T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYARBAKIR İLİNDE BİBER ÜRETİM ALANLARINDA BULUNAN FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Yusuf ALAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında Yusuf ALAR'ın hazırladığı **"Diyarbakır ilinde biber üretim alanlarında bulunan fitoplazmalrın moleküler yötemlerle saptanması"** konulu bu çalışma 22/04/2019 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 E. GÜLDÜR ……..

Üye :Doç. Dr.Muharrem A. KAMBEROĞLU ……..

Üye :Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ ……..

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

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
EnstitüMüdürü

Bu çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 18257

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET ii
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
1.GİRİŞ 1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
3.MATERYAL ve YÖNTEM 8
3.1. Materyal 8
3.1. Çalışmanın Yürütüldüğü Yer ve Örnekleme Yapılan Bitkiler 8
3.1.2. PCR Ve RFLP Analizleri için Kullanılan Materyal 9
3.2. Yöntem 9
3.2.1. Örnekleme Çalışmaları 9
3.2.2. Total DNA İzolasyonu Çalışmaları 10
3.2.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları 10
3.2.4. RFLP Çalışmaları 12
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları 13
4.ARAŞTIRMA BULGULARI veTARTIŞMA 14
4.1. Örnekleme Çalışmaları ve Simptomlar 14
4.2. Moleküler Çalışmalar 16
4.2.1. Total DNA Çalışmaları 16
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 19
KAYNAKLAR 20
ÖZGEÇMİŞ 24

ÖZET

YüksekLisansTezi

DİYARBAKIR İLİNDE BİBER ÜRETİM ALANLARINDA BULUNAN FİTOPLAZMALARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Yusuf ALAR

Harran Üniversitesi
Fen BilimleriEnstitüsü
Bitki KorumaAnabilimDalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Yıl: 2019, Sayfa: 33

Diyarbakır ili Çınar, Bismil ve Sur ilçelerinde biber yetiştirilen alanlarda bitkilerin yapraklarında sararma, küçük yaprak oluşumu, bodurlaşma ve meyvede şekil bozuklukları biçiminde fitoplazma kaynaklı hastalık simptomları gözlenmiştir. Bu tür simptomlara sebep olan etmenin varlığını saptamak amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Biber yetiştirilen alanlarda hastalık simptomu gösteren ve göstermeyen bitkilerden örnekler alınmıştır. Toplanan örneklerin yaprak orta damarlarından CTAB metoduna dayalı olarak total DNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklerdeki fitoplazma varlığı P1/P7 ve R16F2n/R2 fitoplazma üniversal primerleriyle nested PCR vasıtasıyla testlenmiştir. Nested PCR sonucunda yalnızca simptomatik belirti gösteren biber bitkilerinin yapraklarından elde edilen DNA'larda beklenen düzeyde bant (1250 bp) gözlenmiştir. Nested PCR ürünleri *Eco*RI restriksiyon enzimiyle RFLP yapıldığında etmenin fitoplazma olduğunu kanıtlayan 750 ve 500 bp bantlar gözlenmiştir. Bu çalışma ile Diyarbakır ilinde biber bitkilerinde fitoplazma enfeksiyonu ilk kez saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biber, sararma, küçükyaprak, PCR-RFLP, fitoplazma

ABSTRACT

MSc Thesis

DETECTION OF PHYTOPLASMAS BY MOLECULAR METHODS IN PEPPER PRODUCTION AREAS IN DİYARBAKIR PROVINCE

Yusuf ALAR

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Year: 2019, Page: 33

In Çınar, Bismil and Sur districts of Diyarbakır province, the symptoms caused by phytoplasmas of pepper cultivation have been observed with yellowing, small leaf formation, stunted and fruit shaped leaves symptoms. Studies have been conducted to determine the presence of the causative agent. In the areas where pepper was grown, samples were collected from plants with and without disease symptoms. Total DNA isolation was performed based on CTAB method from the leaf midrib of the collected samples. The presence of phytoplasma in the samples was tested by nested PCR with universal primers of phytoplasma P1/P7 and R16F2n/R2. Nested PCR results showed only the expected level of band (1250 bp) in the DNA obtained from the leaves of symptomatic pepper plants. In the RFLP process, Nested PCR products were digested with *EcoR*I restriction enzyme and 750 and 500 bp bands were observed to prove that the causative agent was phytoplasma. In this study, phytoplasma infection was found for the first time in pepper plants in Diyarbakır province.

KEY WORDS: Pepper, yellowing, little leaf, PCR-RFLP, phytoplasma

TEŞEKKÜR

Tezin konusunun seçiminde, uygulamasında ve çalışmamda yardımlarını esirgemeyen danışmanım sayın Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR, tez çalışmamda bana yardımcı olan Arş. Gör. Eray ŞİMŞEK ve Doktora öğrencisi Havva GÜMÜŞ'e teşekkür ederim. Tezin maddi olarak desteklenmesine imkan sağlayan HÜBAK'a teşekkür ederim. Ayrıca bu tez yazılırken maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen biricik eşim ve değerli aileme teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4. 1. Enfekteli biber bitkilerinde sararma 14
Şekil 4. 2. Arazi şartlarında enfekteli bitkide küçük yaprak oluşumu-bodurlaşma (sağda) ve sağlıklı bitki (solda) 15
Şekil 4. 3. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bp uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü 17
Şekil 4. 4. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2,5) görüntüsü 17

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. Çalışmanın yürütüldüğü yerlerdeki biber üretim alanları (TUIK, 2018) ve tanılama için alınan örnek sayıları 8
Çizelge 3. 2. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri 11
Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları 12
Çizelge 4. 1.Çalışmanın yürütüldüğü alanlardan elde edilen sonuçlar 18

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bp	Baz çifti (base pair)
°C	Santigratderece
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
d	Dakika
da	Dekar
ddH_2O	Çiftdistilesu
DNA	DeoksiribonükleikAsid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESFY	European stone fruit yellows
EtBr	Ethidium Bromide
ETOH	Ethanol
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
MLO	MikoplazmaBenzeriOrganizma
mM	Mili molar
NaCl	Sodium Chloride
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Piko mol
PVP	Polyvinylpyrrolydone
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions per minute (dakikadakidevirsayısı)
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt
µl	Mikrolitre
u	unit

1.GİRİŞ

Domates bitkisi ile aynı familyadan olan biberin anavatanının tropikal Amerika olduğu ve buradan dünyayaya yıldığı bilinmektedir. Birçok çeşit ve formların orjin merkezi Brezilya'dır. Biber İspanya'dan İngiltereye 1548 yılında taşınmış, sonrasında ise Orta Avrupa ve diğer Avrupa ülkelerine girmiştir. Balkan ülkelerinden sonra Türkler aracılığı ile Kuzey ve Orta Afrika ülkelerine tanıtılmıştır. Biber Malvales- Tubifloraeya da Personatae takımının Solanaceae familyasın aaittir.

