

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ŞANLIURFA İLİ BİBER (*Capsicum annuum* L.) YETİŞTİRİLEN
ALANLARDA FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Zehra MEZRELİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2019**

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında, Zehra MEZRELİ'nin hazırladığı “Şanlıurfa İli Biber (*Capsicum annuum* L.) Yetiştirilen Alanlarda Fitoplazmaların Saptanması ve Karakterizasyonu” konulu bu çalışma 26/06/019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Üye : Prof. Dr. Canan CAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. : Murat DİKİLİTAŞ

Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 19100

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

İçindekiler

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller	11
3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için kullanılan materyal	11
3.2. Yöntem	11
3.2.1. Örneklerin toplanması	11
3.2.2. Total DNA ekstraksiyonu çalışmaları	12
3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarının ayarlanması	13
3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR).....	13
3.2.5. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi (RFLP)	15
3.2.6. Agaroz jel elektroforez çalışmaları.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	18
4.1. Survey çalışmaları ve örnekleme	18
4.2. Moleküler Çalışmalar	21
4.2.1. Total nükleik asit izolasyonu	21
4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	21
4.2.3. Sınıflandırma ve iPhyClassifier programında dizi analizi	22
4.2.4. Toplanan örneklerde fitoplazma tespiti	24
4.2.5. Sekans analizi ve dendogram.....	27
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	36
EKLER.....	37

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİ BİBER YETİŞTİRİLEN ALANLARDA FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Zehra MEZRELİ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2019, Sayfa: 38

Bu çalışma Şanlıurfa ili biber yetiştirilen alanlarda fitoplazma hastalığına benzer belirtiler gösteren biber bitkilerinde, fitoplazma varlığını saptamak ve karakterizasyonu yapmak amacıyla yürütülmüştür. Bozova, Haliliye, Karaköprü, ve Birecik ilçelerine bağlı biber yetiştirilen alanlarda sararma, boğum aralarının kısalması, bodurlaşma, küçük yaprak oluşumu gibi fitoplazma benzeri belirtiler gösteren biber bitkilerinden 28 örnek toplanmıştır ve testlenmiştir. Toplanan örneklerden elde edilen total DNA'lar P1/P7 universal primer çifti ile Direct PCR ve R16F2n/R2 primerleri ile Nested PCR yapıp *EcoR1*, *Alu1*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII* ve *TaqI* enzimleriyle kesilip karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda toplanan örneklerin %64,29 pozitif bulunmuş ve var olan fitoplazma etmeninin *Ca. Phytoplasma trifolii* olduğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biber, PCR-RFLP, enzim, karakterizasyon, fitoplazma

ABSTRACT

MSc Thesis

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PHYTOPLASMAS WITH MOLECULAR METHODS IN THE FIELDS OF PEPPER IN SANLIURFA PROVINCE

Zehra MEZRELİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Year: 2019, Page:38

This study was carried to detect and characterize phytoplasma in pepper plant showing phytoplasma like symptoms in pepper production areas in Şanlıurfa. A total of 28 samples were collected and tested from pepper plants showing symptoms such as yellowing, shortening of the nodes, stunting, small leaf formation, and phytoplasma-like symptoms in pepper cultivated areas of Bozova, Haliliye, Siverek, and Birecik districts. Total DNA obtained from collected samples was analyzed by Direct PR and P1/P7 universal primer pairs and by Nested PCR with R16F2n/R2. At last stage this products was cut with *EcoRI*, *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII* and *TaqI* enzymes. The results of this study indicated that %64.29 of samples were infected with phytoplasma agent which was identified as *Ca. Phytoplasma trifolii*.

KEYWORDS: Pepper, PCR-RFLP, enzym, characterization, phytoplasma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmamın süresi boyunca tecrübeleriyle ve bilgi birikimi ile beni yönlendiren ve maddi ve manevi olarak benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR' e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım boyunca ve tezin her aşamasında bana yardımcı olan Doktora öğrencisi Havva GÜMÜŐ' e, Araştırma Görevlisi Eray ŐİMŐEK 'e ve Yüksek lisans öğrencisi Nesibe KILIÇ 'a ve eğitim hayatım boyunca bana madden ve manen yardımcı olan aileme çok teşekkür ederim.

Ayrıca arazi çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Ziraat Teknikeri Kamil EVCİ ve Ziraat Mühendisi M. Bülent ATILGAN' a çok teşekkür ederim.

Tezin maddi olarak desteklenmesine olanak sağlayan Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü (HÜBAK)'ne teşekkür ederim.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1. Sararma ve Bodurlaşma	18
Şekil 4.2. Yapraklarda sararma, küçük yaprak oluşumu(solda) ve sağlıklı bitki (sağda).....	18
Şekil 4.3. Enfekteli ve sağlıklı bitki (a) ve geriye doğru ölüm (b)	19
Şekil 4.4. Sararma, bodurlaşma ve boğum aralarının kısalması sonucu oluşan görüntü	19
Şekil 4.5. Sararma ve küçük yaprak oluşumu (a,b)	20
Şekil 4.6. Küçük yaprak oluşumu	20
Şekil 4.7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bç uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1 lik agaroz jeldeki görüntüsü: Kuyucuklardaki tüm örnekler biber bitkisinin yaprak orta damarından elde edilmiştir. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 16. Örnekler pozitif , M: Marker).....	21
Şekil 4.8 R16F2n/R2 ile çoğaltılan PCR ürünlerinin EcoRI enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel(%2.5) görüntüsü . 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 19, 20, 21, 24 nolu kuyucuklar çalışmada kullanılan biber bükilerinden alınan örneklerin 750 ve 500 bç uzunluğundaki RFLP deseni .M: GeneRuler 100 bç DNA Ladder.	22
Şekil 4.9 R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin sanal RFLP kullanılarak enzimlerle kesilmesi; <i>AluI</i> (A), <i>RsaI</i> (B), <i>HhaI</i> (C), <i>HpaI</i> (D), <i>TaqI</i> (E), <i>HpaII</i> (F) , MW: Marker,	23
Şekil 4.10 Şanlıurfa ili örneklerin toplandığı köyler	24
Şekil 4.11 Dendogram.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. PCR çalışmalarında kullanılan primerler ve dizileri	14
Çizelge 3.2 .Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları.....	15
Çizelge 4.1. Şanlıurfa ilçelerine bağlı köylerden toplanan örneklerin enfekte durumu	26



SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

Da	Dekar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
G	Gram
Ng	Nanogram
mM	Mili molar
Pmol	Piko mol
°C	Santigrat derece
Cm	Santimetre
Dk	Dakika

KISALTMALAR

Bç	Baz çifti (Base pair)
DNA	Deoksiribonüklik asid
RNA	Ribonüklik asid
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
EtBr	Ethidium Bromide
MLO	Mikoplazma Benzeri Organizma (Mycoplasma Like Organism)
NaCl	Sodium Chloride
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA Buffer
UV	Ultraviyole
V	Volt
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
ETOH	Ethanol
ddH ₂ O	Çift distile su
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
SSCP	Single Fragment Length Polymorphism
LP	Latent Period
AAP	Acquisition Access Period

1. GİRİŞ

Biber (*Capsicum annum* L.), patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasından çeşitli tür ve formları olan bir bitkinin meyvesidir. Sıcak ve ılıman iklimlerde yetişebilen biber bitkisi, ılıman iklimlerde tek yıllık olarak yetiştirilebilirken sıcak iklimlerde birkaç yıllık olarak yetiştirilebilmektedir.

Domatesle aynı familyadan olan biber bitkisinin anavatanı Tropikal Amerika olduğu buradan da dünyaya yayıldığı kabul edilmektedir. Özellikle Brezilya, çeşitli tür ve formların orijin merkezidir. Biber bitkisi ilk olarak İspanya'ya girmesiyle beraber yayılması kolaylaşmıştır ve İngiltere, Orta ve diğer Avrupa ülkelerinden sonra Balkanlara getirilmiş ve Türkler tarafından Orta ve Kuzey Afrika ülkelerine tanıtılmıştır.

Morfolojik ve agronomik özelliklerine göre çok sayıda çeşitliliğe sahip olan biber, meyve yapısı ve şekli bakımından farklı kültürlere göre farklı şekillerde tüketilmektedir. (Bozokalfa ve Eşiyok, 2006). Sofralık sivri biber, çarliston, dolmalık, kapyra, yerel biberler, süs biberleri ve turşuluk biber gibi tipleri vardır. Gıda sanayiden ilaç ve boya sanayisine kadar birçok yerde kullanılan biber; salça, közleme, konserve, sos, turşu, toz-pul biber şeklinde işlenmiş olarak kullanılmasının yanında taze ve kurutulmuş olarak da tüketilmektedir. Biber düşük kalorili olup A ve C vitaminlerince zengindir. Kırmızı biberde limondan daha fazla C vitamini bulunmaktadır. İnsan sağlığına açısından bakıldığında vitamin ve minerallerin yanında bibere acı ve yakıcılık tadı veren capsaicin alkolloidi sayesinde antioksidant özelliği taşımaktadır. Bu özelliği sayesinde mide, sinir ve salgı bezlerine iyi gelir ve kan dolaşımı ve basıncını düzenlemek gibi yararları vardır. Biberin insan vücuduna faydasının yanında ekonomik olarak da gelir kaynağı olmaktadır ve bu yüzden birçok ülke üreticiliğini yapmaktadır. Türkiye'de önemli biber üreticilerinden biridir ve özellikle Çukurova, Harran Ovası ve Gaziantep yörelerinde salçalık kapyra biber ve dolmalık biber büyük oranda yetiştirilmektedir.

Ülkemizde salçalık-kapya biber 346.248 da üretim alanı ile üretim miktarı 1.128.060 ton iken dolmalık biber 131.351 da üretim alanı ile 397.175 ton üretilmiştir.

Salçalık-kapya biber 34.009 da üretim alanı ile 102.776 ton, dolmalık biber ise 5.555 da üretim alanı ile 13.225 tonu Şanlıurfa ilinde üretilmiştir (TUİK,2018).

