgesi hastalığı (AlmWB) olduğunu, etmenin *Asymmetrasca dekoltelar*'a (Hemiptera, Cicadellidae) tarafından taşındığını ve bu hastalığın Lübnan'da taş çekirdekli meyve bahçelerinde en yaygın görülen hastalık olduğunu rapor etmişlerdir.

Aryan *et al.* (2014), Avusturya'da asma bahçelerinde yaygın olarak bulunan *Vine Candidatus Phytoplasma solani* (Stolbur) ile ilişkili Bois noir (BN) hastalığının yayılışı ile bu hastalığın vektörü olan *Hyalesthes obsoletus* arasındaki ilişkiyi araştırdıklarında *Hyalesthes obsoletus*'un popülasyon yoğunluğu ile enfeksiyon yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişki olduğunu saptamışlardır.

Fan *et al.* (2014), Paulownia ağaçlarında cadı süpürgesi simptomuna neden olarak ciddi derecede verim kayıpları oluşturan fitoplazma hastalığına karşı *in vitro* koşullarda metil metansülfonatın (MMS) mücadelede kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmada simptom gösteren bitkilere MMS uyguladıklarında simptomların kaybolduğunu ve bitkilerin normal gelişim seyri gösterdiklerini, aynı zamanda bu hastalığın etkilediği hormon genlerinin de normale döndüğünü gözlemlemişlerdir.

Li *et al.* (2014), Çin'de iki farklı lokasyonda açık alanda yetiştirilen elma fidanlarında küçük yaprak, yapraklarda kenar boşluğu ve sarılık simptomsu gösteren fidanlardan aldıkları yaprak örneklerini elektronmikroskopu ve nested-PCR ile testlediklerinde 1.1 ve 1.2 kb'lik fragmentler elde ettiklerini, saflaştırılmış 1.2 kb'lık PCR ürünlerinin RFLP analiziyle de bu hastalığın '*Ca. Phytoplasma zipli*' ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Wang *et al.* (2014), Fitoplazmalar ve konukçuları arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasında ilk adımın gerek konukçu gerekse patojenin genom dizilimlerinin bilinmesinin önemli rol oynadığını belirterek, veri bankasına girilmiş 5 filogenetik gruptan 10 fitoplazma gen dizilimini karşılaştırdıklarında 170 korunmuş gen bölgesini belirleyip bu genlerin 75 tanesinin ribozomal yapı ve biyogenezle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Tahmin edilen sentezlenmiş protein kodlarının ise bu belirlenmiş genler içerisinde yer almadığını ve bu genlerin farklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, beş grup arasında gruba özgü genlerin büyük çoğunluğunun hipotetik proteinler olduğunu belirlenmesine karşın bazılarının putatif proteinler (potential effectors) olduğunu ve bu bölgelerden birisi olan 16SrI bölgesindeki farklılıkların gruplar arasındaki patojenite farklılığında kısmen de olsa rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Caicedo *et al.* (2015), Porto Riko'da *Cajanus cajan*, *Catharanthus roseus*, *Tabebuia heterophylla*, *Melicoccus bijugatus*, *Ixora coccinea*, *Mangifera indica*, *Opuntia* spp., *Citrus* spp. ve *Coffea arabica* bitkilerinde fitoplazmaya özgü simptomsu gösteren bitkilerden 62 örnek alıp PCR ile testlediklerinde (16S rRNA ve ribozomal protein genlerini: rpIV-rpsC) alınan örneklerin %50'sinin fitoplazma ile enfekteli olduğunu sekans analizinin ise bu fitoplazmanın güvercin bezelyesi cadı süpürgesi (pigeon pea witches broom phytoplasma :PPWB) ile %99 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Flôres *et al.* (2015), Brezilya'da Sao Paulo eyaletinde meyve bahçeleri yakınında bulunan ve fitoplazmalara özgü cadı süpürgesi, bodurluk belirtileri gösteren ve göstermeyen *Erigeron* sp. bitkilerini P1/Tint ve R16F2n/16R2 pirimerlerini kullanarak

nested-PCR ile testlediklerinde 16S rRNA geninden 1.2 kb genomik fragment elde ederek etmenin fitoplazma olduğunu ve bu ırkın daha önce belirlenmiş olan '*Candidatus Phytoplasma fraxini*' suşları ile %98'den %99'a kadar sekans benzerliği gösterdiğini ve bu ırkın 16SrVII gurubu içerisinde, 16SrVII-D alt gurubunda yer aldığını saptamışlardır.

Han *et al.* (2015), Kore'de *Melia azedarach* var. japonika ağaçlarının yapraklarında sararma, yaprak ebatlarında küçülme ve cadı süpürgesi siptomu gözlemlediklerini 16Sr DNA sekans analizinin bu fitoplazmanın 'aster sarılık group' içerisinde yer alan 16SrI-B ribozomal alt gurubu üyesi olduğunu ve sekans benzerliğinin bu alt grup üyeleri ile %99.5-100 arasında benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Jakovljevic *et al.* (2015), Kuzey Sırbistan'da beş farklı lokasyonda düzensiz çiçeklenme gösteren 27 *Cirsium arvense*, 1 *Cirsium vulgare* ve 3 *Carduus acanthoides* bitkilerinden aldıkları örneklerin tamamında *Cirsium arvense*' düzensiz çiçeklenme hastalığını (CMI) tespit etmişlerdir. Yine aynı lokasyonlarda yaygın olarak yetişen fakat hiç bir simptom göstermeyen 19 bitki türünü testlediklerinde ise *Lathyrus tuberosus* (2/5) ve *L. aphaca*'nın (1/5) ile enfekteli olduklarını; Auchenorrhyncha'nın altı familyasından 19 böcek türünü testlediklerinde ise *Euscelis incisus* (deltocephalid leafhopper) bireylerinin %10 oranında fitoplazmayı taşıdıkları ve bu türün testlenen türler arasında fitoplazmayı taşıyan tek vektör olduğunu saptamışlardır.

Přibyllová *et al.* (2015), Alanya'da (Türkiye) zayıf çiçek kümeleri, çiçek sayısında azalma, kalınlaşmış çiçek sapı belirtileri gösteren 9 *Verbana* hibridinden aldığı kesitleri elektron mikroskopu ve fitoplazmaya özgü P1A/P7A, gruba özgü F1A/rp/R1A ve amplikon üreten Tuf genine spesifik fTufAy/rTufAy) pirimer çiftleri ile testlediklerinde sırasıyla 1800, 1200 ve 940 bp'lik PCR ürünü elde ettiklerini, amplifiye edilen bölgenin sekanslarını gen bankasındaki verilerle mukayese ettiklerinde ise fitoplazmanın 'aster sarılık' grubunda yer aldığını ve bu bitki türünde bu etmenin ilk defa belirlendiğini rapor etmişlerdir.

Salehi *et al.* (2015), İran'ın Yazd ilinde salatalık ve kabak ekim alanlarında fitoplazmalarla enfekteli olduklarını belirledikleri bitkilerden etmeni *Orosius albicinctus* ile Cezayir menekşesi, yonca, salatalık, havuç, susam, ayçiçeği, kadife çiçeği, patlıcan, kabak, domates ve maydanoz bitkilerine taşıdıklarında bu bitkilerde de benzer semptomları gözlediklerini belirterek sonucun konukçu-fitoplazma-vektör ilişkisi açısından yeni kayıt olduğunu ortaya koymuşlardır.

Wang *et al.* (2015), Çin'in Nanjing bölgesindeki menekşe üretim alanında sarılık ve gelişme geriliği semptomunun görüldüğü fideleri fitoplazmaya özgü evrensel primerler P1/P7 ile testleyip amplifiye edilen bölgenin sekans verilerinin (16S rDNA'ya ve rp genine dayanan) RFLP ve filogenetik analizini yaptıklarında etmenin "*Candidatus Phytoplasma ziziphi*" (16SrV-B) ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Salehi *et al.* (2015), İran'ın Fars ilinde küçük yaprakların görüldüğü narlardan alınan yaprak örneklerini P1/P7, takiben R16F2n/R16R2 primer çifti ile testlediklerinde 1,250 bp'lik fragment elde ettiklerini DNA sekans analizi ve filogenetik analiz verilerinin fitoplazma ırklarının aynı olduğunu ve bu ırkların 16SrII-D alt grubunda yer aldığını belirlemişlerdir.

Fernández *et al.* (2016), Arjantin'de Çin dutu (*Melia azedarach*) ağaçlarında görülen sarılık hastalığının Çin ağaç sarılık hastalığı (ChTY) etmeni ile ilişkisini ortaya koymak için 16S rRNA gen bölgesinin sekans dizilimi belirlediklerinde etmenin 16Sr XIII fitoplazma grubunda yer aldığını, ChTY ırklarının 16SrXIII grubundaki fitoplazma ile %98-99 16S rDNA gen dizilim benzerliğine sahip olduğunu, gen bankasına sekans verileri girilmiş olan bütün fitoplazmalarla '*Candidatus Phytoplasma*' mukayese ettiklerinde ise '*Candidatus Phytoplasma hispanicum*' hariç benzerliğin %97.5'ten daha az olmasının ChTY'yi '*Candidatus Phytoplasma*' türlerinden ayırdığını, etmenin 16SrXIII grubu içindeki 16SrXIII-G alt grubunda yer aldığını, 16S rDNA (1.2 kb) ve rpLV-rpsC (1.3 kb) genlerinin RFLP profilinin ise ChTY'yi diğer üyelerden farkını ortaya koyduğunu belirleyerek etmeni "*Candidatus Phytoplasma meliae*" olarak tanımlamışlardır.

Katanić *et al.* (2016), Hırvatistan'da karağaçlarda sarılık simptomu etmeni olan '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma ulmi*'nin *Ulmus laevis* ve *Ulmus minor* türlerindeki yayılışını araştırdıklarında etmenin *U. laevis*'in %75 oranında yaygın olduğunu, ancak ağaçların yarısından fazlasının herhangi bir simptom göstermediğini, *Phytoplasma ulmi*'nin haricinde '*Candidatus Phytoplasma solani*' ve '*Ca. Phytoplasma asteris*'inde yaygın olduğunu tespit etmişlerdir. Toplanan 62 izolatın 16S rRNA, ribozomal protein rpl22, rps3, secY ve secY genlerinin dizi analizi çıkardıklarında ise etmenin 16SrI alt grubu içerisinde 16SrI-B ile ilişkili olduğunu, Hırvatistan izolatlarının ortak bir orijin paylaştığını ve Güneydoğu Avrupa'dan '*Ca. Phytoplasma ulmi*' suşlarıyla yakından ilişkili olduğunu belirleyerek dizi analizi yaptıklarında Ca'ya özgü diziler içindeki konumları da dahil olmak üzere daha önce hiç belirlenmemiş olan mutasyonlar olduğunu da tespit etmişlerdir.