Biber A ve C vitaminlerince zengin olup, düşük kalorilidir. İçeriğinde barındırdığı Capsicin maddesi oranına göre iştahı artırıcı özelliği yanısıra sindirim sistemine dezenfekte edici madde olarak görev yapması oldukça önemlidir. Sebzeler içerisinde önemli bir yere sahip olan biber, taze ve salça olarak yemeklere renk vermektedir. Ayrıca Turşu, konserve, sos, ketçap, hazır çorbalar, kurutularak, Salata, toz halinde, ilaç sanayinde ve boya sanayinde ihtiyaç durumuna göre değerlendirilir.

Sıcak ve ılık iklim sebzesi olan biber; ılık iklimlerde tek yıllık sıcak iklimlerde birkaç yıllıktır. Biber, yetişme periyodunun erken devrelerinde daha fazla sıcaklığa ihtiyaç duyar.

Biber bitkisinin gelişme sürecinde sıcaklığın 15°C olması gerekir. Uygun sıcaklık isteği 18-26°C' dir. Sıcaklık 15°C' nin altında ve 32°C' nin üzerinde olduğunda bitkiler zarar görür ve ekonomik kayıplara nedeno lur. 35 °C ve üzerindeki sıcaklık değerlerinde bitki büyümesi ve gelişmesi yavaşlar. Biber donlara karşı dayanıksızdır. Düşük sıcaklıklarda gelişip büyümemiş kötü şekilli meyveler oluşur.

Gerek toprakta gerekse ortamda nemden hoşlanır. Toprakta devamlı %60-70 nem bulunmalıdır. Optimal gelişme; sıcaklık, kısmen ışık yoğunluğu, toprak ve hava nemi gibi çevre faktörlerine bağlıdır.

Biber, toprak isteği bakımından seçicidir. Organik maddece zengin, çeşitli besin maddelerini içeren, tınlı, tınlı-kumlu, su tutma kapasitesi iyi, çabuk ısınılabilir, derin, geçirgen, iyi drene edilmiş topraklar uygundur. Kumlu–tınlı topraklar ise erkencilik sağlar. Ağır, killi topraklar biber tarımına uygun değildir.

Biberde çeşitli tiplerde sınıflama yapılabilir. Bailey tarafından yapılan sınıflandırma aşağıdaki gibidir:

***C.annuum* var. *cerasiforme*:** Kiraz biberleridir. Meyveleri küçük, 2-3 cm ve dik durur.

C.annuum* var. *conoides: Meyveleri konik veya uzuncadır. 2-10 cm, silindir şeklindedir ve dik durur.

C.annuum* var. *fasciculatum: Kırmızı salkım biberleridir, 5-8 cm uzunluktadır, meyve dik durur.

***C.annuum* var. *longum*:** Uzun sivri biberler grubudur. 5-30 cm uzunlukta ve sarkık durur.

***C.annuum* var. *grossum*:** Dolmalık biber grubudur. İri 3-4 bölmeli, 3-10 cm, dik veya sarkık durur.

Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen biber çeşitleri şekil ve kullanımalanlarına göre 5 grup altında toplanmış olup, Dolmalık biberler, Sivri biberler, Çarliston Biberler, Sanayiye uygun biberler ve Küçük meyveli, acı biberler şeklindedir.

Sivri biberler: Bu grupta uzun, narin yapılı, genelde orta koyulukta yeşil renkli, ince duvarlı, genelde tatlı bazen acı biberler yer alır. Bu gruptaki biberler daha koyu yeşil, daha kalın duvarlı, oldukça sert dokulu, daha kısa boyludur.

Çarliston biberler: Sarı ve yeşil renkli çeşitleri olduğu gibi lezzetleri de acı veya tatlı olabilir. Uzun, iri, daha kalın duvarlı ve etli olduğundan ayrı bir grup teşkileder.

İri kırmızı biberler: Özellikle acı olanlar daha ziyade kırmızı toz biber üretiminde ve pastırma yapımında geniş ölçüde kullanılır. Bu grupta yer alan daha tatlımsı çeşitler ise çoğunlukla biber salçası yapımında ve evlerde özel şekilde hazırlanan turşu yapımında kullanılır. Uzun, kırmızı renkli biberlerdir.

Konik biberler: Tamamen kızardıklarında daha ziyade biber salçası ve kırmızı toz biber yapımında kullanılır. Yeşil veya sarı renkli, kalın duvarlı, çoğunlukla tatlı bazen acı olan biberlerdir.

Domates biberleri: Şekli domatese benzediğinden bu isimle anılmaktadır. Kırmızı renkli, dolgun etli ve tatlı lezzetli olan bu biberler ülkemizde salça üretiminde kullanıldığı gibi içi doldurularak turşu halinde değerlendirilmektedir.

Dolmalık biberler: Yuvarlak iri biberler grubunu teşkileden bu biberler sarı veya muhtelif tonda yeşil renklidir. Renk, irilik ve duvar kalınlıkları oldukça değişiklik gösterir (MEGEP, 2008).

İç pazarda her geçen gün artan talep ile birlikte Orta ve Kuzey Avrupa ülkelerine ihracatın ümit verici olması ile ekim alanları ve üretilen ürün miktarları her yıl artmaktadır. Ülkemizde 2018 yılı itibariyle 346248 dekarlık alanda Kapya ekimi olup üretim 1128060 tondur, 131351 dekarlık alanda Dolmalık ekimi olup üretim 397175 tondur, 290885 dekarlık alanda Sivri ekimi olup üretim 930349 tondur, 18040 dekarlık alanda Çarliston ekimi olup üretim99390 ton olup toplam biber üretim alanı 786524 dekarda üretim 2554974 tondur (TUİK, 2019).