Biber bitkisi tarlada ve serada yetiştirilebilir ancak verimi ortamdaki ilaç ve hastalıklardan ciddi şekilde etkilenir (Dikilitas, Guldur, Deryaoglu, & Ozcan, 2011). Bununla beraber zararlılara karşıda çok hassas bir bitkidir. Biberlerde görülen önemli hastalıklar; biber kök boğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici*), bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bakteriyel benek hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), meyve çürüklüğü ve bazı virüs hastalıklarıdır. Bunun yanı sıra nematodlar, bozkurt (*Agrotis* spp.), danaburnu (*Grylotalpa grylotalpa*), biber gal sineği (*Asphondylia capsici*), yeşil kurt (*Heliothis* spp.), kırmızı örümcekler, sarıçay akarı (*Polyphagotarsonemus latus*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*) ve thrips (*Thrips tabaci*) gibi zararlılar da biber bitkisine zarar vermektedir.

Bu etmenlerin yanı sıra son yıllarda ülkemizde ve dünyada biber yetiştirilen alanlarda sararma, bodurlaşma, yaprak nekrozu, çiçek kısırlığı, çalılışma ve cadı süpürgesi gibi semptomlar sergileyen biber bitkilerinde, moleküler yöntemler vasıtasıyla adına fitoplazma adı verilen bakteriyel patojenler saptanmıştır. Herkesçe bilinen fungal ve virüs patojenlerinin yanı sıra fitoplazmalar son zamanlarda dünya çapında bir çok farklı üründe ciddi bir tehdit olmaktadır (Junqueira, Bedendo & Pascholati, 2004; Margaria ve ark., 2014) ve biber bitkisi de bu tehditten etkilenmektedir.

Daha önceleri mikoplazma benzeri organizma (MLO) olarak adlandırılan fitoplazmalar ilk kez 1967 yılında Doi ve ark. tarafından bildirilmiştir (Lee ve ark.,1992). Fitoplazmalar floemle sınırlı, dünya çapında çeşitli bitkilerde çok sayıda hastalıkla tanınan prokaryotlardır (McCoy ve ark., 1989; Schneider ve ark., 1999).

Karşılaştırılmalı Uluslararası Mikoplazma Araştırma Projeleri Komitesi (IRPCM)'nin Bitki Mikoplazmaları Birimi bu gruba ait prokaryotları tanımlamak için 'fitoplazma' adını vermiş; '*Candidatus Phytoplasma*' cinsi önerilerek bu prokaryotların resmi sınıflandırılması yapılmaya başlanmıştır (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2004).

Virüsler tarafından neden olduğu sanılan bazı bitki hastalıklarının morfolojik olarak insan patojeni olan mikoplazmalara benzeyen ve floemde kolonize olan prokaryotlarla ilişkili olduğu ilk kez 1967 yılında yapılan elektron mikroskop çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Doi ve ark., 1967). Bu patojenlerin tanısı 20 yıldan fazla bir süre mikroskopik gözlemler (DAPI boyama) ya da elektron mikroskopik yöntemleri ile yapılmıştır. Ancak, son 20 yıldır DNA temelli teknolojilerin uygulanmasıyla prokaryotlar içerisinde farklı moleküler kümelerin ayırt edilmesi mümkün olmuştur.

Fitoplazmalar 2 tip nükleik asit (DNA ve RNA) içermektedir ve virüsler ve bakteriler arasında ara form oluşturan tek hücreli canlılardır. Bakterilerden farklı olarak sert bir hücre duvarına sahip değildir ve polimorfik yapıdadırlar. Yaşamları için canlı dokuya ihtiyaç duyan fitoplazmaların büyüklükleri 200-800 nm arasındadır ve G+C oranı düşüktür ayrıca kültüre alınamazlar. Birçok böcek ve bitkide hastalıklara neden olan fitoplazmalar obligat parazit olup, in-vitro koşullarında kullanılan mevcut teknikler ile kültüre alınamazken, 2012 yılında Contaldo ve ark. axenic kültürde fitoplazmaları geliştirmişlerdir (Contaldo ve ark., 2012). Fitoplazmalar dünyada yaklaşık 1000 kadar bitki türünde hastalık yapmaktadır (Seemüller ve ark., 2002) ve dünyada birçok otsu ve odunsu bitkilerde yıkıcı ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Doğada fitoplazmalar Hemiptera takımına bağlı *Cicadellidae*, *Fulgoroidea* ve *Psyllidae* gibi familyalardaki vektör böcekler tarafından taşınmaktadır (Weintraub ve Beanland, 2006) ayrıca aşıyla ya da *Cuscuta* spp. gibi bazı parazitik bitkilerle taşınabildiği de saptanmıştır (Marwitz ve ark., 1974; Heintz 1986).

Bitkilerin floem kanallarında ve böceklerin vücut sıvısında çoğalabilen fitoplazmaların bir sonraki nesle aktarılması böcek yumurtalarıyla gerçekleşebilmektedir. İnsan ve hayvanları enfekte eden mikoplazmalardan 16S ve 23S ribozomal bölgeler arasında kalan boşluk bölgesi ile genetik olarak ayrılabilirler. Önceleri poliklonal antiserum daha sonra da monoklonal antiserumların geliştirilmesi ile fitoplazma grupları arasında ilk farklılıkların ortaya konmasını sağlamıştır (Yavuz,2011).

Fitoplazmalı ile enfekteli bitkiler normal bir bitkinin fizyolojisinden ve davranışından farklı olarak çeşitli belirtiler gösterir. Fitoplazma hastalıkları ürünün kalite ve verimine verdiği yüksek etkilerle beraber dünya çapında önem arz etmektedir (Bertacinni ve ark.,2014).

Enfekteli bitkiler sarılık, cadı süpürgesi, phyllody, yaprak bükülmesi ve geriye doğru ölüm, proliferasyon (aşırı büyüme), beyazlaşma, havai köklerin oluşması, stolbur, bazı çiçeklerde polen tablasının genişlemesi şeklinde belirtiler göstermektedirler.

Bunların dışında konukçu bitkilerde fitoplazma enfeksiyonları büyümeyi baskılar, yaprak boyutunu azaltırlar, boğum aralarını kısaltırlar ve apikal dormansiyi baskılar. Bu etkilerle beraber bitkinin çalışması, sürgün büyümesinde yoğunlaşma, ürün kaybı ve tüm bitkinin gerilemesine hatta kaybına neden olabilir. Hastalıklı bitkilerde görülen yaprağın ve sürgünün sararması gibi belirtiler karetenoidler ve klorofilin yıkılmasıyla ortaya çıkan sararmalardır (Bertamini ve Nedunchezian, 2001).

Şanlıurfa ilinde biber yetiştiriciliği ekonomik anlamda önem arz etmektedir. Bu nedenle bu çalışma Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında fitoplazma etmeninin varlığını saptamak ve karakterizasyonunu yapmak amacıyla yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünyada her yıl büyük oranda kayıplara neden olan fitoplazmalar yüzlerce bitki türünün felaketidir (Lee ve ark. 1997). Fitoplazmalar Tenericutes şubesi, Mollicutes sınıfı, Acholeplasmatales takımı, Acholeplasmataceae familyası içerisinde *Candidatus* cinsine aittirler (Zhao ve ark., 2013). Şu ana kadar fitoplazmalar 19 gruba ve 40'tan fazla alt gruba ayrılmıştır. Bununla beraber 30'dan fazla farklı fitoplazma "*Candidatus*" adı altında sınıflandırılmaktadır (Lee ve ark., 2004, 2006; Al-Saady ve ark., 2008). Fitoplazmalar 100 familyaya ait 700 den fazla bitki türünde floem dokularında kolonize olarak enfekte eder ve floem dokularında yaşarlar (Bai ve ark., 2006). Bu yüzden, fitoplazmalar farklı bitki türleri arasında 300 den fazla farklı hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Sebzelerde, meyve ağaçlarında, süs bitkilerinde, çimlerde bu etmen bulunabilir (McCoy ve ark., 1989; Lee, 1992). Fitoplazma etmeni birçok önemli ürünün verimini kısıtlayan önemli bir faktör olarak düşünülmektedir (Lee ve ark., 2000).

Fitoplazmalar bakterilerden farklı olarak hücre duvarına sahip değildirler onun yerine 3 tabakalı hücre zarı vardır. Boyutları 0.2-0.8 µm arasında değişen çok küçük sıra dışı çaplara sahiptirler ve bitki floemlerinde ve vektör böceklerin özsuyu emici organlarında yaşar ve çoğalırlar. Genom boyutları 600-1300 kb arasında değişir ve düşük G+C oranına sahiptirler (Kollar ve Seemüller, 1989).

Bitki türleri arasında fitoplazmaların taşınması küsküt (*Cuscuta* spp.) gibi parazitik bitkiler ve de tohumla da olabilmektedir (Khan ve ark., 2002; Botti ve Bertaccini, 2006).

Fitoplazmalar bitkilerde virescence (çiçek taç yaprakların yeşil rengi alması), witches' broom, çiçek kısırlığı ve phyllody (çiçek yerine yaprak benzeri yapıların çıkması) gibi çeşitli semptomlara neden olurlar (Lee ve ark., 2000). Ancak vektör türleri Auchenorrhyncha alttakımı içindeki birkaç familya ile sınırlıdır; Cercopidae, Cixiidae, Derbidae, Delphacidae, Cicadellidae ve Psyllidae (Weintraub and Beanland, 2006). Ayrıca Cicadellidae familyasındaki 88 türün fitoplazma taşıdığı bilinmektedir. Birçok belirti fitoplazmanın böcekte taşınma döngüsünün vektör

böceğin yaşam döngüsüne ve beslenme alışkanlığına (monofag, polifag) bağlı olduğunu göstermiştir. Polifag vektörler monofag olarak beslenen böceklerden daha fazla geniş çapta bitki türünün inokule edebilme potansiyeline sahiptirler. Örneğin polifag yaprak pireleri (leafhopper) tarafından taşınan aster yellows hastalığı geniş bir çapta konukçu dizisini enfekte edebilir (Beanland ve ark., 2000).

Fitoplazmaların kazanılması etkili bitkilerin floeminden beslenen böceklerin beslenmesi boyunca pasif olarak yapılır. Fitoplazmanın gerekli yoğunluğu sağlayabilmesi için geçen süreye Kazanım Sağlama Periyodu (Acquisition Access Period-APP) denir. AAP süresi birkaç dakika sürebilir ama genellikle saatle ölçülmektedir. AAP' nin artması daha fazla fitoplazma edinme fırsatı verir (Purcell,1982).