Yang *et al.* (2016), Çin'de *Salvia miltiorrhizay* (Ada Çayı) bitkilerinde kızıl renge neden olan kızarıklık hastalığının %30 ile %50 arasında yaygınlık gösterdiği, hastalığın bitkilerde bodurluk, çiçeklerde malformasyon, yapraklarda kızarıklık, kök liflerinde kahverengileşme, siyahlaşma ve ileri aşamada köklerde çürüklüğe neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Fitoplazmalara özgü simptomların gözlemlendiği bitkileri fitoplazmaya özgü sipesifik pirimerler kullanılarak PCR ile tetslendiklerinde 1800 bp'lik fragment elde edildiğini, 16S rRNA, tuf, secY ve vmp1 gen dizileri etmenin *Candidatus Phytoplasma solani* (subgroup 16SrXII-A) ile sırasıyla %99, %100, %99 ve %98 oranında ortak dizilime sahip olduğunu belirlemişlerdir. Fitoplazmanın *Ca. P. Solani* dahil olmak üzere 16SrXII-A grubunun üyeleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini, farklı bölgelerden toplanan izolatların ise birbiriyle %100 oranında aynı olduğunu belirlediğini ilk rapor olarak sunmuşlardır.

Fugita *et al.* (2017), Brezilya'da kurak sezon boyunca otlak, çayır ve aynı zamanda çok sayıda önemli kültür bitkisi içerisinde yaygın olarak yetişen bir yabancı ot türü olan *Brachiaria decumbens*'dan topladıkları simptomsuz örneklerin %90'dan fazlasının fitoplazma ile enfekteli olduğunu belirleyerek bu bitkinin bu fitoplazma için yeni bir alternatif konukçu olduğunu rapor etmişlerdir.

Ren *et al.* (2017), Çin’de Yeşil Taflan (*Euonymus bungeanus*) bitkilerinde anormal dal gelişimi, küçük yaprak teşekkülü ve phyllody simptomlarının görüldüğü bitkilerde simptomların *E. bungeanus* cadı süpürgesi (EbWB) hastalığının belirtilerine benzerlik gösterdiği ve bu hastalığın yayılışında artış olduğunu belirterek simptomlu bitkilerden topladıkları yaprak örneklerini fitoplazmaya spesifik evrensel primer çifti (R16mF2/R16mR1) ile testleyip, 16S rRNA, rp ve secY genlerinin dizilim ve filogenetik analizlerini çıkarıp RFLP ile etmenin EbW-B 16SrV- B, rpV-C ve secY-C alt grubuna ait olduğunu saptamışlardır.

Ahmad *et al.* (2017), Pakistan’da phyllody ve cadı süpürgesi simptomsu gösteren *Brassica campestris* (sarson) bitkilerinden aldıkları örnekleri PCR (16S rRNA and tuf geni), RFLP analizi, ışık mikroskobu görüntüsü ve hastalığın doğal vektörü olan *Orosius albicinctus* (leafhopper) ile taşınma testini gerçekleştirip PCR ile amplifiye edilen bölgelerin sekans analizi sonuçları ile etmenin 16SrIX-H alt gurubunda yer aldığını ilk rapor olarak yayınlamışlardır.

Rao *et al.* (2018), Dört baklagil türünde (cowpea:*Vigna unguiculata*, pigeon pea:*Cajanus cajan*, lentil :*Lens culinaris* ve mung bean: *Vigna radiata*), yapraklarda küçülme, sararma, dallarda yassılaşıma ve cadı süpürgesi gibi fitoplazmalara özgü simptomların görüldüğü bitkilerden alınan yaprak örneklerini nested-PCR ile (fitoplazmaya sipesifik universal P1/P7 takiben 3Far/3Rev primerleri) testlediklerinde simptomsuz bitkilerde herhangi bir amplifikasyon gözlenmediğini, simptomlu bitkilerden 1300 bp’lik fragmentler elde edildiğini, 16S rDNA’nın sekans dizilimi ve RFLP analizlerinin sonuçlarına göre ise flogenetik verilerinin dört farklı bitki türünden elde edilen sonuçların dört farklı alt guruba ait fitoplazma olduğunu doğrulamışlardır. Sonuçlara göre ‘mung bean witches’ broom’dan elde edilenin ‘*Ca. P. aurantifolia*’ (16SrII- D), pigeon pea’den elde edilenin ‘*Ca. P. phoenicium*’ (16SrIX-C), lentil’den elde edilenin *Ca. P. trifolii*’ (16SrVI-D) ve cow pea’den elde edilenin (flat stem disease) ‘*Ca. P. cynodontis*’ (16SrXIV-A) ile ilişkili olduğunu belirleyip sonuçları ilk kayıt olarak yayınlamışlardır.

## 2.1. Türkiye’de Fitoplazma ile İlgili Yapılmış Çalışmaları

Farklı ülkelerde, farklı bitki türlerinde yapılmış çalışmalara bakıldığında araştırmaların büyük çoğunluğunun ilk kayıt niteliğinde, tanı, konukçu ve vektör tespitine yönelik olduğu anlaşılmaktadır. Türkiye’de de farklı bitki türlerinde, farklı zamanlarda, farklı araştırmacılar tarafından yapılmış çalışmaların amacının da dünyada yapılmış çalışmalarla paralellik gösterdiği literatür sonuçlarından anlaşılmaktadır. Türkiye’de yapılmış araştırmalara bakıldığında:

Gazel vd (2007), Türkiye’nin önemli armut üretim alanlarından birisi olan Bursa ilinde yapraklarında kızarıklık, kıvrıcılık, yapraklarda küçülme ve yaprak sayısında azalma gibi fitoplazmalara özgü belirtilerin gözlemlendiği armut ağaçlarından aldıkları 61 örneği universal primer çiftleri (P1/P7 ve R16F2/R2) ile testleyip amplifiye edilen bölgeyi RFLP ile analiz ettiklerinde etmenin ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ (Pear Decline, PD) olduğunu belirlemişlerdir.

Sertkaya vd (2005), Türkiye’nin Akdeniz Bölgesinde meyve (badem, kayısı, şeftali, armut ve erik) ağaçlarından topladıkları 24 örneği PCR-RFLP ile tanıyıp TEM’ (Transmission Elektron Mikroskopisi) incelediklerinde 24 örneğin altısının European Stone Fruit yellows (ESFY, 16SrX-B) ve pear decline (PD, 16SrX-C) ile enfekteli olduğunu ilk rapor olarak yayınlamışlardır.

Sertkaya vd (2007), susam ve ceviz menekşesinde phyllody, patlıcanda sarılık gibi fitoplazmalara özgü belirtiler gösteren bitkilerden etmeni tanıdıklarında etmenin clover proliferation group (16SrVI-A); stolbur phytoplasma group (16SrXII-A) ile ilişkili olduğunu belirleyerek sonuçları ilk rapor olarak yayınlamışlardır.

Ulubaş vd (2007), Türkiye’nin kıyı bölgeleri boyunca Türkiye’ye özgü altı kayısı çeşidinde sera şartlarında ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’a karşı bu çeşitlerin reaksiyonlarını belirlemek amacıyla etmeni aşılı çeşitlere taşıdıklarında benzer belirtileri gözlemlediklerini ilk rapor olarak sunmuşlardır.

Gazel vd (2009), Türkiye'nin Akdeniz Bölgesinde lokal ve ithal kültür çeşidi kayısılarda (*Prunus armeniaca L*) *Candidatus Phytoplasma prunorum* belirlediklerini ve etmenin kayısılarda %77 oranında verim kaybına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Çağlar ve Elbeaino (2013), Adana bölgesinde bazı *Ligustrum ovalifolium* Hassk. bitkisinde sararma, cadı süpürgesi ve geriye doğru ölümlerin olduğunu gözlemleyip 30 örneği nested-PCR ile (universal pirimerlerle:P1/P7) ile testleyip amplifiye edilen bölgenin sekans dizilimi belirleyerek etmeni Türk Ligustrum cadı süpürgesi (TuLiWB) olarak tanımlayıp etmenin 16SrII (peanut witches' broom group) ile %92 oranında sekans benzerliği gösterdiğini ilk rapor olarak yayınlamışlardır.

Çağırğan *et al.* (2014), Antalya ilinde, Afrika ve Asya'da sürgünleri ve yaprakları lif üretiminde kullanılan ancak Türkiye'de bir yabancı ot türü olarak yetişen jüt bitkisinde (*Corchorus olitorius L.*) phyllody, internotlarda kısalma, yapraklarda sararma, kızarıklık derimsi yapı oluşumu gibi semptomları gözlemlemişler ve bu etmenin susamlardaki fitoplazma hastalığı ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir.

Çaprak ve Sertkaya (2015), Türkiye'nin farklı bölgelerinde 2000 yılından 2015 yılına kadar farklı bitki türlerinde (bağ, meyve, sebze, tarla bitkileri, süs bitkileri ve yabancı otlar) fitoplazma kökenli patojenler ve vektörleri ile doğal konukçularına yönelik yapılmış araştırmaları değerlendirerek sonuçları tablo halinde vermiştir (Çizelge 1).

**Çizelge 2.1.** Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda belirlenen fitoplazmalar

<b>Etmen</b>	<b>Grubu</b>	<b>Hastalık Adı</b>	<b>Kısaltma</b>	<b>Konukçu</b>	<b>Kaynak</b>
<b>Rubus stunt subgroup (Elm yellows group)</b>	16SrV-E	Rubus stunt: Rubus cücelik	RSP: RCF	Böğürtlen	Sertkaya vd 2005
<b>Stolbur phytoplasma</b>	16SrXII-A	Tomato big bud: Domates iri tomurcuk	TBB: DİT	Domates	Sertkaya vd 2007

Çizelge 2.1. (devam)

<b><i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum</b>	16SrX-B	European Stone Fruit Yellows: Avrupa sert çekirdekli sarılık	ESFY: ASSF	Badem, Erik, Kaysı, Şeftali	Sertkaya vd 2005; Ulubaş Serçe vd 2006
<b><i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri</b>	16SrX-C	Pear decline: Armut yıkım	PD: AYF	Armut	Sertkaya vd 2005; Ulubaş Serçe vd 2006
<b><i>Candidatus</i> Phytoplasma mali</b>	16SrX-A	Apple proliferation: Elma çoklu sürgün	AP: EÇSF	Elma	Sertkaya vd 2007;
<b>Sesame phyllody phytoplasma (Clover proliferation group)</b>	16SrVI-A	Sesame phyllody: Susam fillodi	SPP: SPF	Susam, Cezayir menekşesi, Patlıcan, Biber, <i>Orosius orientalis</i>	Sertkaya vd 2007
<b>Gülde fitoplazma</b>	-	-	-	Gül	Çağlar vd 2011
<b><i>Candidatus</i> Phytoplasma ulmi (Elm yellows group)</b>	16SrV	-	-	Zeytin	Fidan vd 2012
<b>White leaf- phytoplasma</b>	16SrXIV	Beyaz yapraklılık	BGWL	<i>Cynodon dactylon</i>	Çağlar vd 2013
<b>Turkish Ligustrum witches' broom phytoplasma</b>	16SrII	Turkish Ligustrum cadı süpürgesi fitoplazması	TuLiWB	Kurtbağrı <i>Ligustrum ovalifolium</i>	Çağlar and Elbeaino, 2013
<b>Stolbur phytoplasma</b>	16SrXII- A	Stolbur	STOL	Patates, <i>C. Arvensis</i>	Sertkaya vd 2013

Alp *et al.* (2016), Van ilinde park ve bahçelerde bodurluk, kızarıklık, sürgünlerde deformasyon ve cücelik belirtileri gösteren kadife çiçeği (*Tagetes erecta* L.) örneklerini

PCR ile testleyip, amplifiye edilen bölgenin sekans dizilimini çıkarıp, RFLP analiziyle etmenin “*Candidatus Phytoplasma solani*” olduğunu belirlemişlerdir.