Son yıllarda GAP Projesiyle birlikte sulu ekim alanlarının artışı paralelinde biber üretim alanlarında Diyarbakır'da artış olmaktadır. Diyarbakır'da biber ekilen alan 15590 da olup; toplam üretim ise; 24584 tondur. Diyarbakır İlinde biber yetiştiriciliği Bismil, Sur ve Çınar ilçelerinde yapılmakta olup, Bismil ilçesinde ekilen alan 960 da, toplam üretim 1205 tondur, Çınar ilçesinde ekilenalan 1380 da, toplam üretim 2680 tondur, Sur ilçesinde ekilen alan 200 da, toplam üretim 400 tondur (TUİK, 2019).

Biber bitkisinde ekonomik kayıplara neden olan bir takım hastalık ve zararlı etmenleri vardır. En önemli hastalıklar; biber kök boğazı yanıklığı (*Phytophtora capsici*), bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*), bakteriyel benek Hastalığı (*Pseudomonas syringae*pv. *tomato*). mildiyö, alternaria, antraknoz, gövde yanıklığı, külleme, kurşuni küf, meyve çürüklüğü ve bazı virus hastalıklarıdır. Bunun yanısıra nematod, bozkurt (*Agrotis* spp.), dana burnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*), biber gal sineği (*Asphondylia capsic*i), yeşilkurt (*Heliothis* spp.), kırmızı örümcek, sarıçay akarı *(Polyphagotarsonemus latus*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*) ve thrips gibi zararlılar da biber bitkisine zarar vermektedir. Bu etmenlerin yanısıra son yıllarda ülkemizde ve dünyada biber yetiştirilen alanlarda sararma, bodurlaşma, yaprak nekrozları, çiçek kısırlığı, çalılaşma ve cadısüpürgesi gibi simptomlar sergileyen bitkilerde moleküler yöntemler vasıtasıyla biber bitkisinde sözü edilen tipte belirti oluşturan ve adına fitoplazma denilen bakteriyel patojenler saptanmıştır.

Fitoplazmalar vector böceklerle taşınan, bitki floeminde sınırlı bakteriyel patojenlerdir ve dünya doğal ekosisteminde ve ürünlerde yıkıcı kayıplara neden olurlar (Lee ve ark., 2000; Bertaccini, 2007).

Önemli bitki patojenleri arasında yer alan fitoplazmalar önceleri virus veya virus benzeri hastalık etmeni olarak değerlendirilmiştir (Spaldon, 1958). Daha sonar mikoplazmalara benzemesi nedeni ile mikoplazma benzeri organizma (MBO:MLO: Mycoplasma-like organism) olarak adlandırılmıştır (Doi ve ark., 1967).

Mollicute Taksonomisi Alt Komitesi (the Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes) tarafından 1992 yılında bitki patojeni mollicute'leri ifade etmek üzere bu patojenlerin "phytoplasma (fitoplazma)" olarak adlandırılması Kabul edilmiştir (Anonymous, 1992). Daha sonar güvenilir moleküler teknikler ile tanımlaması yapılan türlerin "*Candidatus* phytoplasma sp." Olarak isimlendirilmesi uygun görülmüştür (Anonymous, 2004).

Fitoplazmalar 500 nm çaplarında, tek bir hücre membranı ile çevrili, belirgin bir şekli olmayan küçük bakterilerdir. Kültür ortamına alınamazlar, canlı dokuya muhtaçtır. Fitoplazmalar sürekli olarak bitki ve böcekler arasında geçişler sayesinde canlılığını ve yayılışını sürdürmektedir (Hogenhout ve ark., 2008). Oldukça tipik belirtiler oluşturabilmesi nedeni ile patates stolbur hastalığının simptomlara dayalı olarak araştırılması ülkemizde fitoplazmalar ile ilgili yapılan ilk çalışmalar arasında yer almaktadır (Çıtır,1985).

Fitoplazmalar başlıca *Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae*ve *Derbidae* familyalarına dahil böcekler tarafından persistent propagatif olarak taşınırlar (Weintraub ve Beanland, 2006). 1990' larda, fitoplazma DNA'sının ilk klonlamasını takiben (Kirkpatrick ve ark., 1987), nükleik asit bazlı probları (rasgele klonlanmış DNA ya da tamamlayıcı RNA), bitki ve vektörlerdeki fitoplazmaları tespit edip ayırmak için farklı deneyler kullanılmıştır (Lee ve Davis, 1988; Bertaccini ve ark.,1990; Bonnet ve ark.,1990; Harrison ve ark.,1992). 1980'lerde ELISA tabanlı yöntemlerle fitoplazmaların tespiti için serolojik tanısal teknikler ortaya çıkmaya başlamıştır. 1990'ların başında PCR ve RFLP analizlerinin birleşmesi ile fitoplazma türlerinin ve farklı ırkların tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Namba ve ark., 1993; Lee ve ark., 1993; Schneider ve ark., 1993).

Oksal ve ark., 2016 yılında Malatya ili biber üretim alanlarında sararmalar, yaprak nekrozları, çiçek kısırlığı gibi simptomlar sergileyen bitkilerden aldıkları örneklerde yeni nesil dizileme teknolojileriyle bu simptomlara ve verim kayıplarına neden olan etmenin *Candidatus* Phytoplasma trifolii'den kaynaklandığını ortaya koymuşlardır (Oksal ve ark., 2017).

Diyarbakır ilinde biber yetiştiriciliği ekonomik anlamda önem arzetmektedir. Şimdiye kadar çalışmanın yürütüldüğü Diyarbakır ilinde mevcut bilgilerimize göre biber bitkisinde fitoplazma hastalığı ile ilgili herhangi bir bilgi rapor edilmemiştir. Bu çalışma Diyarbakır ili Çınar, Bismil ve Sur ilçelerindeki biber ekim alanlarında bakteriyel etmen olan fitoplazmanın varlığını saptamak amacıyla yapılmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Prokaryot canlıların *Mollicutes* sınıfında yer alan fitoplazmalar, büyüklükleri yaklaşık 500 nm arasında değişen, hücre duvarı olmayan, pleomorfik obligatbitki parazitlerdir. Yaşamaları için canlı bir konukçuya ihtiyaç duyarlar ve konukçu hücrenin sitoplazmasında gelişir ve çoğalırlar. DNA ve RNA içermekte olup virüsler ile bakteriler arasında bir ara form oluşturmaktadır. Konukçu hücrenin sitoplazmasında tomurcuklanma vasıtasıyla aseksüel olarak ürerler. Bitkilerde besin ve hormone iletimini sağlayan floemde bulunurlar ve mevcut tekniklerle culture alınamazlar (Seemüller ve ark., 2002).