Daha önce etkili olmayan bir böceğin, etkili bir bitkinin floeminden fitoplazmayı aldıktan sonra başka bir bitkiyi enfekte etme yeteneği kazanması için geçen süre (Latent Periyod) 7-80 gün arasındadır (Murrall ve ark., 1996; Nagaich ve ark, 1974). Fitoplazma enfeksiyonu, fitoplazma etmeni konukçu bitkiye aktarıldıktan yaklaşık 7 gün sonra simptom göstermeye başlar bu durum farklı bitki türlerinin farklı çeşitlerine göre daha da uzun sürebilir (Hogenhout ve ark. 2008; Moya-Raygoza ve Nault, 1998). LP süresi boyunca orta bağırsaktaki epitel hücreleri içindeki hücre içi sistem aracılığıyla hareket edebilir ve bir kese içerisinde çoğalır, veya iki orta bağırsak hücresi arasından geçebilir (Lefol ve ark., 1994). Fitoplazmalar aynı zamanda Malpigi tüplerini (Lherminier ve ark., 1990), yağ kütlelerini ve beyni (Lefol ve ark., 1994; Nakashima ve ark., 1995), üreyici organları (Kawakita ve ark., 2000) ve böceklerin hemolenflerini enfekte edebilir. Geniş bitki ve böcek konukçu aralığıyla birlikte uzun inkübasyon periyodları tahmin edilemez fitoplazma epidemileri yapar (Hogenhout ve ark. 2008).

Böceklerdeki birçok dokuda fitoplazmalar çok sayıda bulunur ve çoğalırlar fakat çoğunlukla tükürük bezlerinde ve bağırsakta bulunurlar ve böceklerin vücudunda kolonize olmak ve çoğalabilmek için bağırsak bariyerlerinden geçmek zorundalardır (Marzachi *et al.*, 2004). Tükürük bezlerindeki hücreleri ve bağırsak

hücreleri fitoplazma ile enfekteli olan böcekler beslenirken bitkiye salgıladığı tükürük aracılığıyla fitoplazmanın bitkinin floemine içerisine girmesini sağlar (Ammar ve Hogenhout, 2006; Hogenhout ve ark. 2008).

Fitoplazmalar bitkileri olumsuz olarak etkilemesine rağmen, böcek vektörlerin formda ve hayatta kalma konusunda nötr ya da pozitif etkiye sahip olabilir. Bazı çalışmalar vektör böceklerin besin kaynağı yokluğunda ve düşük sıcaklığın maruz kaldığı durumlarda fitoplazma enfeksiyonlarından yararlanabildiğini göstermiştir (Murrall ve ark. 1996; Madden ve ark. 1984; Ebbert ve Nault, 1994).

Konukçu bitkilerde fitoplazma enfeksiyonları birçok simptome neden olur. Örneğin, phyllody; taç yaprakların anormal şekilde gelişerek çanak yaprak benzeri yapıların oluşması (Mor ve Zieslin, 1992), virescence; bitkinin çiçeğinde ya da sürgününden yeşil pigmentin anormal gelişimi (Lee ve ark, 2000), witches' broom (cadı süpürgesi); bir noktadan birden fazla sürgünün çıkması, proliferation(aşırı çoğalma); bitki hücrelerinin hızla çoğalması sonucu çok sayıda alt dalın ve gövdenin çıkması ve karbonhidrat sentezi ve taşınımındaki değişikliklerin neden olduğu düşünülen sararma bazı belirtileridir. Bu belirtilerle beraber fitoplazmalar stresden kaynaklı küçük yaprak, kloroz, boğum aralarının kısalması, meyvelerin bozulması ve büyüme geriliği gibi spesifik olmayan belirtilere de neden olabilir (Lee ve ark., 1997; Pracros ve ark., 2006).

Önceden fitoplazma ile enfekteli bitkilerin tahrip olmasının ana nedeninin aşırı büyüyen bakterilerin bitki besinini kullanmasından dolayı olduğu düşünülmekteydi (Strauss,2009). Ancak fitoplazma tarafından salgılanan proteinlerin bazılarının bitki hücrelerinin nükleusuna girdiği ve bitki genlerinin ekspresiyon kalıbında değişikliklere neden olduğu görülmüştür (Xiaodong ve ark. 2007; Hoshi ve ark. 2009). Bu çoğu zaman normal bitki gelişimi ile etkileşime neden olan hastalığın belirtileri ile tutarlıdır; bitkinin vejetatif gelişimini tetikleme, üreme gelişimini baskılama gibi. Bundan dolayı bitki daha fazla yaprak, dal ve sürgün oluşturur. Bitki çoğu zaman çalılışır ve çok yoğun bir şekilde dallanarak “witches' broom (cadı süpürgesi)” görünümüne dönebilir.

Moleküler tekniklerin uygulanmasından önce hastalıklı bitkilerde fitoplazmaları saptamak zordu ve bu yüzden simptomatoloji var olan fitoplazma etmenini teşhisi için birincil önemli adımdı (Bertaccini ve Duduk, 2010; Naghmeh ve Ganesan, 2013). Fitoplazmaların teşhis teknikleri 1980'lerin başına enzyeme-linked immunorbent assay (ELISA) metoduna bağlı olarak yayılmaya başlanmıştır. ELISA çok sayıda örneğin görüntülenmesi için kullanışlıdır ve bitki virüsleri ve spiroplasma çalışmalarında geniş çapta kullanılmaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle beraber, enfekteli bitkilerde fitoplazmaları saptamak kolay ve güvenilir olmuştur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction- PCR) 1971 yılında Kleppe ve ark. tarafından açıklanan moleküler bir tekniktir. PCR temel olarak birkaç saat içerisinde tek bir DNA molekülünden milyarlarca kopyalanması esasına dayanır. PCR 1990 yılında Deng ve Hi tarafından fitoplazmalarda başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Son zamanlarda PCR'ye dayalı nükleik asit teknikleri bitkilerde ve böceklerde fitoplazmaların saptanmasında en verimli ve yaygın teşhistir (Smart ve ark., 1996). PCR çalışmaları korunmuş bölgelere dayanmaktadır (16S rDNA, ribosomal protein, tuf, 16S-23S bölgesi) ve çeşitli konukçu bitkilerden ve böceklerden bilinen ve bilinmeyen fitoplazmaları saptamak ve tanılamak için kullanılmaktadır (Deng ve Hiruki, 1991; Ahrens ve Seemüller, 1992; Lee ve ark., 1993; Schnieder ve ark., 1993; Wang ve ark., 1994;). 16S rDNA bölgesini hedefleyen universal grup spesifik primerler çok geniş bir çapta bitki ve vektör içerisindeki en küçük fitoplazma miktarını sağlayabilen daha hassas ve verimli araçlar sağlamaktadır.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 16S rRNA gen dizilimine dayalı olan belli fitoplazma ırklarının moleküler karakterizasyonunu ve saptanmış tüm fitoplazmaların tanılanmasında kullanılan yaygın bir yöntemdir. Fitoplazmaların ribozomal gruplarını ve alt gruplarını ayırt etmek için 17 tane restriksiyon enzimi kullanılmaktadır. Hepsinin içerisinde en aydınlatıcı restriksiyon enzimleri; *AluI*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *RsaI* ve *TaqI*' dir.

Single Fragment Length Polymorphism (SSCP), PCR ile çoğaltılmış fragmanlardaki genetik varyasyonların tespiti için hassas ve hızlı olan PCR bazlı bir yöntemdir. SSCP ayrıca, moleküler değişkenlikteki fitoplazmaların tespitinde de uygulanabilir (Orita ve ark.1989).

Hindistan, Yeni Delhi’de yapılan bir çalışmada biber bitkilerinde witches’ broom (cadı süpürgesi) ve küçük yaprak oluşumu gözlenmiştir ve aynı zamanda patlıcan bitkisinde de küçük yaprak oluşumu görülmüştür (Rao ve ark., 2017).

Hindistan’da kırmızı biberler de ‘*Ca. P. asteris*’, 16SrII-D; (Khan ve Raj 2006; Sharma ve ark., 2015), Endonezya’da ‘*Ca. P. aurantifolia*’, (Harling ve ark. 2009), Çin’de 16SrI-B; (Li ve ark., 2013), Meksika’da *Ca. P. asteris*’, ‘*Ca. P. trifolii*’; (Randall ve ark., 2009; Santos-Cervantes ve ark., 2008), Rusya’da 16SrXII-A; (Ember ve ark. 2011), İran’ da ‘*Ca. P. aurantifolia*’; (Faghihi ve ark., 2016), Avusturalya’da 16SrII; (Tran- Nguyen ve ark., 2003) ve İspanya’da ‘*Ca. P. trifolii*’; (Castro ve Romero, 2002) gibi farklı fitoplazma ırkları birçok ülkede tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

Küba’da Holguín eyaletinde yapılan bir çalışmada çalılışan dolmalık biberlerin %15’inde *Ca. Phytoplasma asteris* görülmüştür (Arocha, 2007).

Bosna Hersek’in Semberija eyaletinde fitoplazma varlığını saptamak için nested-PCR/RFLP kullanılarak simptom gösteren ve göstermeyen biber ve kereviz örnekleri toplanılarak testlenmiştir. Kereviz (*Apium graveolens*) ve biberde (*Capsicum annuum*) yapılan çalışmalarda “Giant Prague” kereviz çeşidinde çalılışma ve yapraklarda beyazlama görülürken, Fortesa, Niška Šipka ve Amanda çeşidi biberlerde yaprak sararması ve çalılışma görülmüştür. *TruI* ve *HpaII* enzimleri kullanılarak test edilen, tüm simptom gösteren örneklerde 16S rDNA RFLP sonuçları *Ca. Phytoplasma solani* varlığını saptamıştır (Delic’ ve ark, 2016).

Candidatus Phytoplasma trifolii İspanya’da biber alanlarında ve Ürdün’de domates alanlarındaki hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Anfoka ve ark 2003; Castro ve Romero, 2002).

Lübnan'ın Beka Vadisi'nde yapılan bir çalışmada fitoplazma ile infekteli olduğu düşünülen biberlerde çalılışma, sararma ve dalgalı yaprak kenarları ile beraber küçük yaprak oluşumu görülmüştür (Choueiri ve ark. 2007).