Gazel vd (2016), Ege Bölgesindeki (Aydın ili) nar (*Punica granatum L.*) ağaçlarında fitoplazmaya özgü sararma, solgunluk, deformasyonlar, yapraklarda kızarma ve geriye doğru ölüm belirtileri gösteren ağaçlardan örnek alıp fitoplazmaya özgü universal primer çifti (16S rRNA ve tuf gen primerleri) kullanarak nested-PCR yapıp amplifikasyon ürünlerini (16Sr (I) F1/R1) Tru1I, Tsp509I ve HhaI restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tuttuklarında etmenin 16SrI-B ve 16SrXII-A olduğunu ilk kayıt olarak bildirmişlerdir.

Kaya vd (2016), Türkiye'de farklı lokasyonlardan ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’nin konukçusu olan *Malus* spp. (apple:Elma), *Cydonia oblonga* (quince:ayva), *Crataegus* spp. (hawthorn) ile ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’nin potansiyel kışlama konukçusu olma potansiyeli taşıyan armudun yabancı ve kültür formlarından (*Pyrus* spp.) *Cacopsylla picta*, *C. melanoneura-C. affinis* complex, *C. crataegi*, *C. pyrisuga*, *C. pyri*, *C. pyricola* ve *C. acopsylla* pisyllid türlerini belirleyip en yüksek popülasyon yoğunluğuna *C. Picta*’nın sahip olduğunu, bunu *C. pyri*, *C. melanoneura-C. affinis* ve *C. crataegi*’nin takip ettiğini ve bu türlerin ‘*Ca. P. mali*’nin potansiyel vektörü olabileceğini ilk kayıt olarak yayınlamışlardır.

Üstün vd (2017), susamın en tahripkar hastalıklarından birisi olan phyllody hastalığına karşı hastalığın en yaygın olarak görüldüğü alanlardan dayanıklı susam genotiplerini belirlemek için hastalığın bitkilerdeki şiddetine göre toplam 542 örneği taramış ve bu genotiplerden sadece otuzunu dayanıklılık testlerinde kullanmak üzere seçmişlerdir.

Özdemir (2018), 2012-2014 Antalya ilinde susam tarlalarından topladığı toplam 65 *Neoliturus haematocepsm* (Cicadellidae) örneğinin fitoplazma taşıyıp taşımadığını spesifik universal P1/P7 ve R16F2n/R16R2 primer çiftlerini kullanarak testlemiştir. Fitoplazmaların 1250 bp'lik amplifikasyon bölgesinin sekans analizini çıkardığında 16S rDNA bölgesine göre yer fıstığı cadı süpürgesi (Grup II), yonca çoğalması (Grup VI) ve

güvercin bezelyesi cadı süpürgesi (Grup IX) olmak üzere üç farklı fitoplazma türü tespit etmişlerdir.

### **Söğütlerde Fitoplazmalar İle İlgili Çalışmalar**

Söğüt türlerinde yapılmış araştırma sayısının çok sınırlı olduğu, yapılmış az sayıdaki çalışmanın da diğer hastalık etmenlerinde olduğu gibi tanılamaya yönelik olduğu sonuçlarında ilk kayıt olarak yayınlandığı anlaşılmaktadır. Çalışmalara bakıldığında:

Khadhair and Hiruki (1995), Kanada'da söğütlerde söğüt cadı süpürgesi (Willow witches'-broom:WWB), üçgüllerde üçgül çoğalma (clover proliferation: CP), patatesten patates cadı süpürgesi (potato witches'-broom: PWB) ve yoncada yonca cadı süpürgesi (alfalfa witches'-broom:AWB) ile birlikte PCR ile testleyerek RFLP analizi yaptıklarında söğütlerden (*Salix bebbiana* Sarg., *Salix discolor* Muhl., *Salix exigua* Nutt, and *Salix petiolaris* Sm.) elde ettikleri fitoplazma ile diğerleri arasında belirgin bir fark olmadığını belirlemişlerdir.

Alfaro-Fernández *et al.* (2011), İspanya'da salkım söğütlerde (*Salix babylonica* Linn) sarılık, top benzeri yapılar ve küçük yaprak oluşumunun görüldüğü bitkilerden topladıkları yaprak örneklerini nested-PCR ve RFLP ile analiz ettiklerinde etmenin stolbur gurubuna (16SrXII) ait olduğunu belirlemişlerdir.

Mou *et al.* (2014), Çin'de cadı süpürgesi symptomu gözlemlenen *Salix tetradenia* (Söğüt) bitkilerinden aldığı örnekleri transmission elektron mikroskopda inceleyip, fitoplazmaya spesifik universal primer çifti (R16F2n/R16R2) ile nested-PCR yaptığında 1.2 kb'lık fragment elde ettiklerini, 16S rDNA bölgesinin sekans dizilimi çıkardıklarında ise izolatların %99.84, %99.68 ve %99.76 oranında birbiriyle benzerlik gösterdiğini ve fitoplazmanın 16SrI-B alt gurubunda yer aldığını ilk rapor olarak yayınlamışlardır.

Zamharir and Taheri (2017), İnan'ın İsfahan kentinde farklı lokasyonlarında cadı süpürgesi simptomu gösteren sgtlerden (*Salix babylonica* Linn.) topladıkları yaprak örneklerini ilk aşamada universal pirimer çifti olan P1/P7 ile amplfiye edip takiben R16F2n/R16R2 ile nestet PCR ile testleyip 16S ribosomal RNA (rRNA) geni ve 16S–23S rRNA intergenic spacer bölgesinin sekans dizilimini çıkardıklarında etmenin 16SrXII gurubuna ait bir fitoplazma olduğunu rapor etmişlerdir.

Dünyada 1990 yılından itibaren yapılmış çalışmalar tarandığında sgtlerde fitoplazmalarla ilgili sadece 4 araştırma yapıldığı, Türkiye'de ise herhangi bir araştırma yapılmamış olduğu anlaşmıştır. Bu literatür verileri doğrultusunda fitoplazmalara özgü simptom gösteren sgt ağaçlarından alınan örnekler üzerinden etmenin PCR ile tanılanması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmalarda kullanılan bitki materyali

Çalışmada bitki materyalleri olarak 2018 yılının Nisan ve Mayıs aylarında Erzurum (6), Erzincan (4), Sivas (2), Yozgat (2), Ankara (2), Kütahya (3), Afyonkarahisar (2) ve Trabzon (2) ilinde park ve bahçelerde fitoplazmalara özgü cadı süpürgesi, kısmi kuruma, top benzeri yapılar, sık ve küçük yaprak teşekkülü şeklinde belirtiler gösteren salkım söğütlerden (*Salix babylonica* Linn.) alınan örnekler kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu amaçla toplam 23 simptomlu bitkiden alınan örnek buz kutusu içerisinde laboratuara (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji Laboratuvarı) getirilmiş ve nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılacak şekilde hazırlanıp -20°C'de muhafaza edilmiştir. Sürvey çalışması yürütülmekte olan Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiş olan “Bazı Yabancı Otlar Türlerinde (*Sisymbrium*, *Raphanus* ve *Rapistrum* spp.: *Brassicaceae*) Belirlenen Virüslerin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu isimli ve 6629 FCD-2018” nolu proje kapsamında yürütülmüştür.



**Şekil 3.1.** Cadı süpürgesi simptonu gösteren salkım söğüt (*Salix babylonica*)

### 3.1.2. Yararlanılan cihazlar

**Çizelge 3.1.** Yararlanılan cihazlar ve markaları

<b>Cihazlar</b>	<b>Markaları</b>
Adjustable Pipette 1-10, 10-100, 100-1000 µl	Eppendorff
Buz Makinası	Beko
Dijital Hassas terazi	Denver instruments
Labcycle Gradient PCR	SensQuest Lab Cycler
Manyetik Karıştırıcı Dijital ısıtıcı	Heidolph MR 3001
Otoklav	Nüve
pH metre	Ohaus Starter 3100
UV Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad
Centrifuge	Sigma

**Çizelge 3.1.** (devam)

Sıcak Su Banyosu	Polyscience
Elektroforez Tankı	Max Fill
Güç Kaynağı	Consort E861
Su Terazisi	Iso Lab Germany
Farklı boyutlarda Beher	Iso Lab Germany
Ölçü silindirleri	Iso Lab Germany
Mikrodalga Fırın	Vestel

**3.1.3. Yararlanılan sarf malzemeleri****Çizelge 3.2.** Sarf malzemeleri ve markaları

<b>Malzemeler</b>	<b>Markaları</b>
Agorose (Molecular Biology)	SİGMA
Chloroform (Molecular Biology)	MERCK
Conical santrüfuj tube 50 ml polypropilen	İsoLab
Disposable Latex gloves	MedPoint
DNase I (RNase free) (Molecular Biology)	PROMEGA
Santrüfuj tube 2 ml	İsoLab
Ethanol (%99.9 Absolute)	MERCK
Iso Amyl Alcohol (Molecular Biology)	SİGMA
Iso Proponol (Molecular Biology)	SİGMA
PCR microtubes	Eppendorf
Pipet ucu	Eppendorf
Phenol (Katı, Molecular Biology)	MERCK
dNTP's Set (Promega Corporation, USA)	PROMEGA
Taq Polimeraz	SİGMA-ALDRİCH
6xDYE	Thermo Fisher Scientific
Ethidium Bromide	SIGMA
10 µl'lik pipet ve pipet uçları	EPPENDORF
50xTAE	ThermoFisher Scientific
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	SIGMA

## 3.2. Ekstraksiyonda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

### 3.2.1. CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

%2 (w/v) CTAB

1.4 M NaCl

20 mM EDTA

100 mM Tris- HCl (pH 8.0)

%0.2 (v/v)  $\beta$ -Mercapta ethanol

#### 1 M Tris-HCl (pH 7,5)

12,11 g Tris 80 ml saf suda çözündürülüp, HCl ile pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

#### 0,5 M EDTA, (500 ml stok, pH 8,0)

93 g EDTA (Etilenediaminetetra-asetat disodyum  $\cdot 2H_2O$ ) 400 ml saf suda çözündürülüp NaOH ile pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

#### 5 M NaCl

292 g NaCl 1 litre saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

#### 1X TE (Tris-EDTA) Tamponu

Her 500 ml TE için 5 ml 1 M Tris-HCl (pH=7.5) ile 1 ml 0,5 M EDTA (pH=8,0) alınıp toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

**3 M Sodyum Asetat (pH=5)**

408 g sodyum asetat trihidrat ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 800 ml saf suda çözüldürülmüş ve 3 M asetik asit ile pH 5.0'a ayarlanıp toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanıp filtre edilerek sterilize edilmiştir.