Fitoplazma ile bulaşık bitkilerde demir noksanlığına benzer sararma, phyllody, fasciation (gövdede yassılaşma), witches' broom (cadısüpürgesi), çiçek kısırlığı, bodurlaşma ve geriye doğru ölüm biçiminde tipik belirtiler görülmektedir (Bertaccini ve ark., 1996;Lee ve ark., 1997).

Fitoplazma DNA'sının 1990'larda ilk klonlanmasından sonra (Kirpkpatrick, 1987), nükleik asit bazlı problar konukçu bitkilerde etmeni teşhis etmek için geniş çapta kullanılmışlardır (Lee ve Davis, 1988; Bertaccinive ark, 1990; Bonnet ve ark., 1990; Harrison ve ark., 1992). Ayrıca diagnostic amaçlar için sekansa özgü oligonükleotidler geliştirilmiştir (Schaff ve ark., 1992; Firrao ve ark., 1993). Klonlanmış DNA kısımlarına dayalı olarak yapılan PCR testleri fitoplazma teşhisi için hassas bir yöntemdir. PCR testlerinde korunmuş gen dizilerine (16S rRNA, ribozomal protein, *tuf*, 16S-23S gen bölgesi gibi) dayalı olarak geniş çaplı primerler dizayn edilmesine karşın bitki ve böceklerle ilişkilendirilen çok sayıda fitoplazmaların teşhisine izin verir (Bertaccini ve ark., 1992; Gunderser ve Lee, 1996; Schneider ve ark., 1997). PCR testlerinde kullanılan universal primerler

fitoplazma hastalıklarının ön teşhisi için kullanışlıdır. Birkaç universal ve çoğu fitoplazma grup spesifik primerler 16S ribosomal gen üzerinde fitoplazmaların rutin teşhisi için dizayn edilmiştir (Deng ve Hiruki, 1990; Ahvens ve Seemüller, 1992; Nanba ve ark., 1993; Davis ve Lee, 1993; Lee ve ark., 1993; Lorens ve ark., 1995; Schneider ve ark., 1997).

Macaristan'da fitoplazma hastalığı belirtisi gözlenen biber, havuç, domates, kereviz, şeytan elması (*Datura stramonium*) ve aslandişi (*Taraxacum officinale*) bitkileri toplanmıştır ve universal primer seti (fP1/rP7) ve spesifik primer seti(FSTOL/rSOLS) kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR ile fitoplazma saptanmış ve PCR ile saptanan fitoplazma RFLP ile karakterize edilmiştir. Toplanan tüm bitkilerde tipik stolbur fitoplazması tanımlanmıştır **(**Viczion ve ark., 1998).

16SrIV-D alt grubu fitoplazması Çin'de biber yetiştirilen alanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Xiang- Dong ve ark. 2010).

İspanya'da biber bitkilerinde (*Capsicum annum*) etmeni fitoplazma olan stolbur hastalığının belirtilerine rastlanmıştır. Kısa boğum araları, yeşil çiçek demetleri ve fitoplazma hastalıklarına özgü diğer belirtiler gözlenmiştir (Castro ve Romero, 2002).

Lübnan'da 2003- 2004 yıllarında domates ve biber tarlalarında fitoplazma hastalığı için yapılan survey sonucunda, biber tarlalarının %27'sinde bodurlaşma ve yapraklarda sararma gibi belirtiler gösteren bitkilere rastlanmıştır (Choueiri ve ark., 2007).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1. Çalışmanın Yürütüldüğü Yer ve Örnekleme Yapılan Bitkiler

Çalışmada kullanılan bitkiler Diyarbakır ili biber yetiştiriciliğinin yapıldığı Çınar (3), Bismil (2)ve Sur (1) ilçelerine bağlı toplam 6 köyden alınan örneklerden oluşmuştur.

Çalışma yapılan alanlarda ekilen alanın büyüklüğüne göre 0-49 dekar arasından 2 örnek, 50-100 dekar arasından 5 örnek, 101-250 dekar arasından 10, örnek olacak şekilde yalnızca symptom gösteren bitkilerden güdümlü örnekleme yapılmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Biber bitkisinde fitoplazma etmenini tanılamak için örnekleme yapılan alanlarda alınan örnek sayıları Çizelge 3. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1.Çalışmanın yürütüldüğü yerlerdeki biber üretim alanları (TUIK, 2018) ve tanılama için alınan örnek sayıları

Survey yapılanil	İlçeler	Köyler	Ekilenalan (da)	Örneksayısı
DİYARBAKIR	Çınar	Bedürlü	1380	28
		EskiMahalle		
		Selman		
	Bismil	Aralık	960	19
		Tepe		
	Sur	Bağıvar	200	4

Moleküler çalışmalar Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuarında yürütülmüştür.

3.1.2. PCR Ve RFLP Analizleri için Kullanılan Materyal

Diyarbakır ili Bismil, Çınar ve Sur ilçelerinden fitoplazma belirtisi gösteren bitkilerin yapraklarından elde edilen total nükleik asitler ve DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar PCR ve RFLP analizleri için material olarak kullanılmıştır.

PCR çalışmalarında etmene özgü spesifik primerler (P1/P7 ve R16F2n/R16R2); RFLP çalışmalarında *EcoR*I enzimi (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnekleme Çalışmaları

Çalışmanın yürütüldüğü Diyarbakır ili Bismil, Sur ve Çınar ilçelerindeki biber yetiştirilen alanlardan etmeni tanılamak için örnekler toplanmıştır. Bu alanlarda genel olarak görülen sararma, küçük yaprak oluşumu bodurlaşma ve meyvede şekil bozukluğu biçiminde belirtiler gösteren biber bitkilerinden örnekler alınmıştır. Her ilçeden farklı sayıda olmak üzere, Çınar ilçesinden 3 (Bedürlü, EskiMahalle, Selman) ,Bismil ilçesinden 2 (Aralık, Tepe), Sur ilçesinden 1 (Bağıvar) toplamda 6 köyde çalışmalar yürütülmüştür. Şüpheli fitoplazma simptomu gösteren bitkilerin yanısıra symptom göstermeyen sağlıklı bitkilerden de örnekler alınmıştır.