Biber (*Capsicum annuum* L.) dünya çapında yetiştirilen tarım ürünüdür ve birçok solanaceous türü gibi, bir fitoplazma hastalığı olan stolbur'dan etkilenebilir (McCoy ve ark., 1989; Fos ve ark., 1992). Bu hastalığın belirtileri boğum aralarının kısalması, çokça büyüyen yeşil çiçeklerin oluşumu, çanak yaprakların ayrılamaması sonucu oluşan bozuk gelişim ve meyve setindeki bozukluklar bu hastalığın belirtileridir (Cousin, 1980; Schneider ve ark. 1993).

İspanya'da, Ebro nehri bölgesinde tarlalarda biber stolbur hastalığı görülmüş ve fitoplazma enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Castro ve Romero, 1996).

Polimeraz zincir reaksiyonu, dizileme ve filogenetik analiz ile DNA amplifikasyonu, stolbur grubundan (16SrXII) açıkça farklı olan Clover proliferasyon, fitoplazmasının 16SrVI grubu içinde sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir (Castro ve Romero, 2001).

Adana ve Hatay'da patlıcan, biber ve ceviz menekşesinde stolbur belirtileri ile susamda fillodiye neden olan etmenin *Ca. Phytoplasma trifolii*'nin neden olduğu saptanmıştır (Sertkaya ve ark., 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller

Çalışmada kullanılan bitkiler Şanlıurfa ili biber yetiştiriciliği yapılan Birecik, Bozova, Haliliye ve Siverek ilçelerine bağlı biber üretimi yapılan tarlalardan toplanan örneklerden oluşmuştur.

Laboratuvar çalışmaları Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için kullanılan materyal

Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin yapraklarından elde edilen total DNA'lar ve DNA eldesinde kullanılan kimyasallar, PCR ve RFLP çalışmaları için materyal olmuştur.

RFLP çalışmalarında *EcoRI*, *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII* ve *TaqI* (Thermo Scientific, ABD), enzimleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması

Şanlıurfa iline bağlı Birecik, Bozova, Haliliye ve Siverek ilçeleri biber üretim alanlarından 2018 yılı haziran-ağustos ayları arasında örnekler toplanmıştır. Biber bitkilerinde sararma, bodurlaşma, küçük yaprak oluşumu ve boğum aralarında kısılma gösteren ve fitoplazma ile bulaşık olduğu düşünülen bitkilerden güdümlü örnekleme yapılarak toplanmıştır. Birecik ilçesine bağlı 1 köyden 3 farklı araziden 3 örnek, Bozova ilçesine bağlı 3 köyden 3 örnek, Haliliye ilçesine bağlı 14 köyden ve farklı arazilerden 20 örnek ve Siverek ilçesine bağlı 1 köyden 2 örnek alınmıştır.

Negatif kontrol olarak simptom gösteren bitkilerle beraber hiçbir belirti göstermeyen sağlıklı biber bitkilerinden de örnekler alınmıştır.

Fitoplazma ile enfekteli olduğu düşünülen örnekler yer ve tarih yazılarak ayrı ayrı polietilen poşetlere konulup laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirildikten sonra kayıt altına alınıp, testleninceye kadar +4°C de muhafaza edilmiştir.

Toplanan örneklerin yaprak orta damarları ve saplarından 1 g olacak şekilde alınarak total DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.2. Total DNA ekstraksiyonu çalışmaları

Total DNA ekstraksiyonu çalışmalarında Ahrens ve Seemüller (1992)'in kullanmış olduğu yöntem baz alınarak, bazı değişikliklerle beraber uygulanmıştır.

a- Bitkilerin yaprak orta damarları ve küçük yapraklarından alınan örnekler (1 g için 6 ml) CTAB buffer (EK-1) ile ekstraksiyon poşetinde ezilmiştir.

b- Ekstraksiyon poşetlerinde ezilen örneklerden 600 mikrolitre alınıp, 1.5. ml lik Eppendorf tüplerine konulmuş ve 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

c- Santrifüj yapılan örneklerin üste kalan sıvı kısmından 600 mikrolitre alınarak yeni Eppendorf tüplere aktarılmış ve 35 dakika 65 °C de su banyosunda inkübe edilmiştir.

d- İnkübasyonu takiben tüpler içerisine 600 mikrolitre chloroform / izoamylalkol (24:1) eklenerek 1-2 dakika vortex yapılmıştır.

e- Vortexlenen tüpler 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

f- Santrifüjden alınan örneklerin üste kalan sıvı kısmından 300 mikrolitre alınarak yeni Eppendorf tüplere aktarılıp üzerine 300 mikrolitre soğuk isopropanol ilave edilip -20 °C de 1 saat bekletilmiştir.

g- Daha sonra tüpler 12.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

h- Santrifüjden alınan tüplerin sıvı kısmı dökülerek tüpler oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından 1.000 mikrolitre etanol eklenerek 15.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.

i- Santrifüjden alınan tüplerin sıvı kısmı dökülüp elde edilen pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan pellet 50 µl TE (1X) buffer içinde çözdürülmüş ve elde edilen total DNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C de saklanmıştır.

3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonlarının ayarlanması

PCR çalışmaları 200 µl' lik PCR Eppendorf tüplerinde 50 µl hacimde yürütülmüştür. PCR çalışmalarında kullanılan DNA miktarları, nükleik asit izolasyonu sonucunda elde edilen yoğunluk dikkate alınarak 1/20 oranında sulandırılmıştır.

Hedef bölgelerin çoğaltımı için gerekli olan ve 100'er mM Deoksiribonükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lar dan 20' şer µl alınarak 25 mM olan 80µl lik dNTP karışımına 120µl ddH₂O ilave yapılarak 200 µl ye tamamlanmıştır. Bu karışım sonucunda dNTP' ler 20 Mm olarak elde edilmiştir. DNA'nın çoğaltılma işlemleri sırasında kullanılan Green Buffer son hacimde 1X konsantrasyonda, Dream Taq DNA Polimeraz (5u/µl) enzimi 1,25u ve son olarak ddH₂O ile son hacmi 50 µl olacak miktarda kullanılmıştır.

3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR)

PCR çalışmaları korunmuş bölgelere dayanmaktadır (16Sr DNA, ribosomal protein, tuf, 16S-23S bölgesi) ve çeşitli konukçu bitkilerden ve böceklerden bilinen ve bilinmeyen fitoplazmaları saptamak ve tanılamak için kullanılmaktadır (Deng ve Hiruki, 1991 ; Ahrens ve Seemüller, 1992; Lee ve ark., 1993b; Schnieder ve ark.,

1993; Wang ve ark., 1994;). 16S rDNA bölgesini hedefleyen universal grup spesifik primerler çok geniş bir çapta bitki ve vektör içerisindeki en küçük fitoplazma miktarını sağlayabilen daha hassas ve verimli araçlara olanak sağlamaktadır. 1/50 (V/V) oranında 1X TE ile sulandırılarak total nükleik asit olarak elde edilen DNA'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) çalışmalarında kullanılmıştır. Fitoplazmaların saptanması, teşhisi ve sınıflandırılması 16SrDNA bölgesine göre PCR-RFLP, Nested-PCR gibi moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Direkt-PCR'de 1800 bp ürün veren universal P1/P7 primerleri, Nested-PCR'de R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizileri Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR çalışmalarında kullanılan primerler ve dizileri

	DNA uzunluğu	Primerler	Baz dizilimi(5'-3')	Referans
Direkt PCR	1800 bp	P/1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A-3'	(Deng ve Hiruki,1991)
		P/7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	(Schneider ve ark., 1995)
Nested PCR	1248 bp	R16F2n	5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'	(Lee ve ark., 1995)
		R16R2	5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'	(Lee ve ark., 1995)

Daha sonra PCR tüpleri daha önceden programlanmış olan thermocycler cihazına konulmuştur. Thermocycler programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı (annealing temperature) primerlerin tm değerlerine göre hesaplanıp uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan PCR koşulları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları

Primer	İlk Denatürasyon	Denetürasyon	Primer Bağlanması	Uzama	Son Uzama
	(1 döngü)		35 döngü		(1 döngü)
P1	94 °C 3 dk	94°C 1 dk	50°C 2 dk	72°C 3 dk	72°C 10 dk
P7					
R16F2n					
R16R2	95 °C 3 dk	94°C 1 dk	55°C 2 dk	72°C 3 dk	72°C 10 dk

Çalışma sonucunda çoğaltılan universal PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılıp çoğaltılan üründen 1 µl alınarak Nested PCR analizlerinde hedef DNA olarak kullanılmıştır. Nested PCR çalışmaları yukarıda belirtildiği şekilde yürütülmüştür ve ardından Nested PCR sonucunda çoğaltılan DNA'lar 1X'lik TAE'de (pH: 8.3) hazırlanmış olan agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.2.5. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi (RFLP)

RFLP analizlerinde PCR çalışmalarında kullanılan ve elektroforez yöntemi ile görüntülenen DNA örnekleri kullanılarak önce *EcoRI* enzimiyle kesilerek etmenin fitoplazma olup olmadığı belirlenmiştir (Nejat ve ark., 2009). Ardından fitoplazma olduğu belirlenen örnekler sırasıyla *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaI*, *HpaII* ve *TaqI* enzimleriyle kesilmiştir. RFLP çalışmalarında enzimin temin edildiği firmanın (Thermo Scientific, ABD) tavsiye ettiği protokol dikkate alınarak uygulanmıştır.

RFLP çalışmalarında *EcoRI* enzimi için; 10 µl PCR ürünü 14 µl ddH₂O ile sulandırılmış, 2 µl 10X buffer ve 4 µl restriksiyon enzimi ilave edilmiştir. Enzimin geni hedef noktadan kesilmesi (G↓A A T T C / C T T A A↑G) için örnekler 37 °C 4 saat inkübe edildikten sonra örnekler 1X 'lik TAE (pH 8,3) içerisinde hazırlanmış olan %2'lik agaroz jelde koşturulmuş ve fitoplazma ile enfekteli çıkan örnekler *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII*, *TaqI* ve *TruI* enzimleriyle kesilerek işleme devam edilmiştir.