**10 M Amonyum Asetat ( $\text{CH}_3\text{COONH}$ )**

192,70 g amonyum asetat 250 ml saf suda çözüldürülüp takiben filtreden geçirilerek sterilize edilip kullanılmıştır.

**Kloroform:İzoamil Alkol: (24:1)**

24 ml kloroform üzerine 1 ml izoamil alkol ilave edilerek hazırlanmıştır.

 **$\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$** 

0.84 g  $\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$  tartılıp 100 ml saf suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

**%2 mercaptoethanol**

Ekstraksiyon tamponu içerisine kullanılmadan önce %2 oranında ilave edilmiştir.

**3.2.2. PCR Çalışmalarında Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanışları**

-**10 x PCR Buffer** (Sigma-Aldrich, USA): Kit içerisinde hazır.

-**25 mM  $\text{MgCl}_2$**  (Sigma-Aldrich, USA): Kit içerisinde hazır

-**Taq Polymerase (5 units/  $\mu\text{l}$** , Sigma-Aldrich, USA):

-**Primerler** (Direkt PCR: P1, P7 ve Nested PCR: R16F2n, R16R2)

- $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$

### 3.2.3. 5 mM dNTP

1 ml 5 mM dNTP hazırlamak için her biri 100 mM'lık konsantrasyona sahip olan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'nin her birinden 20 µl alınıp son hacim d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ile 1 ml'ye tamamlanıp -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.4. Primerler

Liyofilize haldeki pirimerler 10 mM olacak şekilde d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ile seyreltilip PCR'da kullanılmıştır.

## 3.3. Elektroforez Aşamasında Kullanılan Reaktiflerin Hazırlanışı

### 1 Litre 50xTAE Buffer (Stok)

-242 gr Tris

-100 ml 0.5 M EDTA pH:8.0

-57.1 ml Acetic acid ilave edilip hacmi saf su ile 1lt ye tamamlanmak suretiyle hazırlanmıştır.

### 100 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (pH:8.0)

18.6 gr Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 70 ml H<sub>2</sub>O içerisine bırakılarak üzerine 10 M NaOH ilave edilip çözünmesi sağlanmış ve pH:8.0 ayarlanıp son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

**1xTAE buffer (Elektroforez Bufferı)**

1 lt için 20 ml 50xTAE buffer alınıp üzerine 980 ml saf su ilave edilerek hazırlanıp kullanılmıştır.

**%1.5'lik Jel**

4.5 gr agar üzerine 150 ml 1xTAE buffer ilave edilip mikro dalga fırında agar jel haline getirilip üzerine 50 µl ethidium bromide (%0.05) ilave edilip takiben jel yatağına dökülmüştür.

**Low mass ladder**

4 birim marker üzerine 1 birim 6xDYE ilave edilerek kullanılmıştır.

**50 ml 6x DYE**

20 gr surose tartılıp 30 ml suda çözündürülüp üzerine % 0.01 gr bromophenol blue ilave edilip son hacim suyla 50 ml'ye tamamlanmıştır.

**20 ml Ethidium Bromide (10 mg/ml)**

0.2 gr Ethidium Bromide tartılıp 20 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

**DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonu CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Doyle and Doyle, 1990). Buna göre:

Örnek sayısına göre 2 ml'lik eppendorf tüpleri numaralandırılıp içerisine önceden hazırlanmış ve ısıtılmış olan CTAB ekstraksiyon bufferından her bir örnek için 1 ml (%2 CTAB (w/v): 1.42 M NaCl, 200 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH=8.0, %1 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, %0.2'lik 2-Mercaptoethanol) buffer konulup üzerine sıvı azot kullanılarak toz haline getirilen bitki dokuları transfer edildikten sonra tüpler her 15 dakikada hafifçe alt-üst edilerek 1 saat 70°C su banyosunda tutulmuştur.

-Takiben 15 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4°C'de, 14000 rpm'de, 20 dk. santrifüj edilip üst faz alınarak yeni tüplere transfer edilmiş ve üzerine eşit hacimde Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:1) eklenerek 1 dk. yavaşça alt-üst edilerek karıştırılıp tekrar santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj edildikten sonra üst faz alınıp üzerine eşit hacimde Chloroform-Isoamyl Alcohol (24:1) ilave edilip tekrar santrifüj edilmiş ve üst faz alınıp üzerine 100 µl (10 M) amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat (3 M pH: 5.5) ve 500 µl soğuk (-20°C) isopropanol eklenip karıştırıldıktan sonra tekrar santrifüj edilmiştir.

- Bu aşamadan sonra süpernatant atılıp pelet vaccumlu santrifüjde (Eppendorf) 30°C'de kurutulup üzerine 100 µl 1xTE buffer ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılarak çözüldürüldükten sonra PCR için kullanılıncaya kadar -20°C muhafaze edilmiştir.

### **3.3.1. DNA'nın Kalitesi ve Miktarının Tayini**

DNA örneklerinin kantitatif tayini her örnekten 1 µl alınarak NanoDrop ND-3300 spektrofotometre cihazı (NanoDrop Technologies, USA) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Protein kontaminasyonu için 260/280, polifenol ve polisakarit kontaminasyonu için 260/230 oranları kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Spektrofotometre cihazı (NanoDrop Technologies, USA)

### 3.4. PCR Çalışmaları

#### 3.4.1. Direkt-PCR

Hastalık etmeni fitoplazmanın belirlenmesinde tüm fitoplazmalar için 1800 bp fragment veren universal pirimer çifti P1 (Deng and Hiruki 1991) ve P7 (Kirkpatrick *et al.* 1992); Nested-PCR içinse 1200 bp'lik fragment veren F16F2n ve R16R2 pirimer çiftleri kullanılmıştır (Gundersen and Lee 1996).

PCR işleminde DNA ile birlikte PCR'da kullanılan reaktiflerden Taq polimeraz hariç tamamı kullanılmadan önce oda sıcaklığında çözündürülüp kullanılıncaya kadar kristal halindeki buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Çözündürülmüş DNA'lar numara sırasına göre PCR tüplerine 2 µl olacak şekilde bırakılmış ve üzerine 23 µl PCR karışım (Çizelge 3.3) ilave edilip daha önceden girilmiş olan programa göre amplifiye edilmiştir (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.3.** PCR reaktifleri ve bir örnek için kullanılan miktarları (**2µl DNA + 23µl**)

Reagent	Miktar (1X)
ddH <sub>2</sub> O	14.35 µl
10X Buffer	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	1.5 µl
dNTP, 2.5mM	2.0 µl
Primer P1 (F): 5 'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (25 nt)	1.25 µl
Primer P7 (R): 5'CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' (18 nt)	1.25 µl
Taq Polimeraz	0.15 µl
DNA	2.0 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

**Çizelge 3.4.** direkt-PCR döngü sıcaklıkları

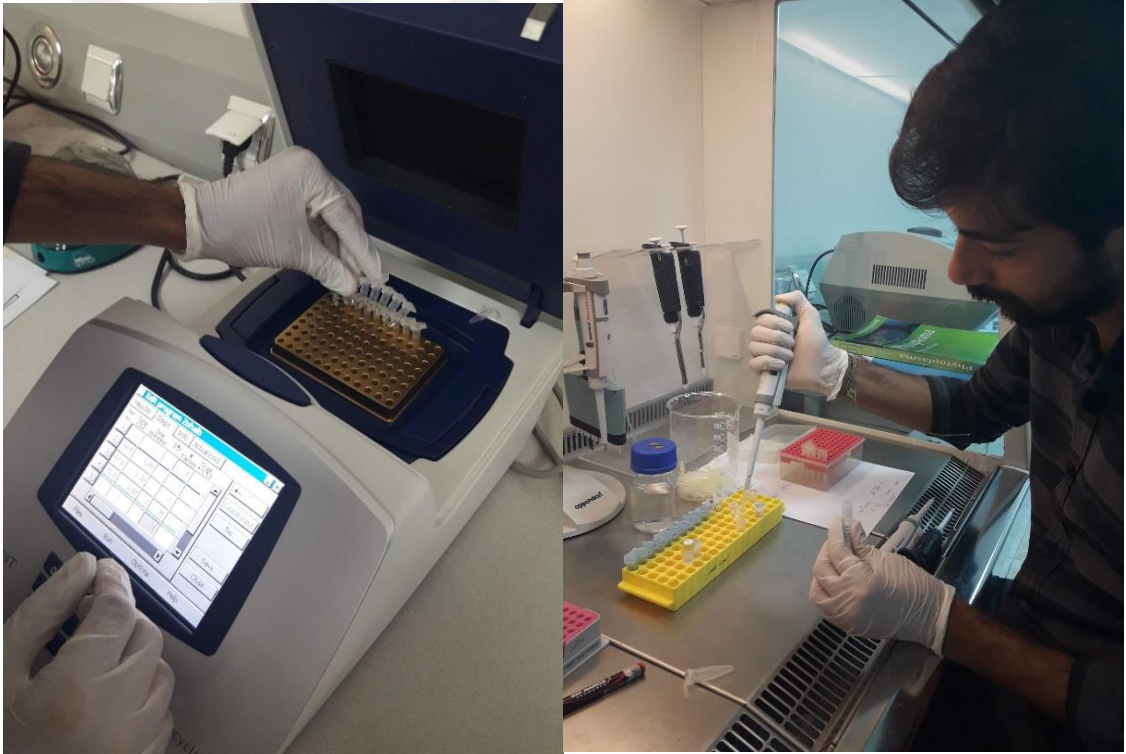
PCR Sıcaklıkları	Sıcaklık Değerleri ve süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç için denaturasyon sıcaklığı	94°C 4 dakika	35 döngü
Ara denaturasyon sıcaklığı	94°C 1 dakika	
Amplifikasyon sıcaklığı	55°C 2 dakika	
Tamamlayıcı sıcaklık	72°C 3 dakika	
Final sıcaklık	72°C 10 dakika	
Muhafaza sıcaklığı	+4°C	

### 3.4.2. Nested-PCR

P1/P7 primer çifti ile yapılan direkt-PCR ürünleri, 1/20 oranında seyreltilerek 16F2n/R2 primer çifti ile nested-PCR'a tabi tutulmuştur (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Nested-PCR döngü sıcaklıkları

PCR Sıcaklıkları	Sıcaklık Değerleri ve süresi	Döngü Sayısı
Başlangıç için denaturasyon sıcaklığı	94°C 4 dakika	<b>35 döngü</b>
Ara denaturasyon sıcaklığı	94°C 1 dakika	
Amplifikasyon sıcaklığı	57°C 2 dakika	
Tamamlayıcı sıcaklık	72°C 3 dakika	
Final sıcaklık	72°C 10 dakika	
Muhafaza sıcaklığı	+4°C	