Örnekler polietilen poşetlere konularak alındığı yer ve tarihe ilişkin bilgileri içerecek şekilde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvar getirilen örnekler PCR testlerinde kullanılmak üzere +4 derecede muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Total DNA İzolasyonu Çalışmaları

Diyarbakır ili biber ekim alanlarından toplanan biber bitkilerinin yapraklarından total DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu çalışmaları Ahrens ve Seemuller'in protokolünde bazı modifikasyonlarla CTAB'a dayalı olarak yürütülmüştür. (Ahrens ve Seemüller, 1992)

a- Fitoplazma ile bulaşık olduğu şüphelenilen bitkilerin yaprak orta damarlarından alınan örnek (1 g örnek için 4 ml) CTAB buffer (100 mM Tris–HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1.4M NaCl, and 0.2% 2-mercapto ethanol) ile DNA ekstraksiyon poşetinde ezilmiştir.

b- -Ekstrakte edilen bitki öz suyundan 600 mikrolitre alınıp, 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne konulmuş ve 45 dakika 65℃ de su banyosunda bekletilmiştir.

c- Daha sonra tüpler içerisine 600 mikrolitre kloroform / izoamil alkol (24:1) ilave edilerek yaklaşık 1 dakika vortex cihazında karıştırılması sağlanmıştır.

d- -Karıştırılan tüpler 12.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (c-d aşamaları 2 kez tekrarlanmıştır).

e- Üstte kalan sıvı kısımdan 300 mikrolitre alınarak yeni Eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine aynı miktarda soğuk izopropanol eklenerek -20℃'de 1 saat inkübe edilmiştir.

f- Bu sürenin sonunda tüpler 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

g- Pellet %70'lik soğuk etanol ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutma kağıdında kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan pellet 100 µl TE (1X) buffer içinde çözdürülmüş ve kullanılıncay akadar -80℃'de saklanmıştır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

PCR çalışmaları 200 µl'lik Eppendorf tüplerinde 25 µl hacimde yürütülmüştür. Çalışmalarda kullanılan DNA miktarları, total nükleik DNA izolasyonu sonucunda

elde edilen yoğunluk dikkate alınarak, spektrofotometre ile ölçülüp 20 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Etmene özgü hedeflenen bölgelerin çoğaltımı için gerekli olan ve 100'er mM Deoksiribo nükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lardan 20' şer µl alınarak 25 mM olan 80µl lik dNTP karışımına 120µl ddH2O ilave edilmek suretiyle son oran 10 mM olacak biçimde 200 µl ye tamamlanmıştır. DNA'nın çoğaltılması sırasında kullanılan Green Buffer son hacimde 1X olacak konsantrasyonda, Dream Taq DNA Polimeraz (5u/µl) enzimi 1,25u ve son olarak ddHO ile son hacmi 25 µl olacak miktarda kullanılmıştır.

1/10 (V/V) oranında 1X nükleaz içermeyen su ile sulandırılarak hedef nükleik asit olarak elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmaları patojenin korunmuş bölgesi 16S rDNA geni üzerinden direct ve nested olmak üzere 2 aşamada yürütülmüştür. Direkt-PCR'de 1800 bp ürün veren fitoplazmaya özgü P1/P7 primerleri, Nested-PCR'de ise 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Direkt PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak Nested PCR çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Pimerlerin baz dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri

Primer Adı	Dizilimi (5'-3')	Referans
P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT3'	Schneider ve ark., 1995
P7	5'CGTCCTTCATCGGCTCTT3'	Schneider ve ark., 1995
R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	Gundersen ve Lee, 1996
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	Gundersen ve Lee, 1996

PCR tüpleri programlanmış olan thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler thermocycler programında 35 döngü içerisinde bulunan primerlerin erime

sıcaklığı değeri firmanın önerdiği sıcaklık dikkate alınarak hesaplanmıştır. PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3. 3.Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları

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

3.2.4. RFLP Çalışmaları

PCR çalışmaları sonucunda 1250 bp olarak elde edilen DNA bantlarının fitoplazmaya ait olup olmadığını control etmek amacıyla *Eco*RI enzimi ile control edilmiştir (Nejat ve ark, 2009). RFLP çalışmaları enzimin alındığı firmanın (Thermo Scientific, ABD) önerdiği protocol dikkate alınarak yürütülmüştür.

Bu işlemlerin sırası aşağıdaki gibidir:

I- Örnekler 37℃'de çalışan EcoRI enzimi ile 2 saa tbekletilmiştir.

II- Her birtüpe 10 µl Nested PCR ürünü 2 µl buffer 2 µl EcoRI enzimi ve son hakim 32 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ilave edilmiştir.

III- Daha sonra tüpler thermocycler cihazında 37˚C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

IV- Bu işlem sonucunda fitoplazma etmeni olduğunu belirten ikiye bölünmüş DNA parçaları 1X lik TAE (pH 8.3)'de hazırlanmış %2'lik agaroz jelde 85 voltta yürütülmüştür.

V- Örnekler etidyum bromide ile boyanarak UV ışık altında görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Nested PCR çalışması sonucunda elde edilen 1250 bp'lik bantlar DNA'lar 1X'lik TAE (Tris-acetate EDTA)'de hazırlanmış %1'lik; RFLP ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

1g agaroz solüsyonu 100 ml TAE'de mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 30 dakika sonra donanjel %1 TAE ile doldurulan jel tankına dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna10µl 1000 bp Ladder (Thermo) yüklenmiştir. Daha sonra10 µ PCR ile çoğaltılmış biber bitkilerinden elde edilen örnekler yüklenmiştir. Jel tankının kapakları kapatılarak, güç sağlayan (5V/cm) elektrotlar bağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezi 75 dakika 85 vol takımla yürütülmüştür. Koşum işlemi tamamlandıktan sonra jel, odasıcaklığında 5 dakika 1000 ml H_2O+50µl EtBr (10mg/ml) karışımı içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla EtBr uzaklaştırıncay akadar 5 dakika saf su içinde tutulmuştur. Sonuçlar UV transilluminatör ile kontrol edilip fotoğraflanmıştır (Pei ve ark., 2012).