Alu1, *Rsa1*, *Hha1*, *HpaII*, *TaqI* ve *TruI* enzimleri için; 10 µl PCR ürünü, 18 µl ddH₂O, 2 µl 10X buffer ve 2 µl restriksiyon enzimi ilave edilmiştir. Enzimlerin gen üzerindeki hedef noktayı kesmesi için *Alu1* (A G↓ C T / T C ↑ G A), *Rsa1* (G T↓ A C / C A↑ T G), *HhaI* (G C G ↓ C / C ↑ G C G) ve *HpaII* (C↓ C G C / G G C↑ C) ,enzimlerinde kullanılan örnekler 37 °C ‘de 4 saat ve *TruI* (T↓ T A A / A A T ↑ T)ve *TaqI* (T↓ C G A / A G C ↑ T) enzimleri ile kesilen örnekler 65 °C de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler daha sonra 1X’lik TAE (pH 8,3)’ de hazırlanmış olan %2’lik agaroz jelde koşturularak görüntülenmiştir.

3.2.6. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışmalarında PCR ve RFLP ürünleri görüntülenmiştir. Nested- PCR ürünleri % 1’lik olarak 1X’lik TAE (pH 8.3, EK2) de hazırlanan agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra, (1994)’e göre yapılmıştır. Buna göre aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

a- 0.8 g agaroz tartılıp 80 ml’lik TAE buffer içerisine ilave edilmiştir.

b- Agaroz- TAE buffer karışımı homojen bir şekilde çözülünceye kadar mikro dalga fırında ısıtılmıştır.

c- Isıtılan karışım 40°C olana kadar soğumaya bırakıldı ve ardından elektroforez ünitesine taraklar yerleştirilip karışım dökülmüştür.

d- Jel donduktan sonra (20-25 dk sonra) taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılıp jelin üzeri 1-2 mm kadar olacak şekilde tanka 1X TAE buffer eklenmiştir.

e- Jeldeki çukurların içerisine 6 µl’lik örnekler yerleştirilmiştir. İlk çukura 6 µl’lik DNA Ladder konulmuştur. Yükleme tamponundaki sarı ren jelin sonuna gelene kadar jel tankına 85 volt akım verilmiştir.

f- Koşum işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 5 dakika 1000 ml H₂O +50µl EtBr (10mg/ml) karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla EtBr uzaklaştırıncaya kadar 5 dakika distile su içinde tutulmuştur. Sonuçlar UV transillminatör ile görüntülenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Survey çalışmaları ve örnekleme

Bu çalışma Şanlıurfa iline bağlı Birecik, Bozova, Haliliye ve Siverek ilçelerinde biber üretimi yapılan alanlarda, fitoplazma etmeninin bitkilerde neden olduğu belirtilere bakılarak, semptom gösteren biber bitkilerinden örnekler (güdümlü örnekleme) alınmıştır. Bu alanlarda yaygın olarak göze çarpan semptomlar sararma, bodurlaşma, küçük yaprak oluşumu, birden fazla sürgün oluşması şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 4.1 Sararma ve bodurlaşma(a,b)



Şekil 4.2. Yapraklarda sararma, küçük yaprak oluşumu(solda) ve sağlıklı bitki (sağda)



Şekil 4.3. Enfekteli ve sağlıklı bitki (a) ve geriye doğru ölüm (b)



Şekil 4.4. Sararma, bodurlaşma ve boğum aralarının kısalması sonucu oluşan görüntü



Őekil 4.5. Sararma ve kűçük yaprak oluŐumu (a, b)



Őekil 4.6. Kűçük yaprak oluŐumu

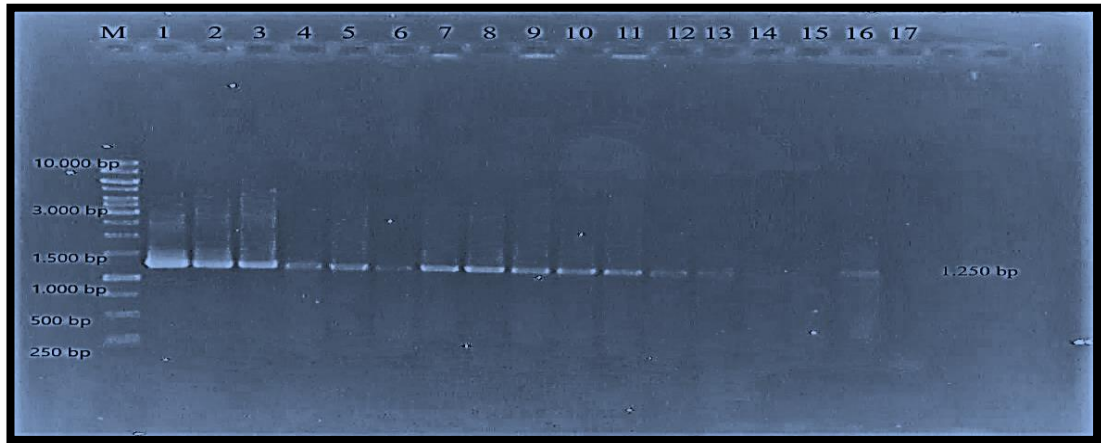
4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Total nükleik asit izolasyonu

Biber bitkilerinde fitoplazma etmenini saptamak amacıyla belirti gösteren bitkilerin yaprak orta damarından ve gelişmemiş üst yapraklardan total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Total nükleik asit izolasyon çalışmalarında Ahrens ve Seemüler'in (1992) kullanmış olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

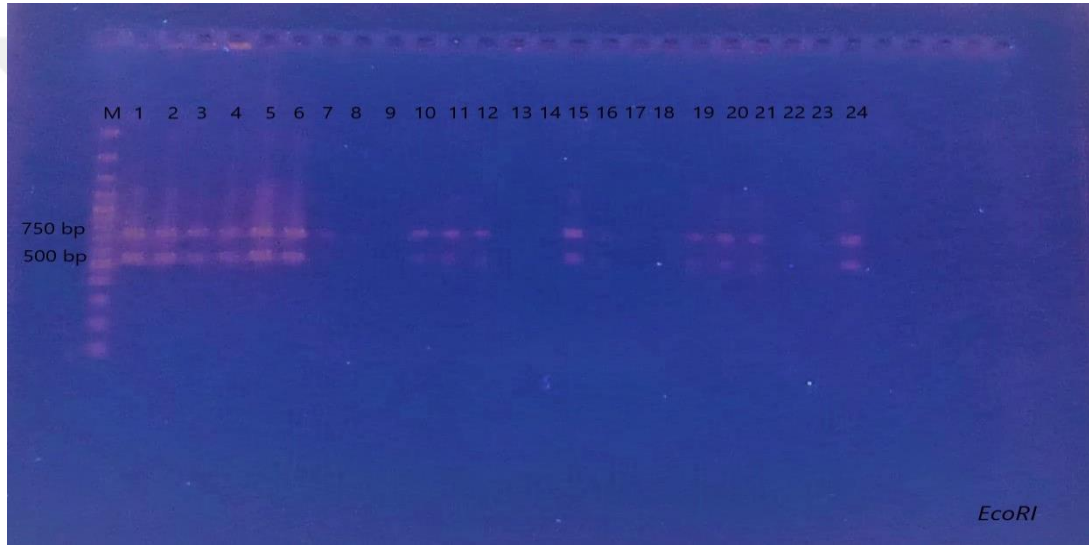
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işlemi Direkt PCR ve Nested PCR olarak 2 aşamada yapılmıştır. Direkt PCR'DA 1.8 kb ürün veren universal P1/P7 primerleri, Nested PCR'da ise 1.25 kb ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) bitkilerinin DNA'sı, negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerinden alınan örnekler kullanılmıştır. Direkt PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak Nested PCR yapılmıştır ve yaprak orta damarlarından alınan örneklerde beklenen düzeyde bant (1250 bp) gözlenmiştir.



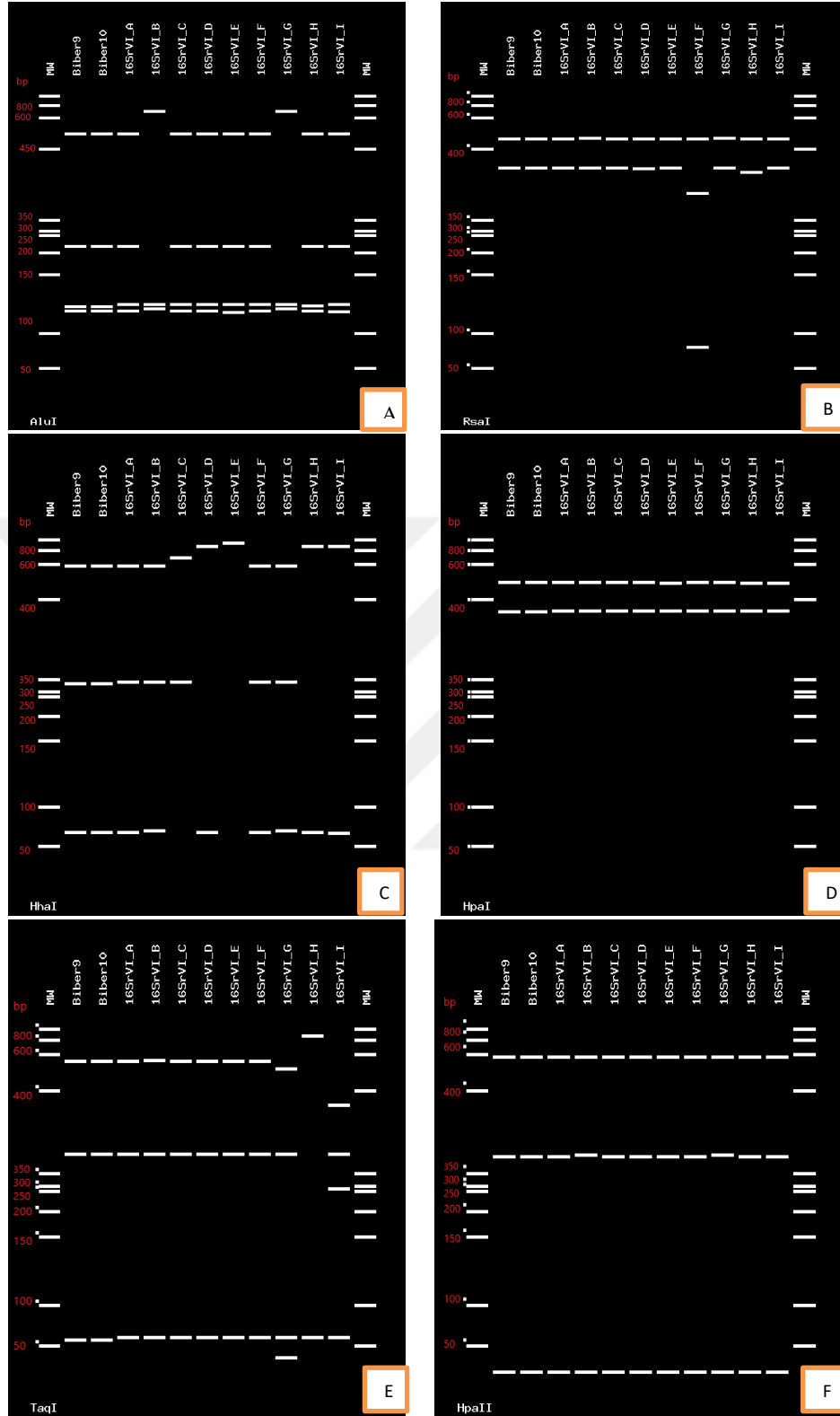
Şekil 4.7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bp uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1 lik agaroz jeldeki görüntüsü: Kuyucuklardaki tüm örnekler biber bitkisinin yaprak orta damarından elde edilmiştir. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 16. Örnekler pozitif , M: Marker)