**Şekil 3.3.** PCR çalışmaları

#### 3.4.4. Elektroforez Çalışmaları

150 ml'lik %1.5'lik jel için 2.25 gr agaroz tartılıp üzerine 150 ml 1xTAE buffer ilave edilerek mikrodalga fırında 4-5 dakika tutulmak suretiyle ağarın jel haline gelmesi

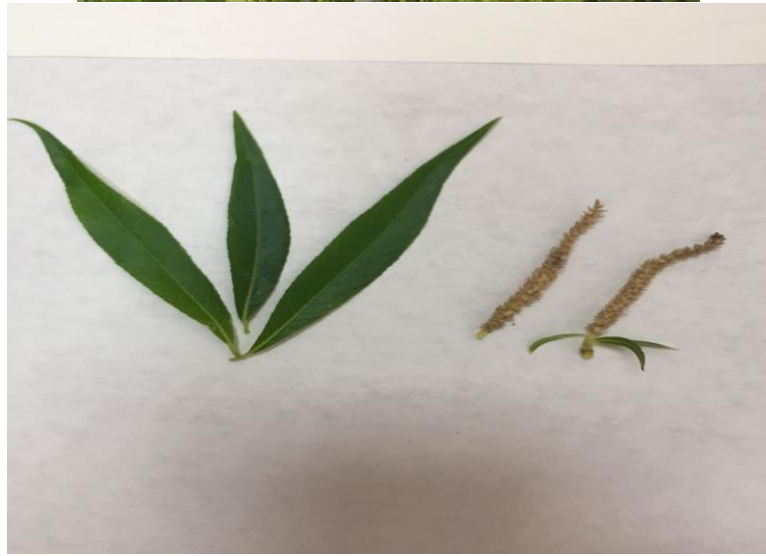
sağlanmış ve üzerine 50 µl ethidium bromide (%0.05) ilave edilip jel yatağına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Takiben jel elektroforez tankına yerleştirilip üzerine 1xTAE buffer dökülerek örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirilmıştir.

PCR rnlerinin üzerine 6xDYE (9 µl PCR ürünü + 1 µl 6xDYE) ilave edilerek 10 µl olacak şekilde 4-5 µl marker ile birlikte sırasıyla yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 120 V ve 120 mA de 90 dakika yürütülmüş ve sonra UV transliminatrde görüntülenmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Farklı illerde salkım sөгütlerde (*Salix babylonica*) fitoplazmalara özgü cadı süpürgesi, top benzeri yapılar, küçük ve sık yapraklı sürgünler, kısmen ve tamamen kurumalar şeklinde simptomlar gözlenmiştir (Şekil 4.1,2,3,4).



**Şekil 4.1.** Etmenin salkım sөгütlerin (*Salix babylonica*) taze sürgün ve yapraklarındaki simptomları



**Şekil 4.2.** Simptomlu salkım söğüt ağacı(*Salix babylonica*)

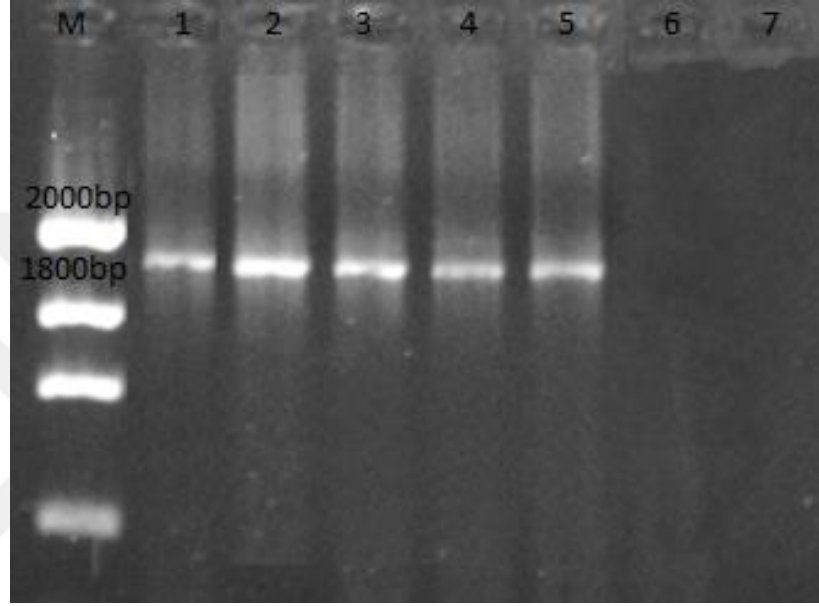


Şekil 4.3. Salkım söğütlerde (*Salix babylonica*) cadı süpürgesi



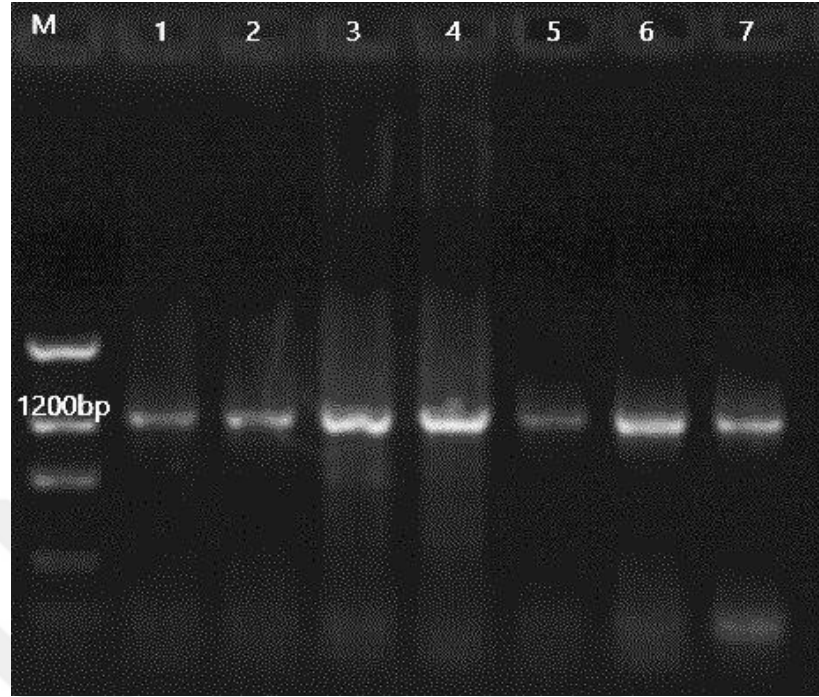
Şekil 4.4. Salkım söğütlerde (*Salix babylonica*) küçük yaprak teşekkülü

Erzurum ilinden fitoplazmalara özgü simptom gösteren 5 ve simptomsuz bir ağaçtan alınan örnekler fitoplazmalara sipesifik universal pirimer çifti (P1/P7) ile test edildiğinde, simptom gösteren ağaçlardan 1800 bp'lik fragment elde edilirken sağlıklı bitkilerden herhangi bir bant elde edilememiştir (Şekil 4.5).



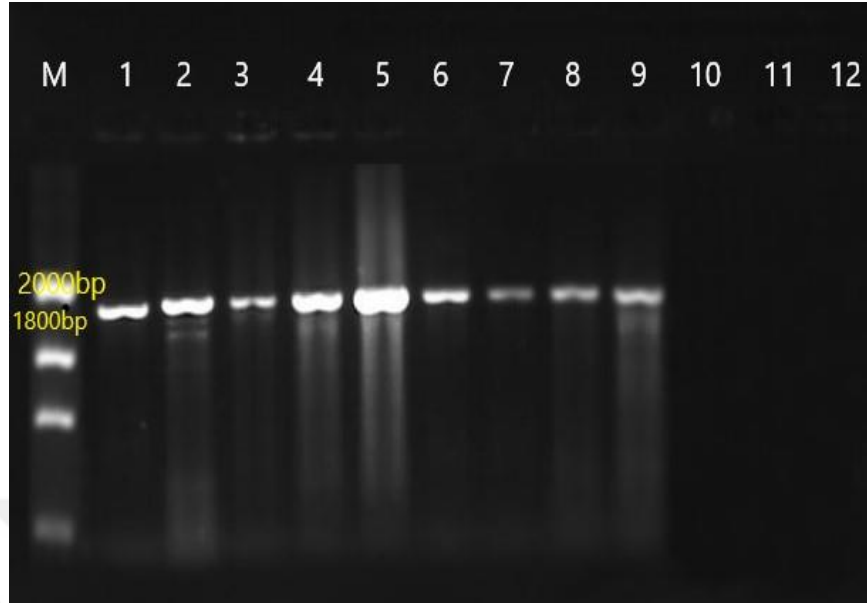
**Şekil 4.5.** Direkt-PCR sonuçları: M: Marker, 1: İzolat 1, 2: İzolat 2, 3: İzolat 3, 4: İzolat 4, 5: İzolat 5, 6: Sağlıklı, 7: PCR control

P1/P7 pirimerlerinden elde edilen PCR ürünlerinden F16F2n ve R16R2 pirimerleri kullanılarak nested-PCR yapıldığında bu pirimer çiftinden beklenen 1200 bp'lik fragmentler elde edilmiştir (Şekil 4.6).

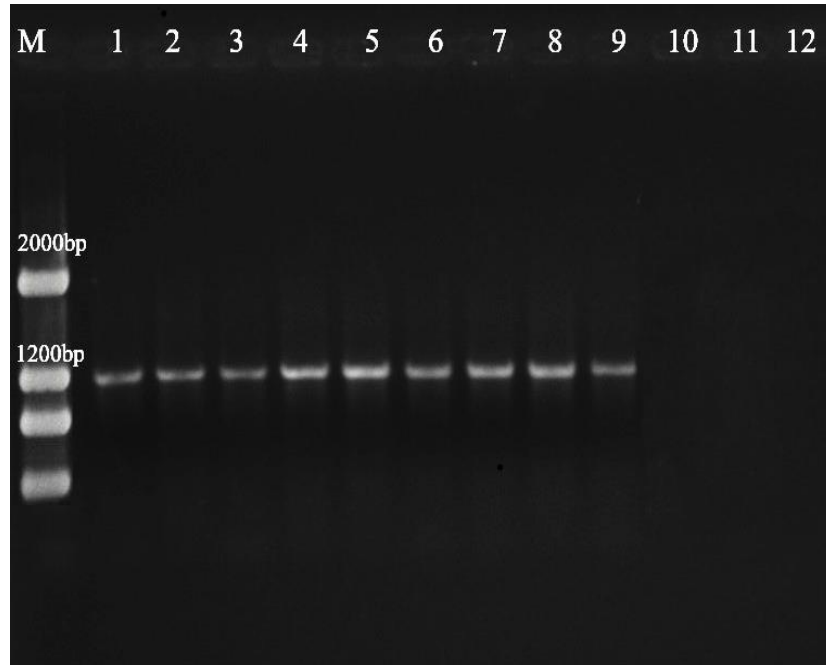


**Şekil 4.6.** Farklı izolatlardan nested-PCR (F16F2n ve R16R2) ile elde edilen sonuçlar

Takiben farklı illerde (Erzurum ( Erzurum, Erzinca, Sivas, Tokat, Amasya, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyon) yapılan gözlemlerde aynı semptomları gösteren ağaçlardan da örnekler (toplam 23) alınıp test edildiğinde bu ağaçlarında enfekteli oldukları saptanmıştır (Şekil 4.7,8).