4.ARAŞTIRMA BULGULARI veTARTIŞMA

4.1. Örnekleme Çalışmaları ve Simptomlar

Bu çalışmada Diyarbakır ili Çınar, Bismil ve Sur ilçelerinde biber üretiminin yapıldığı alanlardan fitoplazma etmenini tanılamak için simptomatolojik gözlemler yapılmış ve bu bitkilerden örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler arasında gözlenenen yaygın simptomlar sararma, küçük yaprak oluşumu, bodurlaşma ve meyvede şekil bozukluklarıdır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



Şekil 4. 1. Enfekteli biber bitkilerinde sararma



Şekil 4. 2. Arazi şartlarında enfekteli bitkide küçük yaprak oluşumu-bodurlaşma (sağda) ve sağlıklı bitki (solda)

Çalışmanın yürütüldüğü alanlarda gözlenen simptomlar daha once Oksal ve ark. (2016) tarafından bildirilen simptomlarla benzerlik göstermektedir. Bu araştırıcılar Malatya ilinde teşhis etmiş oldukları *Candidatus* Phytoplasma trifolii ile

bulaşık olan biber bitkilerinde sararma, bodurlaşma, çiçek kısırlığı, nekroz ve küçük yaprak oluşumu biçiminde simptomlar gözlemişlerdir.

4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. Total DNA Çalışmaları

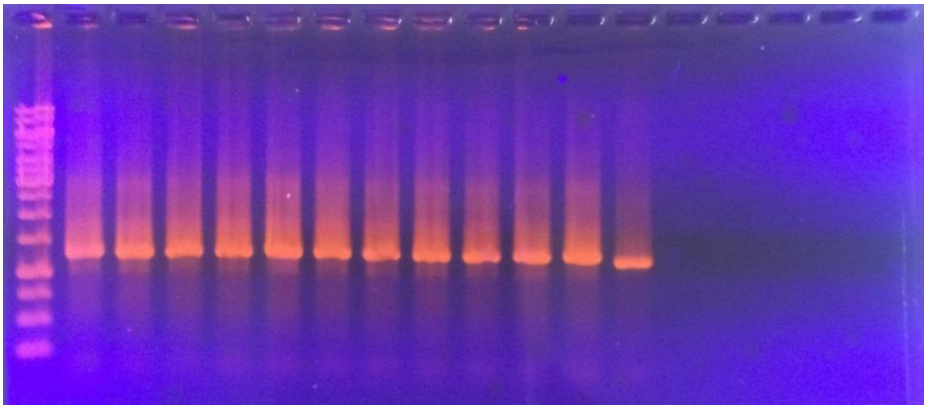
PCR ve RFLP çalışmalarında kullanılmak üzere symptom gösteren ve göstermeyen biber bitkilerinin yaprak orta damarlarından total DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon çalışmaları CTAB'a dayalı Ahrens ve Seemuller'in protokolünde bazı değişikliklerle uygulanmıştır.

.

4.2.2. Patojen Teşhisi ve RFLP Çalışmaları

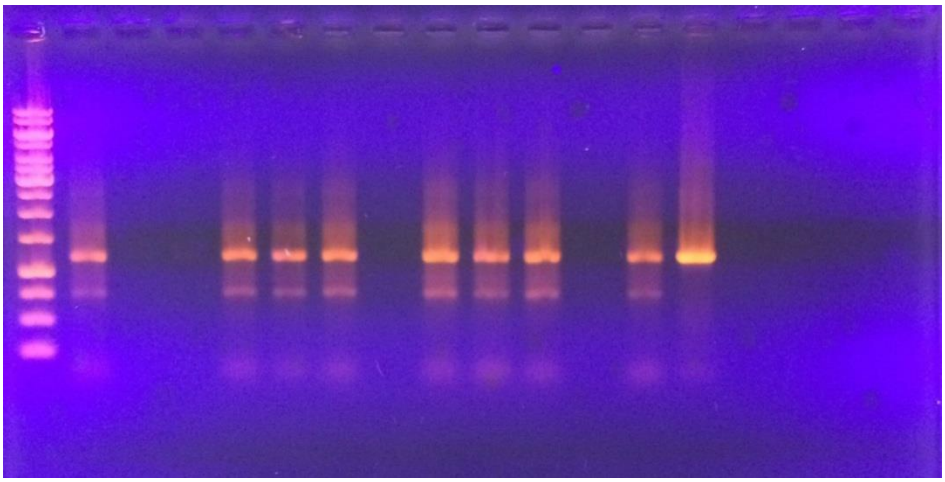
Fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu şüphelenilen ve sağlıklı biber bitkileri toplandıktan sonra PCR ve RFLP analizleri yapılmıştır. Fitoplazma teşhisi için yapılan PCR/RFLP analizleri etmenin varlığı ve gözlenen belirtiler arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır.

PCR işlemi Direkt-PCR ve Nested-PCR olmak üzere iki aşamada yapılmıştır. Direkt-PCR'da 1800 bp ürün veren P1/P7, Nested-PCR'daise 1250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak daha önce fitoplazma etmeni ile bulaşık olduğu belirlenen Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) bitkilerinin DNA'sı; negative kontrol olarak DNA içermeyen nükleazsız su kullanılmıştır. İlk PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak Nested-PCR yapıldığında; sağlıklı olduğu gözlenen biber örnekleri ve negative kontrol beklenen düzeyde bant vermezken; symptom gösteren soğan bitkilerinden alınan örneklerde 1250 bp uzunluğunda bantlar gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 3. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bp uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

PCR çalışmaları sonucunda beklenen düzeyde bant (1250 bp) veren biber örneklerinin fitoplazma etmenine ait olup olmadığını kontrol etmek amacıyla Nested PCR ürünleri *Eco*RI restriksiyon enzimi kullanılarak kontrol edilmiştir (Nejat ve ark.,2009; Marzachi 2004; Seemuller 1998; Christensen ve ark., 2004). Bu çalışmada pozitif olduğu saptanan simptomatolojik biber bitkilerinin yapraklarından elde edilen 1250 bp'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI nzimi ile kesildiğinde 750 bp ve 500 bp olmak üzere ikiye bölünerek fitoplazma etmeninin varlığını doğrulamıştır (Şekil 4.).