4.2.3. Sınıflandırma ve iPhyClassifier programında dizi analizi

PCR analizleri sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek beklenen düzeyde (1250 bç) bant veren DNA örnekleri etmenin fitoplazma olup olmadığı konusunda kesin bir sonuca ulaşmak için *EcoRI* endonükleaz enzimi ile kesilmiştir (Nejat ve ark., 2009). Analiz sonucunda pozitif olarak saptanan Nested PCR ürünleri *EcoRI* endonükleaz enzimi ile kesildiğinde 750 bp ve 500 bp'lik bantlar halinde kesilme gözlenmiştir ve etmenin fitoplazma olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. R16F2n/R2 ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *EcoRI* enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2.5) görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 15, 19, 20, 21, 24 nolu kuyucuklar çalışmada kullanılan biber bikilerinden alınan örneklerin 750 ve 500 bç uzunluğundaki RFLP deseni .M: GeneRuler 100 bç DNA Ladder.



Şekil 4.9. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin sanal RFLP kullanılarak enzimler ile kesilmesi; *AluI*(A), *RsaI*(B), *HhaI*(C), *HpaI*(D), *TaqI*(E), *HpaII*(F) , MW: Marker,

4.2.4. Toplanan örneklerde fitoplazma tespiti

Nested PCR sonuçlarına göre araştırma yapılan Şanlıurfa iline bağlı Birecik, Bozova, Haliliye ve Siverek ilçelerinde biber üretim alanlarında testlenen 28 örnekten 18 tanesi fitoplazma ile enfekteli olarak saptanmıştır. Birecik ilçesinden alınan 3 örnekten 3 tanesi pozitif, Bozova ilçesine bağlı 3 örnekten 2 tanesi pozitif 1 negatif, Haliliye ilçesine bağlı 20 örnekten 11 tanesi pozitif 9 tanesi negatif ve Siverek ilçesine bağlı 2 örnekten 2 sinin fitoplazma ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda toplanan örneklerin %64.29' u pozitif bulunmuş ve var olan fitoplazma etmeninin *Ca. Phytoplasma trifolii* olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.40. Şanlıurfa ili örneklerin toplandığı köyler

Yaptığımız bu çalışma Meksika'nın Zacatecas şehrinde biber (Mauricio-Castillo ve ark., 2015) ve domates (Reveles-Torres ve ark., 2018) bitkilerinde yapılan çalışmanın sonucuyla benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmada simptom gösteren biber ve domates örnekleri direkt PCR ve Nested PCR analizlerinden sonra RFLP yapılmıştır. RFLP çalışmalarında *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI (ThaI)*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI (MboI)*, *MseI*, *RsaI*, *SspI* ve

TaqI endonükleaz enzimleriyle kesilen biber ve domates örneklerindeki fitoplazmanın *Ca. Phytoplasma trifolii* olduğu saptanmıştır.

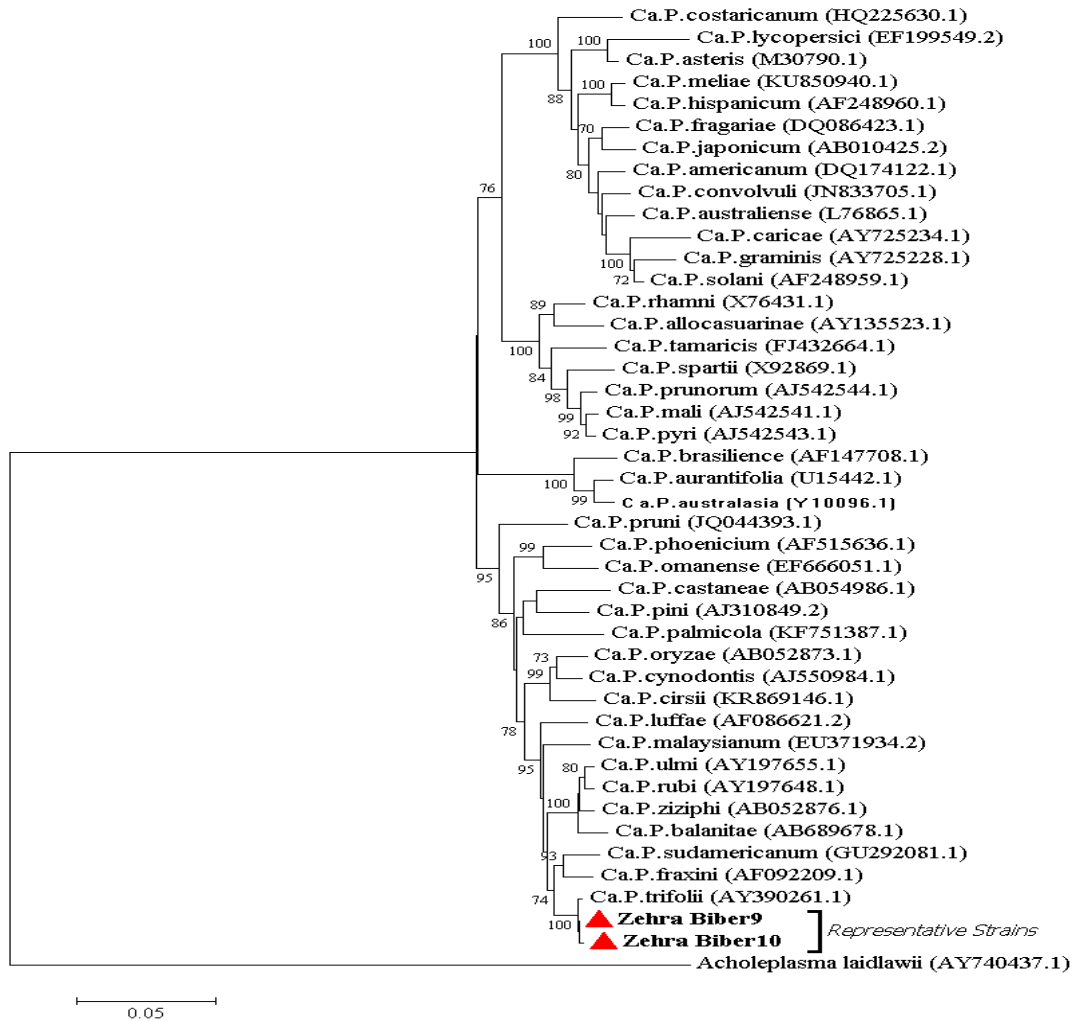
Santos-Cervantes ve ark. (2008) Meksika'da yaptıkları çalışmada, biber ve domates bitkilerinde çalışma ve küçük yaprak oluşumuna neden olan etmeni saptamak için PCR ürünlerini RFLP çalışmalarında *HaeIII* ve *TaqI* restriksiyon enzimleri ile kesmiş ve var olan etmenin *Ca. Phytoplasma asteris* olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.3. Şanlıurfa ilçelerine bağlı köylerden toplanan örneklerin enfekte durumu

Örneğin toplandığı tarih	İlçe-Köy	Örnek sayısı	Pozitif çıkan örnek sayısı	Negatif çıkan örnek sayısı
28.06.2018	Haliliye – Gülveren	3	0	3
	Haliliye – Üçkonak	1	0	1
	Haliliye – Hasankent	1	0	1
05.07.2018	Haliliye – Ulubağ	3	2	1
	Haliliye – Göktepe	1	1	0
17.07.2018	Bozova- Yaylak	1	1	0
	Bozova – Çakmak	1	0	1
	Haliliye -Şanlı Mezrası	1	0	1
19.07.2018	Birecik – Akarçay	3	3	0
	Bozova – Şanlıavşar	1	1	0
23.07.2018	Haliliye – Mutluca	1	1	0
	Haliliye – Boydere	1	1	0
26.07.2018	Siverek – Başbük	2	2	0
	Haliliye – Koçak	1	1	0
	Haliliye – Eğerkırın	2	2	0
	Haliliye – Kalecik	2	2	0
	Haliliye – Gürpınar	1	1	0
	Haliliye – Konaç	1	0	1
	Haliliye – Ortaören	1	0	1
Toplam		28	18	10

4.2.5. Sekans analizi ve dendrogram

R16F2n/R2 dizileri, veritabanı araştırması için NCBI-blast programına gönderilmiştir. BLAST ve dizi analizleri 28 tane örnek arasından 2 tane çoğaltılmış PCR ürünü seçilerek yürütülmüştür. Şanlıurfa iline bağlı köylerden toplanan biber örneklerindeki nükleotid dizilimi *Candidatus* Phytoplasma trifolii (16SrVI grup) ile %99-100 arasında bir benzerlik olduğu bulunmuştur. Bu diziye dayalı olarak, Şanlıurfa'da biber yetiştirilen alanlardan toplanan örnekleri temsil edecek şekilde gönderilen 2 biber örneğinde fitoplazmaların 16SrDNA dizilimlerini içeren filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Resim). Filogenetik ağaç, örnekleri temsil eden 2 PCR ürününün 16SrRNA bölgesinin gen dizileri NCBI Genbank' taki *Ca.* Phytoplasma 16Sr grubu temsilcilerinin 16'sıyla kıyaslanıp neighbor-joining analizleri ile oluşturulmuştur.