**Şekil 4.7.** Direkt-PCR (P1 ve P7 ile) Marker, 2 Erzurum (Salkım Söğüt: *Salix babylonica*), 3, Erzurum (*Salix spp*) Yapraklarında genel kızarıklık simptomsu 4: Erzincan Salkım Söğüt, 5: Sivas söğüt, 6: Tokat söğüt, 7: Amasya Söğüt, 8: Ankara salkım söğüt, Eskişehir söğüt, Kütahya Söğüt, 9: Afyon söğüt, 10: Simptomsuz salkım söğüt, 11: Simptomsuz söğüt, 12: Negatif PCR kontrol



**Şekil 4.8.** Nested-PCR sonuçları: Marker, 2 Erzurum (Salkım Söğüt: *Salix babylonica*), 3, Erzurum (*Salix spp.*) Yapraklarında genel kızarıklık simptomsu 4: Erzincan Salkım Söğüt, 5: Sivas söğüt, 6: Tokat söğüt, 7: Amasya Söğüt, 8: Ankara salkım söğüt, Eskişehir söğüt, Kütahya Söğüt, 9: Afyon söğüt, 10: Simptomsuz salkım söğüt, 11: Simptomsuz söğüt, 12: Negatif PCR kontrol

Elde edilen PCR ürünlerinin daha önce yapılmış çalışmalarla elde edilen bant ağırlıkları ile aynı oluşu; simptomların fitoplazmalar için tanımlanmış simptom tipleri ile benzerlik göstermesi etmenin fitoplazma olduğunu, farklı bölgelerde yer alan farklı illerden toplanan simptomlu bitkilerde etmenin belirlenmesi ise bu fitoplazma türünün ülke genelinde ciddi derecede yaygın olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan bu hastalık etmeni fitoplazma ülkemizde ilk defa bu çalışma ile salkım söğütte (*Salix babylonica*) belirlenmiş olması sonuçlara ilk kayıt olma özelliği katmıştır.

Yine yapılan gözlemlerde salkım söğüt dışında diğer söğüt türleri, kavak, huş, akçaağaç, karaağaç, dişbudak, böğürtlen ve şakayıkda da fitoplazmalara özgü simtom gösteren bitki sayısının dikkat çekecek derecede yaygın olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Farklı ağaçlarda gözlemlenen simptomlar ve iller

Bitki Türü	Simptom Tipi	Gözlendiği il
Salkım Söğüt ( <i>Salix babylonica</i> )	Cadı süpürgesi, top benzeri yapılar, küçük ve sık yapraklı sürgünler, kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum, Erzincan, Sivas, Tokat, Amasya, Yozgat, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar, Trabzon.
Söğüt ( <i>Salix spp.</i> )	Bazı ağaçlarda cadı süpürgesi, top benzeri yapılar küçük ve sık yapraklı sürgünler, kısmen ve tamamen kurumalar. Bazı ağaçlarda kızarıklık, seyrek yaprak teşekkülü, kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum, Erzincan, Sivas, Tokat, Amasya, Yozgat, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar, Trabzon.
Kavak ( <i>Populus spp.</i> )	Kısmen ve tamamen sarılık ile birlikte kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum, Erzincan, Sivas, Tokat, Amasya, Yozgat, Ankara, Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar, Trabzon
Huş ağacı ( <i>Betula spp.</i> )	Seyrek ve küçük yaprak teşekkülü, kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum
Akçaağaç ( <i>Acer spp.</i> )	Aynı Ağacın bazı dallarındaki sarılık, yapraklarda deformasyon, kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum, Ankara

**Çizelge 4.1.** (devam)

Karaağaç ağacı ( <i>Ulmus spp.</i> )	Aynı Ağacın bazı dallarındaki yapraklarda kızarıklık, kısmen ve tamamen kurumalar.	Erzurum, Ankara
Dişbudak ( <i>Fraxinus spp.</i> )	Cadı süpürgesi, sık ve küçük yapraklı sürgün teşekkülü, kısmen ve tamamen kurumalar	Erzurum, Ankara
Böğürtlen ( <i>Rubus spp.</i> )	Küçük yapraklı sürgünler, ve kurumalar.	Sivas
Şakayık ( <i>Paeonia spp.</i> )	Yapraklarda kızarıklık	Erzurum



## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Yapılan çalışma ile Erzurum, Erzincan, Sivas, Tokat, Amasya, Yozgat, Ankara, Eskişehir, Kütahya ve Afyonkarahisar illerinde salkım söğütlerde bu hastalık etmeni fitoplazmanın belirlenmiş olması hastalığın ciddi derecede yaygın olduğunu göstermektedir. Gözlemlenen belirtilerin ise daha önce fitoplazmalar için tanımlanmış olan belirtilerle (Biswas *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Pribylova *et al.*, 2015) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Belirtilmeli ağaçlardan alınan örnekler fitoplazmalara özgü universal primer çiftleri (P1/P7 ve F16F2n ve R16R2) ile testlendiğinde bu primer çiftlerinden beklenen 1800 ve 1200 bp'lik fragmentlerin elde edilmesi ağaçların fitoplazma ile enfekteli olduğunu doğrulamıştır. Elde edilen PCR sonuçların daha önce söğütlerde Kanada (Khadhair and Hiruki, 1995); İspanya (Alfaro-Fernández *et al.*, 2011), Çin (Mou *et al.*, 2014) ve İran'da (Zamharir and Taheri, 2017) yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında bu araştırmaların haricinde söğütlerde fitoplazmalarla ilgili yapılmış başka kayda rastlanılmamıştır.

Farklı illerde salkım söğütte fitoplazmalara özgü belirtilerin dikkat çekecek boyutta yaygınlık göstermesinin nedeni ise:

- Fitoplazma yada fitoplazmaların daha virülans ırk yada ırklarının ortaya çıkması,
- Etmeni taşıyan ancak daha önce popülasyonu düşük olan daha etkin bir vektörün popülasyonun artması,
- Ağaçların birden fazla fitoplazma ırkı/türü tarafından enfeksiyona maruz kalması,
- Mevcut vektörlerin popülasyonunun artması,
- Fitoplazmaları taşıyan vektörleri baskılayan doğal düşman popülasyonlarının farklı nedenlerden dolayı azalması,
- İklim faktörlerinin (sıcaklık, yağış, yağış rejimindeki değişim vb) patojen ve vektörü lehine değişmesi,

- Ülkemize bu hastalığın taşıyıcısı yeni bir vektörün girmiş olması olabilir.

Söğüt türleri dışında farklı kültür bitkisi ve orman ağaçları ile park ve bahçelerde kullanılan süs bitkilerinde de fitoplazmalara özgü belirtilerin dikkat çekecek boyutlara ulaşması bu hastalık grubunun farklı bitki türlerindeki yayılışlarının, konukçu-patojen-vektör ilişkilerinin moleküler olarak tanımlanıp karakterizasyonlarının araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak etmenin tür ve ırk düzeyinde tanısı için konukçu türü, popülasyon dağılımı ve semptom tiplerinin belirlenerek PCR bölgesinin klonlanıp sekans dizilimlerinin çıkarılması gerekmektedir ki buda kapsamlı bir çalışma ile ortaya konulabilir.

**KAYNAKLAR**

- Abba, S., Galetto, L., Carle, P., Carrare, S., Delledonne, M., Foissac, X., Palmano, S., Veratti, F. and Marzacha, C., 2014. RNA-Seq Profile of Flavescence DorE Phytoplasma in Grapevine. *BMC Genomics* 15, 1–13.
- Abou-Jawda, Y., Abdel S., A., Jawhari, M., Sobh, H., Abdul-Nour, H., Bianco, P., Molino L., M., and Alberto A., 2014. *Asymmetrasca decedens* (Cicadellidae, Typhlocybinae), a natural vector of ‘Candidatus Phytoplasma phoenicium’. *Annals of Applied Biology*. 165.10.1111/aab.12144.
- Abou-Jawdah, Y., Abdel Sater, A., Jawhari, M., Sobh, H., Abdul-Nour, H., Bianco, P. A., Molino Lova, M. and Alma, A., 2014. *Asymmetrasca Decedens* (Cicadellidae, Typhlocybinae), a Natural Vector of ‘Candidatus Phytoplasma Phoenicium’. *Annals of Applied Biology* 165, 395–403.
- Ahmad, J. N., Ahmad, S. J. N., Aslam, M., Ahmad, M. A., Contaldo, N., Paltrinieri, S. and Bertaccini, A., 2017. Molecular and Biologic Characterization of a Phytoplasma Associated with Brassica Campestris Phyllody Disease in Punjab Province, Pakistan. *European Journal of Plant Pathology* 149, 117–125.
- Alfaro-Fernández, A., Abad-Campos, P., Hernández-Llopis, D., Serranofernández, A. and Font-San-Ambrosio, M. I., 2011. Detection of Stolbur Phytoplasma in Willow in Spain. *Bulletin of Insectology* 64, 111–112.
- Alfaro-Fernández, A., del Cebrián, M.C., Villaescusa, F.J. and Font, María., 2011. Detection and identification of aster yellows and stolbur phytoplasmas in various crops in Spain. *Bulletin of Insectology*. 64. S63-S64.
- Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M. and Arzone A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 115–121.
- Alp, Ş., Usta, M., Sipahioğlu, H. M. and Güller, A., 2016. First Report of “Candidatus Phytoplasma Solani” on a New Host Marigold (*Tagetes Erecta* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 40, 311–318.
- Al-Saady N.A., Khan A.J., Calari A., Al-Subhi A.M. and Bertaccini A., 2008. ‘Candidatus Phytoplasma omanense’, a phytoplasma associated with witches’ broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 461–466.
- Al-Subhi, A., Hogenhout, S. A., Al-Yahyai, R. A. and Al-Sadi, A. M., 2017. Classification of a New Phytoplasmas Subgroup 16SrII-W Associated with *Crotalaria* Witches’ Broom Diseases in Oman Based on Multigene Sequence Analysis. *BMC Microbiology* 17, 1–14.
- Aryan, A., Brader, G., Mörtel, J., Pastar, M. and Riedle-Bauer, M., 2014. An Abundant ‘Candidatus Phytoplasma Solani’ Tuf b Strain Is Associated with Grapevine, Stinging Nettle and *Hyalesthes Obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology* 140, 213–227.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W. and Hogenhout S.A., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188, 3682–3696.