Şekil 4. 4. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agarozjel (%2,5) görüntüsü

Çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1.Çalışmanın yürütüldüğü alanlardan elde edilen sonuçlar

Survey yapılanİlçeler	Köyler	Toplananörneksayısı	Pozitifsonuçlar	Negatif sonuçlar
Çınar	Bedürlü	9	6	3
	Eski Mahalle	8	4	4
	Selman	11	8	3
Bismil	Aralık	10	8	2
	Tepe	9	5	4
Sur	Bağıvar	4	2	2
Toplam		51	33	18

Dünya çapında sebzeler, baklagiller ve yağ bitkilerini infekteleyen fitoplazma hastalıkları bir çok fitoplazma etmeni bildirilmiştir; fakat bunlar çoğunlukla Apiaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Fabaceae ve Solaneceae familyasına ait bitki türlerini etkileyen Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya ülkelerinden rapor edilmiştir (Martini ve ark., 2018). Fitoplazma etmeni vektör böceklerle uzak mesafelere taşındığından ve etmene karşı bilinen bir mücadele yöntemi olmadığından dolayı önemli bir sorun haline gelmiştir.

Bu çalışma ile Diyarbakır ili Çınar, Bismil ve Sur ilçelerinden alınan biber örneklerinde fitoplazma etmeni saptanmış olup, biber bitkisi üzerinde fitoplazma benzeri simptomlar mümkün olduğunca belirlenmiştir. Gözlenen simptomlar daha önce bildirilen simptomlarla benzerlik göstermektedir.

Biber bitkisi genel olarak ‘’Stolbur’’ ve diğer fitoplazma hastalıkları tarafından etkilenmektedir. Stolbur (*Ca.* P. Solani) ile infekteli biber bitkilerinde tipik simptomlar yaprak sararması, yaprak çukurluğu, bodurlaşma, meyvede deformasyonlar, solma ve bitkinin geriye doğru ölüm’dür. Diyarbakır ili biber bitkilerinde yapılan bu çalışmada daha önce rapor edilen ‘’Stolbur’’ fitoplazmasının tipik simptomları gözlenmiş ve bu simptomu gösteren örneklerin fitoplazma olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma Diyarbakır ili biber üretim alanlarında fitoplazma etmeninin varlığın saptamak amacıyla yürütülmüştür. Diyarbakır ili Çınar, Bismil ve Sur ilçeleri biber üretim alanlarından alınan ve sararma, küçük yaprak oluşumu, bodurlaşma, meyvelerde şekil bozukluğu gözlenen biber bitkilerinde fitoplazma etmenini saptamak amacıyla örnekler alınmıştır. Simptom gösteren biber bitkilerinde PCR ve RFLP analizleri vasıtasıyla pozitif sonuçlar eldee dilmiştir.

Çınar ilçesinden toplanan 28 örneğin 18'i, Bismil ilçesinden toplanan 19 örneğin 13'ü ve Sur ilçesinden toplanan 4 örneğin 2'i fitoplazma ile ilişkilendirilmiştir.

Yapılan bu çalışma ile Diyarbakır ilinde biber bitkileri üzerinde fitoplazma etmeni ilk kez saptanmış olup, fitoplazmalarla mücadelenin ilk aşaması olan tanılama işlemi gerçekleştirilmiş olup; daha sonra yapılacak olan karakterizasyon ve epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturacağı öngörülmektedir.

Öte yandan fitoplazma etmeninin alternatif konukçuları olarak rol oynayan böcek vektörleri ve yabancı ot konukçuları tarafından fitoplazma taşınması konusundaki bilgiler ışığında fitoplazmanın olası riskini azaltmak için kontrol stratejileri geliştimek için gerekli olacaktır.

Ayrıca yeni ''*Ca.* Phytoplasma'' türlerinin tanılanması, fitoplazmaların genetik çeşitliliği hakkındaki bilgilerimizi artıracaktır.

KAYNAKLAR

AHRENS U. and E. SEEMÜLLER, 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology 82, 828–832.

ANONYMOUS, 1992. Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa Int. J. of Syst. Bact. April 1993, p. 394-397; Vol. 43, No. 2. (Erişimtarihi: 02.12.2015)

ANONYMOUS, 2004. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group: Candidatus Phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2004, 54, 1243-1255. (Erişimtarihi: 02.12.2018)

BERTACCINI, A., DAVIS, R. E. and LEE, I.-M. (1990). Distinctions among mycoplasmalike organisms (MLOs) in Gladiolus, Ranunculus, Brassica and Hydrangea through detection with non-radioactive cloned DNA probes. PhytopatholMediterr 29, 107–113.

BERTACCINI A., R.E. DAVIS and I.-M. LEE, 1992. In vitro micropropagation for maintenance of mycoplasmalike organism in infected plant tissues. Horticulturae Science, 27, 1041-1043.

BERTACCINI, A., BELLARDI, M.G. and VIBIO, M., 1996. Virus Diseases of Ornamental Shrubs. *X. Euphorbia* PulcherrimaWilld. Infected by Viruses and Phytoplasmas. PhytopathologiaMediterranea, 35: 129-132.

BERTACCINI A., 2007.- Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. Frontiers in Bioscience, 12 (1): 673- 689.

BONNET, F., SAILLARD, C., KOLLAR, A., SEEMULLER, E. and BOVÉ, J.M., 1990. Detection and differentiation of the mycoplasmalike organism associatedwith apple proliferation disease using cloned DNA probes. Molecular PlantMicrobe Interactions, 3: 438-443.

BORA, T. ve KARACA, İ. 1970. KültürBitkilerindeHastalığınveZararınÖlçülmesi. EgeÜniversitesiZir. Fak. YardımcıDersKitabı, No: 167.

CASTRO, S., and ROMERO, J., 2002. The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. J. Phytopathol.150, Page : 25–29.

CHOUEIRI, E., SALAR, P., JREIJIRI, F., EL ZAMMAR, S., MASSAAD, R., ABDUL-NOUR, H., MARIE BOVE, J., LUC DANET, J. and FOISSAC, X., 2007. Occurrence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. Eur J Plant Pathol 118:411–416 DOI 10,1007/s10658–007–9142–8

CHRISTENSEN, N.M., NICOLAISEN, M., HANSEN, M., SCHULTZ, A., 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. Molecular Plant–Microbe Interactions, 17: 1175-1184.

ÇITIR A, 1985. Preliminary investigation of potato diseases caused by mycoplasmalike organisms (MLO) in Erzurum Region. J. Turkish Phytopathology.14(2) : 53-63.