Şekil 4.11. Dendrogram

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında var olan fitoplazma etmeninin/etmenlerinin saptanması ve karakterizasyonunu yapmak amacıyla yürütülmüştür. Haziran, temmuz ve ağustos ayları boyunca biber üretim alanlarında bodurlaşma, yapraklarda sararma ve kloroz, boğum aralarının kısalması, çoklu sürgün oluşumu sonucu çalılışma gibi fitoplazma benzeri simptom gösteren biber bitkilerin vejetatif aksamından örnekler alınmıştır. Güdümlü örnekleme ile 28 örnek toplanmış ve testlenmiştir. Toplanan örneklerin DNA izolsayonu, PCR ve RFLP sonuçlarına göre etmenin fitoplazma olduğu saptanmıştır. Belirlenen fitoplazma etmeninin *Ca. Phytoplasma trifolii* ile %99.8 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Biber bitkilerinin fitoplazma ile bulaşıklılığının belirlenmesinde sararma, bodurlaşma ve küçük yaprak oluşumu gibi simptom gösteren örnekler alınmalıdır.

Biberlerin fitoplazma ile bulaşıklılığının belirlenmesinde Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında örnekleme yapılabilir.

Biberlerde fitoplazma etmeninin alternatif konukçularının, böcek vektörlerinin ve yabancı ot konukçularının belirlenerek fitoplazmanın olası risklerinin azaltacak kontrol stratejileri geliştirilmelidir.

Şanlıurfa ilinde farklı biber çeşitlerinin fitoplazma hastalığına dayanıklılığının belirlenerek biber verimi ve kalitesi üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması zorunlu çalışma olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

- AHRENS, U. and SEEMÜLLER, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. *Phytopathology*, 82(8): 828-832.
- AL-SAADY, N. A. , KHAN, A. J., CALARI, C., AL-SUBHI, A. M. and BERTACCINI, A., 2000. 'Candidatus Phytoplasma omanense', associated with witches'-broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 461, 58, 461-466
- AMMAR, E. D. and HOGENHOUT, S. A., 2006. "Mollicutes associated with arthropods and plants", *Insect Symbiosis*, Vol. 2, pp. 97-118.
- ANFOKA, G. H. A., KHALİL, A. B., & FATTASH, I., 2003. Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. *Journal of Phytopathology*, 151, 223-227.
- AROCHA, Y., PIÑOL, B., PICORNELL, B., ALMEIDA R., AND JONES, P., 2007. Broad bean and sweet pepper: two new hosts associated with Candidatus Phytoplasma asteris (16SrI phytoplasma group) in Cuba, *Plant Pathology* 56, 345, Doi:10.1111/j.1365-3059.01518.x.
- BAI, X., ZHANG, J., EWING, A., MILLER, S. A., RADEK, A. J., SHEVCHENKO, D. V., et al., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 3682-3696.
- BEANLAND L., HOY C., MILLER S. AND NAULT L. (2000). Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(2): 271-276.
- BERTACCINI A, DUDUK B, PALTRINIERI, S, CONTALDO, N., 2014 Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am J Plant Sci* 5(12):46-62.
- BERTACCINI A. and DUDUK B., 2010. "Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research." *Phytopathologia mediterranea* 48(3):355-378.
- BERTACCINI, A., 2007 Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front. Biosci.* 12, 673-689.
- BERTAMINI, M., NEDUNCHEZHIAN, N., 2001. Effect of phytoplasma, stolbur-subgroup (Bois noir- BN)] of photosynthetic pigments, saccarides, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases and photosynthetic activities in field- grow grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, 39(1): 119-122.
- BOTTI S. and BERTACCINI A., 2006. Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. In: (eds). *Abstracts, 16th International Organization of Mycoplasma Conference, Cambridge, UK.* 76.
- BOZOKALFA, M.K., EŞİYOK, D., 2006., Biberin anavatani ve yayılışı. Dünya Yayıncılık, Gıda, Sayı 07:92-93. Bağcılar İstanbul.
- CASTRO S, ROMERO, J., 2002. The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *J Phytopathol* 150(1):25-29.

- CASTRO, S., ROMERO, J., 1996 . Identificación y caracterización del agente causal del 'stolbur' del pimiento. In: Sociedad Española de Fitopatología (eds), VIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, p. 120. Grafitec Publicidad, Córdoba, Spain.
- CHOEIRI, E., SALAR, P., JREIJIRI, F., EL ZAMMAR, S., MASSAD, R., ABDUL-NOUR, H., BOVÉ, J.M., DANET, J.L., FOSSIAC, X., 2007 . Occurrence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon, Eur J Plant Pathol 118:411–416.
- CONTALDO, N., BERTACCINI, A., PALTRINIERI, S., WINDSOR, H. M., WINDSOR, G.D., 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 51 (3): 607–617.
- COUSIN, M. T., 1980. Changes induced by mycoplasma-like organisms (MLO) etiologic agents of the stolbur disease in the different tissues of the anther of *Vinca rosea* L.(Apocynaceae). *Grana* 19, 99-125.
- DELIC', D., CONTALDO, N., LOLIĆ', B., MORAVČEVIC' Đ. and BERTACCINI, A., 2016. First report of 'Candidatus Phytoplasma solani' in pepper and celery in Bosnia and Herzegovina, *Journal of plant pathology*, 98 (1), 171-185.
- DENG, S. and HIRUKI, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53-61.
- DIKİLİTAS, M., GULDUR, M. E., DERYAOĞLU, A., & OZCAN, E., 2011. Antioxidant and oxidant levels of pepper (*Capsicum annuum* cv. Charlee') infected with pepper mild mottle virus. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39, 58. <https://doi.org/10.15835/nbha3925881> (Son erişim tarihi: 27.11.2018)
- DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K., ASUYAMA, H., 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches broom, aster yellows of pawlownia witches broom. *Ann. Phytopath Soc. Japan* 33:259-266.
- EBBERT, M. A. and NAULT, L. R., 1994. Improved overwintering ability in *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) vectors infected with *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae). *Environ. Entomol.* 23: 634-644
- EMBER I., ACS, Z., MUNYANEZA, J.E., CROSSLIN, J.M., KOLBER, M., 2011. Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *Eur J Plant Pathol* 130(3):367–377.
- FAGHIHI, M. M., TAGHAVI, S. M., SAFAEI, A., SIAMPOUR, NAJAFABADI, 2016. First report of a phytoplasma associated with bell pepper big bud disease in Iran. *New Dis Rep* 33:15.
- FOS, A., DANET, J. L., ZREİK, L., GARBIER, M., BOVE, J. M., 1992. Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Dis.* 76, 1092-1096.
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electrophoresis. *Course on Plant Virus Diagnosis*, Adana-Turkey, 89-99p.
- HARLING, R., AROCHA, Y., HARJU, V., TOBING, C., BOA, E., KELLY, P., REEDER, R., 2009. First report of 16SrII 'Candidatus Phytoplasma

- aurantifolia' infecting chilli and tamarillo in Indonesia. *Plant Pathol* 58(4):791.
- HEINTZ, W., 1986. *Cuscuta odorata* an effective vector for mycoplasma-like organisms (MLO). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzen schutzdienstes*, 38: 138-141.
- HOGENHOUT, S. A., OSHIMA, K., AMMAR, E. D., KAKIZAWA, S., KINGDOM, S., and NAMBA, S., 2008. "Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects", *Molecular Plant Pathology*, Vol. 9, No. 4, pp. 403-423.
- HOSHI, A., OSHIMA, K., KAKIZAWA, S., ISHII, Y., OZEKI, J., HASHIMOTO, M., KOMATSU, K., KAGIWADA, S., YAMAJI, Y. and NAMBA, S., 2009. "A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 106, No. 15, pp. 6416.
- IRPCM, 2004. Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-phytoplasma Taxonomy group description of the genus *Candidatus Phytoplasma* a taxon for the wall-less nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology* 54:1243-1255.
- JUNQUEIRA, A., BEDENDO, I., & PASCHOLATI, S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.01.005> (Son erişim tarihi:18.09.2018).
- KAWAKITA H., SAIKI T., WEI W., MITSUHASHI W., WATANABE K. AND SATO M., 2000. Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90(8): 909-914.
- KHAN, A.J., BOTTI, S., AL-SUBHI, A.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E. and BERTACCINI, A., 2002. Molecular identification of a new phytoplasma strain associated with alfafa witches' broom in Oman. *Phytopathology*, 92,1038–1047.
- KHAN, M.S., RAJ, S.K., 2006. First report of molecular detection of an Aster yellows phytoplasma ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') isolate infecting chilli (*Capsicum annuum*) in India. *Plant Pathology* 55(6):822.
- KLEPPE, K., OHTSUKA, E., KLEPPE, R., MOLINEUX, I. and KHORANA, H., 1997. Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56(2): 341-361.
- KOLLAR, A. and SEEMÜLLER, E., 1989."Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases", *Journal of Phytopathology*, Vol. 127, No. 3, pp. 177–186.
- LEE, I. M., DAVIS, R. E., & GUNDERSEN-RINDAL, D. E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221–255.
- LEE, I., M. KLOPMEYER, I. M. BARTOSZYK, D. E. GUNDERSEN-RINDAL, T. CHOU, K. L. THOMSON, and R. EISENREICH, "Phytoplasma induced free-branching in commercial", LEE, I.-M., MARTINI, M., MARCONE, C. & ZHU, S. F., 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the

- phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 337–347,
- LEE, I.-M. and DAVIS R. E., 1992. 23. Mycoplasmas which infect plants and insects. *American Society For Microbiology, Washington, Dc(Usa)*. 379-390.
- LEE, I.-M., DAVIS, R. E. and GUNDERSEN-RINDAL D. E., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes 1. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 221-255.
- LEE, I.-M., HAMMOND, R., DAVIS, R., and GUNDERSEN, D., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83(8): 834-842.
- LEE, M., BOTTNER K. D., SECOR G. and RIVERA-VARAS V., 2006. ‘Candidatus Phytoplasma americanum’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7): 1593-1597.
- LEE, M., KLOPMEYER M., BARTOSZYK I. M., GUNDERSEN-RINDAL D. E., CHOU T.-S., THOMSON K. L. and EISENREICH R., 1997. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature biotechnology*, 15(2): 178-182.
- LEFOL, C., LHERMINIER, J., BOUDON-PADIEU, E., LARRUE, J., LOUIS, C. and CAUDWELL, A. (1994) Propagation of flavescence dorée MLO (Mycoplasma-Like Organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus*. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 285–293.
- LHERMINIER, J., PRENSIER, G., BOUDON-PADIEU, E. and CAUDWELL, A., 1990. Immunolabeling of grapevine flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 79–85.
- LI, Z.N., ZHANG, L., SONG, J.G, Wu, Y.F., 2013. Molecular detection and identification of phytoplasma associated with pepper witches’ broom in China. *Phytoparasitica* 41(4):429–434.
- MADDEN, L. V., NAULT, L. R. and HEADY, S. E., 1984. Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* and *Baldulus* species. *Phytopathology* 73: 1608-1614.
- MARGARIA, P., FERRANDINO, A., CACIAGLI, P., KEDRINA, O., SCHUBERT, A., & PALMANO, S., 2014. Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, Cell & Environment*, 37, 2183–2200. <https://doi.org/10.1111/pce.1233>. (Son erişim tarihi: 08.04.2018.)
- MARWITZ, R., PETZOLD H., ÖZEL M., 1974. Untersuchungen zur Übertragbarkeit des möglichen Erregers der Triebsucht des Apfels auf einen krautigen Wirt. - *Phytopath. Z.*, 81: 85-91.
- MARZACHI, C., MILNE R. G., BOSCO D., 2004. Phytoplasma plant-vector relationships.- *Recent Research Developments in Plant Pathology*, 3: 211-241.
- MAURICIO-CASTILLO, J. A., SALAS-MUÑOZ, S., VELÁSQUEZ-VALLE, R., AMBRÍZ-GRANADOS, S., and REVELES-TORRES, L. R., 2015. ‘Candidatus Phytoplasma trifolii’(16SrVI) en chili mirasol (*Capsicum*

- annuum* L.) cultivado en Zacatecas, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38, 389–396.
- MCCOY, R. E., CAUDWELL, A., CHANG, C. J., CHEN, T. A., CHIKOSWSKI, L. N., COUSIN, M. T., DALE, J. L., DE LEEUW, G. T., GOLINO, D., HACKETT, K. J., KIRKPATRICK, B. C., MARWITZ, R., PETZOLD, H., SINHA, R., SUGIURA, M., WHITCOMB, R. F., YANG, I. L., ZHU, B. M., SEEMUÈLLER, E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb, R. F. and J. G. Tully (eds), *The Mycoplasmas*, Vol. 5; Spiroplasmas, Achleplasmas and Mycoplasmas of Plants and Arthropods, Academic Press, New York. USA. pp. 545-640.
- MOR, Y. and ZIESLIN, N. 1992. Phyllody malformation in flowers of *Rosa hybrida* cv. Motrea: effects of rootstocks, flower position, growth regulators and season. *Journal of experimental botany*, 43(1): 89-93.
- MOYA-RAYGOZA, G. and NAULT, L. R., 1998. "Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae)", *Annals of the Entomological Society of America*, Vol. 91, No. 5, pp. 668–676.
- MURRAL, D. J., NAULT, L. R., HOY, C. W., MADDEN, L. V. and MILLER, S. A., 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89(5): 1223-1232.
- NAGAICH, B., PURI B., SINHA R., DHINGRA M. and BHARDWAJ V. ,1974. Mycoplasma-like Organisms in Plants affected with Purple Top Roll, Marginal Flavescence and Witches' Broom Diseases of Potatoes. *Journal of Phytopathology*, 81(3): 273-279.
- NAGHMEH, N., and GANESAN V., 2013. "Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present." *Journal of Plant Diseases and Protection* 120(1): 16-25.
- NAKASHIMA, K. and HAYASHI T., 1995. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 61(5): 451-455.
- NEJAT, N. K., SIJAM, S.N.A., ABDULLAH, G., VADAMALAI, and DICKINSON, M., 2009. First report of a 16SrXIV, 'Candidatus Phytoplasma cynodontis' group phytoplasma associated with coconut yellow decline in Malaysia. *Plant Pathol.*, 58: 389.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. and SEKIYA T., 1980. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8): 2766-2770.
- PRACROS, P., RENAUDIN, J., EVEILLARD, S., MOURAS, A. and HERNOULD, M., 2006. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1): 62-68.
- PURCELL A. H., 1982. Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1): 397-417.
- RANDALL, J.J., BOSLAND, P.W., HANSON, S.F., 2009. Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of chile peppers. *Plant Dis* 93(9):96.

- RAO,A., GOEL,S., KUMAR ,M. , GOPALA, RAO, G. P., 2017. First report of occurrence of Candidatus Phytoplasma trifolii-related strain causing witches' broom disease of chilli in India, Australasian Plant Dis. Notes, 12: 28
- REVELES-TORRES, L.R., VELÁSQUEZ-VALLE, R., SALAS-MUÑOZ, S., MAURÍCIO-CASTILLO, J.A., ESQUEDA-DÁVILA, K.C.J., HERRERA, M. D., 2018. Candidatus Phytoplasma trifolii (16SrVI) infection modifies the polyphenols concentration in pepper (*Capsicum annuum*) plant issues. *Journal of Phytopathology*. 1–10.
- SANTOS-CERVANTES, M.E., CHÁVEZ-MEDINA, J.A., MENDEZ-LOZANO, J., LEYVA- LOPEZ, N.E., 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Dis* 92(7):1007–1011.
- SCHNEIDER, B. AHRENS, U., KIRKPATRICK, B. C., SEEMUÈLLER, E., 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139, 519-52.
- SCHNEIDER, B., PADOVAN, A., DE LA RUE, S., EICHNER, R., DAVIS, R., BERNUETZ, A. and GIBB, K. 1999. Detection and differentiation of phytoplasmas in Australia: an update. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 333–342.
- SCHNEIDER, B., SEEMÜLLER, E., SMART, C.D. AND KIRKPATRICK, B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*.vol.1, 369-380.
- SEEMÜLLER, E., GARNIER, M. AND SCHNEIDER, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: Razin, S. and Herrmann, R. (eds) *Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas*. Academic/Plenum Kluwer, London, pp. 91–116.
- SERTKAYA, G., MARTINI, M., MUSETTI, R. and OSLER, R., 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 141.
- SHARMA, A, SHARMA, S, KANG, S., 2015. First report of a new " Candidatus phytoplasma Australasia"-related strain in *Capsicum annuum* in India. *J Plant Pathol* 97(3):548.
- SMART, C., SCHNEIDER, B., BLOMQUIST, C., GUERRA, L., HARRISON, N., AHRENS, U., LORENZ, K., SEEMÜLLER, E. and KIRKPATRICK, B., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and environmental microbiology*, 62(8): 2988-2993.
- STRAUSS, E., 2009. "Phytoplasma research begins to bloom", *Science*, Vol. 325, No. 5939, pp. 388,.
- TRAN-NGUYEN, L.T., PERSLEY, D.M., GIBB, K.S., 2003. First report of phytoplasma disease in capsicum, celery and chicory in Queensland, Australia. *Aus Plant Pathol* 32(4):559–560 Vol. 51, pp. 91–111, 2006.
- WANG, Y. X., WAGHORN, G. C., BARRY, T. N. , SHELTON, I. D., 1994. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulfate by sheep. *Br. J. Nutr.*, 72 (6): 923-935.

- WEINTRAUB, P. G. and L. BEANLAND, 2006. "Insect vectors of phytoplasmas", *Annual Review of Entomology*, Vol. 51, pp. 91–111.
- XIAODONG, B. A. I., AMMAR, E. D., and HOGENHOUT, S. A., 2007. "A secreted effector protein of AY-WB phytoplasma accumulates in nuclei and alters gene expression of host plant cells, and is detected in various tissues of the leafhopper *Macrostelus quadrilineatus*", *Bulletin of Insectology*, Vol. 60, No. 2, pp. 217–218.
- YAVUZ, Ş., 2011. Armut Yıkım Fitoplazması ‘*Candidatus Phytoplasma Pyri*’ Hastalığının Aşıyla Taşınma Etkinliğinin Araştırılması Ve Farklı Anaç-Çeşit Kombinasyonlarının Reaksiyonlar. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 66s
- ZHAO, Y., 2013. "The i phyclassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment." *Phytoplasma: Methods and Protocols* 329-338.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zehra MEZRELİ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa- 12.04.1996
Telefon : 0534 578 30 33
e-mail : zmezreli.94@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	Şanlıurfa Anadolu Kız Lisesi, Eyyübiye, Şanlıurfa	2013
Üniversite	Harran Üni. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü, Haliliye, Şanlıurfa	2017
Yüksek Lisans	Harran Üni. Fen Bilimleri Ens. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Haliliye, Şanlıurfa	2019

UZMANLIK ALANI: Bitki Koruma/Fitopatoloji

YABANCI DİLLER: İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görevi
2017 -	Şanlıurfa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü	Mühendis

YAYINLAR:

MEZRELİ, Z., GÜLDÜR, M.E., 2019. Detection and Charcterization of Phytoplasmas with Molecular Methods in the Fields of Pepper in Sanliurfa Province, 1st International Plant Protection Congress, 10-13 April 2019, Adana, p.59

EKLER

EK1. DNA izolasyon çalışmalarında Ahrens ve Seemüller metoduna göre kullanılan tampon çözeltiler

CTAB Buffer ph 8.0 (200 ml)

Kimyasal	Miktar
CTAB (%2)	4 g
NaCl (1,4 M)	16,364 g
EDTA (20 mM)	1,169 g
Tris- HCl (100 Mm)	2,422 g
PVP – 40	4 g
*β-mercaptoethanol (% 2)	400 µl

*β-mercaptoethanol, bitki örnekleri ezilmeden hemen önce karışıma taze olarak eklenir.

Chloroform: Isoamyl Alcohol (24:1)

24 ml chloroform ve 1 ml isoamyl alcohol karıştırılmıştır.

EK2. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

TAE buffer (50X stok)

0.5 M EDTA ph:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24.2 ml

Çözelti 100 ml d₂H₂O' ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Ethidium Bromide

10 mg ethidium bromide 1 ml saf su içerisinde Eppendorf tüpünde eritilmiştir. Daha sonra bu ana stoktan 30 µl alınarak 100 ml saf su içerisine ilave edilmiştir.

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.