- Barbara D.J., Morton A., Clark M.F. and Davies D.L., 2002. Immuno-dominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148, 157–167.
- Berg M., Davies D.L., Clark M.F., Vetten J., Maier G. and Seemüller E., 1999. Isolation of a gene encoding an immunodominant membrane protein gene in the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937–1943.
- Berges R., Rott M. and Seemüller E., 2000. Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1145–1152.
- Bertaccini A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673–689.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S. and Contaldo, N., 2014. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 05, 1763–1788.
- Bertamini M. and Nedunchezian N., 2001. Effect of phytoplasma, stolbur-subgroup (Bois noir-BN)] of photosynthetic pigments, saccharides, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) leaves. *Photosynthetica* 39, 119–122.
- Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., Kumar, M., Satya, P. and Mahapatra, B. S., 2013. Molecular Identification of a Candidatus Phytoplasma (Group 16SrV-D) Coding Partial UvrB Gene and DegV Gene on a New Host - Mesta (*Hibiscus Sabdariffa*) - with Phyllody and Reddening of Leaves in India. *Phytoparasitica* 41, 539–543.
- Blomquist C.L., D.J. Barbara, D.L. Davies, M.F. Clark and B.C. Kirkpatrick, 2001. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147, 571–580.
- Botti S. and Bertaccini A., 2006. Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. In: 16th International Congress of the International Organization of Mycoplasma, Cambridge, UK, 9–14 July 2006, 113.
- Cagirgan, I., Topuz, H., Mbaye, N. and Soner Silme, R., 2014. First Report on the Occurrence and Symptomatology of Phyllody Disease in Jute (*Corchorus Olitorius* L.) and Its Plant Characteristics in Turkey. *Turkish Journal of Field Crops* 19, 129–135.
- Caicedo, J. D., Rivera-Vargas, L. I., Segarra, A. E. and Davis, R. E., 2015. Detection and Molecular Characterisation of a Group 16SrIX Phytoplasma Infecting Citrus (*Citrus Sinensis* and *C. Limon*), Coffee (*Coffea Arabica*), Periwinkle (*Catharanthus Roseus*), and Tabebuia (*Tabebuia Heterophylla*) in Puerto Rico. *Australasian Plant Disease Notes* 10.
- Chen, X. F., Liang, Y. C., Chen, N., Su, W. M., Xiao, H., Wang, X. and Zhu, X. P., 2013. Molecular Identification of a Phytoplasma Associated with Sophora Root Yellows. *Forest Pathology* 43, 415–421.
- Christensen N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen M. and Schultz A., 2005. Phytoplasmas and their interactions with their hosts. *Trend in Plant Science* 10, 526–535.
- Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M. and Schultz A., 2004. Distribution of

- phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17, 1175–1184.
- Chung, B. N., Jeong, M. Il, Choi, S. K., Joa, J. H., Choi, K. S. and Choi, I. M., 2013. Occurrence of Stolbur Phytoplasma Disease in Spreading Type *Petunia Hybrid* Cultivars in Korea. 29, 465–470.
- Çağlar, B. K. and Elbeaino, T., 2013. A Novel Phytoplasma Associated with Witches' Broom Disease of *Ligustrum Ovalifolium* in Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 137, 113–117.
- Danielli A., A. Bertaccini, A. Alma, D. Bosco, M. Vibio and A. Ar- zone, 1996. May evidence of 16SrI-group-related phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball suggest their transovarial transmission? *IOM Letters* 4, 190–191.
- Deng, S., and Hiruki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14:53-61.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K. and 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 pawlonia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society Japan* 33, 259–266.
- Dong, J. H., Zhang, L., Li, W. H., McBeath, J. H. and Zhang, Z. K., 2013. 'Candidatus Phytoplasma Aurantifolia'-Related Strain Associated with Tomato Yellows Disease in China. *Journal of General Plant Pathology* 79, 366–369.
- Doyle J.J & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15
- Du, Y., Mou, H., Shi, B., Xu, X. and Xiang, B., 2013. Molecular Detection and Identification of a 16SrVI Group Phytoplasma Associated with Tomato Big Bud Disease In. 161, 870–873.
- Fan, G., Dong, Y., Deng, M., Zhao, Z., Niu, S. and Xu, E., 2014. Plant-Pathogen Interaction, Circadian Rhythm, and Hormone-Related Gene Expression Provide Indicators of Phytoplasma Infection in *Paulownia Fortunei*. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 23141–23162
- Fernández, F. D., Galdeano, E., Kornowski, M. V., Arneodo, J. D. and Conci, L. R., 2016. Description of 'Candidatus Phytoplasma Meliae', a Phytoplasma Associated with Chinaberry (*Melia Azedarach* L.) Yellowing in South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 5244–5251.
- Flôres, D., Mello, A. P. de O. A., Pereira, T. B. C., Rezende, J. A. M. and Bedendo, I. P., 2015. A Novel Subgroup 16SrVII-D Phytoplasma Identified in Association with *Erigeron* Witches' Broom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 2761–2765.
- Flôres, D., Mello, A. P. de O. A., Pereira, T. B. C., Rezende, J. A. M. and Bedendo, I. P. 2015 A Novel Subgroup 16SrVII-D Phytoplasma Identified in Association with *Erigeron* Witches' Broom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 2761–2765.
- Fránová, J. and Špak, J., 2013. First Report of a 16SrI-C Phytoplasma Infecting Celery (*Apium Graveolens*) with Stunting, Bushy Top and Phyllody in the Czech Republic. *Journal of Phytopathology* 161, 666–670.
- Fránová, J., Lenz, O., Příbylová, J., Špak, J., Koloniuk, I., Suchá, J. and Paprštejn, F.,

2018. “Candidatus Phytoplasma Asteris” and “Candidatus Phytoplasma Mali” Strains Infecting Sweet and Sour Cherry in the Czech Republic. *Journal of Phytopathology* 166, 59–66.
- Fránová, J., Lenz, O., Příbylová, J., Špak, J., Koloniuk, I., Suchá, J. and Paprštejn, F. 2018. “Candidatus Phytoplasma Asteris” and “Candidatus Phytoplasma Mali” Strains Infecting Sweet and Sour Cherry in the Czech Republic. *Journal of Phytopathology* 166, 59–66.
- Fugita, J. M. S., Pereira, T. B. C., Banzato, T. C., Kitajima, E. W., Souto, E. R. and Bedendo, I. P., 2017. Occurrence of a Subgroup 16SrIII-J Phytoplasma in Non-Symptomatic *Brachiaria Decumbens* Cultivated in a Grazing Area. *Tropical Plant Pathology* 42, 500–503.
- Gazel, M., Caglayan, K., Serce, C. U. & Son, L., 2009. Evaluations of Apricot Trees Infected by Candidatus Phytoplasma Prunorum for Horticultural Characteristics. *Romanian Biotechnological Letters* 14, 4123–4129.
- Gazel, M., Çağlayan, K., Başpınar, H., Mejia, J. F., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. and Contaldo, N., 2016. Detection and Identification of Phytoplasmas in Pomegranate Trees with Yellowing Symptoms. *Journal of Phytopathology* 164, 136–140.
- Ghayeb Zamharir, M. and Taheri, P., 2017 ‘Candidatus Phytoplasma Solani’ Related Strain Associated with Babylon Willow Witches’ Broom in Central Provinces of Iran. *Australasian Plant Disease Notes* 12, 47.
- Gundersen, D. E., and Lee, I.-M., 1996. *Phytopathol. Mediterr.* 35:144.
- Han, S. S., Baek, S. J., Lee, S. H., Seo, S. T. and Seralathan, K. K., 2015. First Report of Aster Yellowing Phytoplasma (16SrI-B) Associated with Witches’ Broom Disease of *Melia Azedarach* Var. *Japonica* in Korea. *Journal of Phytopathology* 163, 1055–1058.
- Han, S. S., Lee, K. J. and Kamala-Kannan, S., 2013. Detection of Aster Yellowing Phytoplasma (16SrI) Associated with Prickly Ash (*Zanthoxylum Schinifolium* S. et Z.) Witches’ Broom Disease in Korea. *Journal of Phytopathology* 161, 582–585.
- Hanboonsong Y., Choosai C., Panyim S. and Damak S., 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11, 97–103.
- Hernould, M. and Eveillard, S., 2007. Methylation Status and Deregulation of Methyltransferase Genes in Stolbur Phytoplasma-Infected Tomato Showed Alteration of SIDEF Methylation Status and Deregulation of Methyltransferase Genes Expression.
- Hogenhout S.A., K. Oshima, E-D. Ammar, S. Kakizawa, H.N. Kingdom and S. Namba, 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9, 403–423.
- Hoshi A., Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Oshima and S. Namba, 2007. Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of Insectology* 60, 105–107.
- IRPCM, 2004. ‘Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1243–1255.

- Ishii Y., S. Kakizawa, A. Hoshi, K. Maejima, S. Kagiwada, Y. Yamaji, K. Oshima and S. Namba, 2009. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology* 155, 2058–2067.
- Jakovljevic, M., Jovic, J., Mitrovic, M., Krstic, O., Kosovac, A., Toševski, I. and Cvrkovic, T., 2015. *Euscelis Incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae), a Natural Vector of 16SrIII-B Phytoplasma Causing Multiple Inflorescence Disease of *Cirsium Arvense*. *Annals of Applied Biology* 167, 406–419.
- Jomantiene R. and R.E. Davis, 2006. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiology Letters* 255, 59–65.
- Jomantiene R., Y. Zhao and R.E. Davis, 2007. Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA Cell Biology* 26, 557–564. Erratum 26, 695.
- Kakizawa S., K. Oshima, H. Nishigawa, H-Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, M. Tanaka, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba, 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 135–142.
- Katanić, Z., Krstin, L., Ježić, M., Zebec, M. and Ćurković-Perica, M., 2016. Molecular Characterization of Elm Yellows Phytoplasmas in Croatia and Their Impact on *Ulmus Spp.* *Plant Pathology* 65, 1430–1440.
- Kawakita H., T. Saiki, W. Wei, W. Mitsuhasi, K. Watanabe, M. Sato, 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in genital organs and eggs of the leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90, 909–914.
- Kaya, K., Serce, Cigdem U., Gazel, M., Caglayan, K. and Sauvion, N., 2016. Potential Psyllid Vectors of Candidatus Phytoplasma Mali and Candidatus Phytoplasma Pyri in Turkey. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 53, 383–392.
- Kirkpatrick B.C., B.C. Stenger, T.J. Morris and A.H. Purcell, 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238, 197–200.
- Kirkpatrick, B. C., 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In *The Prokaryotes*, pp. 4050–4067. Edited by A. Balows, H. G. Tru\$per, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.
- Kuboyama T., C. Huang, X. Lu, T. Sawayanagi, T. Kanazawa, T. Kagami, I. Matsuda, T. Tsuchizaki and S. Namba, 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 11, 1031–1037.
- Lee I-M. and R.E. Davis, 1986. Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma like organisms. *Annual Review of Phytopathology* 24, 339–354.
- Lee I-M., Y. Zhao and K.D. Bottner, 2005. Novel insertion sequence-like elements in phytoplasma strains of the aster yellows group are putative new members of the IS3 family. *FEMS Microbiology Letters* 242, 353–360.
- Lee, I., Davis, R. E. and Dawn, E. 2000 P HYTOPLASMA : Phytopathogenic Mollicutes \*.
- Lee I-M., Y. Zhao and K.D. Bottner, 2006a. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20, 87–91.

- Li, Z., Liu, P., Zhang, L. and Wu, Y., 2013a. Detection and Identification of the Phytoplasma Associated with China Ixeris (*Ixeridium Chinense*) Fasciation. 1–6.
- Li, Z. N., Zhang, L., Song, J. G. and Wu, Y. F., 2013b. Molecular Detection and Identification of Phytoplasma Associated with Pepper Witches' Broom in China. *Phytoparasitica* 41, 429–434.
- Li, Z. N., Bai, Y. B., Liu, P., Zhang, L. and Wu, Y. F., 2014. Occurrence of 'Candidatus Phytoplasma Ziziphi' in Apple Trees in China. *Forest Pathology* 44, 417–419.
- Liu, C. Te, Huang, H. M., Hong, S. F., Kuo-Huang, L. L., Yang, C. Y., Lin, Y. Y., Lin, C. P. and Lin, S. S., 2015. Peanut Witches' Broom (PnWB) Phytoplasma-Mediated Leafy Flower Symptoms and Abnormal Vascular Bundles Development. *Plant Signaling and Behavior* 10.
- Marcone C., H. Neimark, A. Ragozzino, U. Lauer and E. Seemüller, 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805–810.
- Marcone C., I-M. Lee, R.E. Davis, A. Ragozzino and E. Seemüller, 2000. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1703–1713.
- Martini M., I-M. Lee, K.D. Bottner, Y. Zhao, S. Botti, A. Bertaccini, N.A. Harrison, L. Carraro, C. Marcone, J. Khan and R. Osler, 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2037–2051.
- Melo, L., Silva, E., Flôres, D., Ventura, J., Costa, H. and Bedendo, I., 2013. A Phytoplasma Representative of a New Subgroup, 16SrXIII-E, Associated with Papaya Apical Curl Necrosis. *European Journal of Plant Pathology* 137, 445–450.
- Morton A., D.L. Davies, C.L. Blomquist and D.J. Barbara, 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology* 4, 109–114.
- Mou, H.-Q., Xu, X., Wang, R.-R., Tian, Q., Wei, Y., Zhu, S.-F., Liao, X.-L. and Zhao, W.-J., 2014. *Salix Tetradenia* Hand.-Mazz: A New Natural Plant Host of 'Candidatus Phytoplasma'. *Forest Pathology* 44, 56–61.
- Musetti R., L. Sanità Di Toppi, M. Martini, F. Ferrini, A. Loschi, M.A. Favali and R. Osler, 2005. Hydrogen peroxide localization and anti-oxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112, 53–61.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S. N. A., Vadamalai, G. and Dickinson, M. 2009. Phytoplasmas Associated with Disease of Coconut in Malaysia: Phylogenetic Groups and Host Plant Species. 1152–1160.
- Nejat, N., Vadamalai, G., Davis, R. E., Harrison, N. A., Sijam, K. and Dickinson, M. 2013. 'Candidatus Phytoplasma Malaysianum', a Novel Taxon Associated with Virescence and Phyllody of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus Roseus*). 540–548.
- Neriya, Y., Maejima, K., Nijo, T., Tomomitsu, T., Yusa, A., Himeno, M., Netsu, O.,

- Hamamoto, H., Oshima, K. and Namba, S., 2014. Onion Yellow Phytoplasma P38 Protein Plays a Role in Adhesion to the Hosts. *FEMS Microbiology Letters* 361, 115–122.
- Nishigawa H., K. Oshima, S. Kakizawa, H-Y. Jung, T. Kuboyama, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba, 2002a. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298, 195–201.
- Oshima K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H-Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba, 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, 27–29.
- Özdemir, Z., 2018. Identification of Phytoplasmas from *Neoliturus Haematoceps* Associated with Sesame Phyllody Disease in Southwestern. 242–248.
- Peng, L., Zhao, Y., Zhao, Z., Zhao, J. and Liu, M., 2014. Cloning and Expression of a Tau Class Glutathione S-Transferase (ZjGSTU1) from Chinese Jujube in Response to Phytoplasma Infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 36, 2905–2913.
- Pérez-López, E., Olivier, C. Y., Luna-Rodríguez, M. and Dumonceaux, T. J. 2016. Phytoplasma Classification and Phylogeny Based on in Silico and in Vitro RFLP Analysis of Cpn60 Universal Target Sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 5600–5613.
- Pérez-López, E., Olivier, C. Y., Luna-Rodríguez, M. and Dumonceaux, T. J., 2016. Phytoplasma Classification and Phylogeny Based on in Silico and in Vitro RFLP Analysis of Cpn60 Universal Target Sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 5600–5613.
- Pérez-López, E., Wei, W., Wang, J., Davis, R. E., Luna-Rodríguez, M. and Zhao, Y., 2017. Novel Phytoplasma Strains of X-Disease Group Unveil Genetic Markers That Distinguish North American and South American Geographic Lineages within Subgroups 16SrIII-J and 16SrIII-U. *Annals of Applied Biology* 171, 405–416.
- Příbylová, J., Petržík, K., Fránová, J. and Špak, J., 2015. Molecular Characterization of Aster Yellows Subgroup 16SrI-B Phytoplasma in *Verbena × Hybrida*. *Journal of Phytopathology* 163, 664–669.
- Rao, G. P., Madhupriya, Kumar, M., Tomar, S., Maya, B., Singh, S. K. and Johnson, J. M., 2018. Detection and Identification of Four 16Sr Subgroups of Phytoplasmas Associated with Different Legume Crops in India. *European Journal of Plant Pathology* 150, 507–513.
- Razin S., 2007. Molecular biology and genomics of Mollicutes. *Bulletin of Insectology* 60, 101–103.
- Rekab D., Carraro L., Schneider B., Seemüller E., Chen J., Chang C-J, Locci R. and Firrao G., 1999. Geminivirus-related extrachromosomal DNAs of the X-clade phytoplasmas share high sequence similarity. *Microbiology* 145, 1453–1459.
- Ren, Z. G., Zhao, X. Y., Dong, Y. R., Wang, J. Z., Yang, R., Wang, S. J., Tian, G. Z. and Wei, Y. M., 2017. Molecular Characterization of a Phytoplasma Associated with *Euonymus Bungeanus* Witches' Broom in China. *Forest Pathology* 47, e12373.
- Salehi, M., Siampour, M., Esmailzadeh Hosseini, S. A. and Bertaccini, A., 2015. Characterization and Vector Identification of Phytoplasmas Associated with

- Cucumber and Squash Phyllody in Iran. *Bulletin of Insectology* 68, 311–319.
- Satta, E., Nanni, I. M., Contaldo, N. and Collina, M., 2017. General Phytoplasma Detection by a Q-PCR Method Using Mycoplasma Primers. 1–7.
- Seemüller E. and Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1217–1226.
- Sertkaya, G., Martini, M., Ermacora, P., Musetti, R. & Osler, R., 2005. Detection and Characterization of Phytoplasmas in Diseased Stone Fruits and Pear by PCR-RFLP Analysis in Turkey. *Phytoparasitica* 33, 380–390.
- Sertkaya, G., Martini, M., Musetti, R. & Osler, R., 2007. Detection and Molecular Characterization of Phytoplasmas Infecting Sesame and Solanaceous Crops in Turkey. *Bulletin of Insectology* 60, 141–142.
- Sinclair W.A. and Griffiths H.M., 2000. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. *Plant Disease* 84, 282–288.
- Spaldon E., 1958. Stolbur and similar virus diseases causing seed lessness in plants". *Proc. Conf. on stolbur, Smolenice 1956*, pp. 25-33 Solvák Acad. Publishing house, Bratislava.
- Studiorum, A. M., 2009. Phytoplasma and Phytoplasma Diseases : A Review of Recent Research. 355–378.
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M. and Namba S., 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 103, 4252–4257.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J. and Alma A., 2006. Possible Phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55, 18–24.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., Baş, M. Son, L. 2006. Phytoplasma diseases of fruit trees in germplasm and commercial orchards in Turkey. *J. Plant Path.* 88:179-185.
- Ustun, R., Yol, E., Ikten, C., Catal, M. and Uzun, B., 2017. Screening, Selection and Real-Time QPCR Validation for Phytoplasma Resistance in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Euphytica* 213, 1–9.
- Valasevich, N. and Schneider, B., 2017. Rapid Detection of “ Candidatus Phytoplasma Mali” by Recombinase Polymerase Amplification Assays. *Journal of Phytopathology* 165, 762–770.
- Valiunas D., J. Staniulis and R.E. Davis, 2006. 'Candidatus Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 27–281.
- Wang, J., Ai, C. X., Yu, X. M., Zhang, K. P., Gao, R. and Li, X. D., 2018. First Report of 'Candidatus Phytoplasma Asteris' Related Strain Associated with Sweet Cherry Fasciation Disease in China. *Plant Disease* 102, 237–237.
- Wang, Q. C., Mei, C. J., Gui, J. C., Ji, Y. L. and Yu, H. S., 2015. Detection and Identification of 'Candidatus Phytoplasma Ziziphi' Associated with Violet *Orychophragmus* Yellow Dwarf Disease in China. *Journal of General Plant*

- Pathology 81, 449–453.
- Wang, Q., Guo, Y., Wang, N., Li, Y., Chen, W., Chen, W. and Wu, Y., 2014. Identification of a Conserved Core Genome with Group-Specific Genes from Comparative Genomics of Ten Different Candidatus Phytoplasma Strains. *Journal of Phytopathology* 162, 650–659.
- Wei W., S. Kakizawa, H.Y. Jung, S. Suzuki, M. Tanaka, H. Nishigawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, T. Hibi and S. Namba, 2004a. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology* 94, 683–686.
- Weintraub, P., and Beanland, L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual review of entomology*. 51. 91-111. 10.1146/annurev.ento.51.110104.151039.
- Yang, R., Wang, G., Wang, S., Zhang, D., Wei, L., Chen, H., Li, O. and Hu, X., 2016. Molecular Identification and Diversity of ‘Candidatus Phytoplasma Solani’ Associated with Red-Leaf Disease of *Salvia Miltiorrhiza* in China. *Journal of Phytopathology* 164, 882–889.
- Yu Y., K. Yeh and C. Lin, 1998. An antigenic protein gene of a phyto- plasma associated with sweet potato witches’ broom. *Microbiol- ogy* 144, 1257–1262.
- Zhao Y., Q. Sun, W. Wei, R.E. Davis, W. Wu and Q. Liu, 2009. ‘Candidatus Phytoplasma tamaricis’, a novel taxon discovered in witches’-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol- ogy* 59,2496–2504.

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Pakistan'ın Gujrat İlçesinde doğdu. İlk ve ortaokul eğitimini Government High School Bagrianwala'da, lise eğitimini F.G. Degree College for Men Kharian Cantt'nde tamamladı. University of Sargodha Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Programı'nın, Bitki Koruma alt programından 2015 yılında mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2016 Eylül ayında "Türkiye Burslu" olarak Bitki Koruma Anabilim Dalı (Fitopatoloji)'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