DAVIS, R.E. and LEE, I.-M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reactiona mplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma like organisms. Phytopathology, 83: 1008-1011.

DENG, S.J. and HIRUKI, C. (1990) The use of cloned DNA probes for diagnosis of noncultivable plant mollicutes. Proc. Jpn. Acad. 66B, 58-61.

DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K. and ASUYAMA, H., 1967. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms fourn in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches' broom, aster yellows of pawlownia witches broom. Ann. Phyopath Soc, Japan.33:259-266.

FIRRAO, G., GOBBI, E. and LOCCI, R., 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasmalike organisms. Phytopathology, 83, 602–607.

GUNDERSEN, D. E. and LEE, I. M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nestedPCR assays using two universal primer pairs. PhytopathologiaMediterranea, 35, 144–51.

HARRISON, N. A., BOURNE, C. M., COX, R. L., TSAI, J. H. and RICHARDSON, P. A. (1992). DNA probes for detection of mycoplasmalike organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. Phytopathology 82, 216–224.

HOGENHOUT, S., OSHIMA, K., AMMAR, E.L.D., KAKIZAWA, S., KINGDOM, H.N.and NAMBA. S., 2008. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. Mol. Plant Pathol. 9: 403- 423.

KIRKPATRICK, B.C. and PURCELL, A., 1987. Identifying the plant hosts and insect vectors of peach yellow leaf roll and X-disease. Cling Peach Review 23: 14-17

LEE, I. M., DAVIS, R. E.and GUNDERSEN-RINDAL, D. E., 2000. Phytoplasma: phyto-pathogenic mollicutes. Annu Rev Microbiol 54, 221– 255.

LEE, I.-M. and DAVIS, R. E. (1988). Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. Mol Plant Microbe Interact 1, 303–310.

LEE, I.-M., DAVIS, R. E. and Hsu, H.-T., 1993. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasmalike organism strain cluster by serological assays with monoclonal antibodies. Plant Dis 77, 815– 817.

LEE, I.M., KLOPMEYER, M., BARTOSZYK, I.M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., CHOU, T., THOMSON, K.L. and EISENREICH, R., 1997. Phytoplasma Induced Free-Branching in Commercial Poinsettia Cultivars. Nature Biotechnology, 15: 178-182.

LORENZ, K.H., SCHNEİDER, B., AHRENS, U. and SEEMULLER, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology, 85: 771-776.

MARTINI, M., DELIC, D., LIEFTING, L. and MONTANO, H., 2018. Phytoplasmas Infecting Vegetable, Pulse and Oil Crops. Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I. 31-65pp.

MARZACHİ, C., 2004. Molecular Diagnosis of Phytoplasmas. Phytopathologia Mediterranea. August 2004. 43(2):228-231

MEGEP, 2008. Biber yetiştiriciliği. http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/biber_yetistiriciligi.pdf. (Erişim tarihi: 18.08.2017)

NANBA, D., MAMMOTO, A., HASHIMOTO, K. and HIGASHIYAMA, S., 1993. Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. J Cell Biol 163: 489-502

NEJAT, N. K., SIJAM, S.N.A., ABDULLAH, G., VADAMALAI, M. and DICKINSON, M., 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associatedwith Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. American Journal of Applied Sciences, 6 (7):1331-1340.

OKSAL, D., APAK, F.K., OKSAL. E.ve TURSUN. N., 2017. Detection and molecular characterization of two 'Candidatus Phytoplasma trifolii' isolates infecting peppers at the same ecological niche. International Journal of Agriculture and Biology. January 2017. (6):1372-1378.

PEI, Y., WANG, H. and SNYDER, G.J., 2012. Thermoelectric Materials: Band Engineering of Thermoelectric Materials (Adv. Mater. 46/2012)https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201290290

SCHAFF D.A., I.-M. LEE and R.E. DAVIS, 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasmalike organisms by polymerase chain reactions. Biochemical Biophysics Research Communication, 186, 1503-1509.

SCHNEIDER, B., GIBB, K.S.and SEEMULLER, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation andclassification of phytoplasmas. Microbiology, 143: 3381-3389.

SEEMUÜLLER, E., KISON, H., LORENZ, K.-H., SCHNEIDER, B., MARCONE, C., SMART, C. D. and KIRKPATRICK, B. C. (1998). Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. In COST 823: New Technologies to Improve Phytodiagnosis. Advances in the Detection of Plant Pathogens by Polymerase Chain Reaction, Edited by C. Manceau. Luxembourg: European Communit, 823: 56–66.

SEEMULLER, E., GARNIER, M. and SCHNEIDER, B. (2002). Mycoplasmas of plants and insects. In Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas, pp. 91–116. Edited by S. Razin& R. Herrmann. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

SCHNEIDER, B., AHRENS, U., KIRKPATRICK, B. C. and SEEMU¨ LLER, E. (1993). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. J Gen Microbiol 139, 519–527.

SPALDON E, 1958.Stolbur and similar virus diseases causing seedlessness of plants. Proc. Conf. On Stolbur, Smolenice. (E. Spaldon, C. Blattny, and V. Bojnansky, eds.) Slovak Acad. Publishing House. Bratislava:25-33.

VICZION, O., SULE, S., and GABORJANYI, R., 1998. Detection and identification of stolbur phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. Acta Phytopathologica et EntomologicaHungarica 33:3-4, 255-260; 24 ref.

XIANG-DONG, L., ZHAO, W., WANG, J., and GAO. R., 2011. Identification of a phytoplasma associated with cherry virescence. Article in china journal of plant pathology, 93(2):465-469

WEINTRAUB, P. G.and BEANLAND, L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology, 51: 91-111.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Yusuf ALAR
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :DİYARBAKIR- 06.10.1988
Telefon :0553 444 21 73
Faks: :
e-mail :yusufalar@mynet.com

EĞİTİM

Derece		Adı İlçe/İl		Bitirme Yılı
Lise	:	Ziya Gökalp Lisesi	Yenişehir/Diyarbakır	2006
Üniversite	:	Harran Ünv, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı	Haliliye/ŞANLIURFA	2011
Yüksek Lisans:		Harran Ünv, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı	Haliliye/ŞANLIURFA	2019

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2011	Yıldırım Tarım	Ziraat Müh.
2011	Progen Tohum A.Ş.	Ziraat Müh.
2012-2013	Basf Türk Kimya	Ziraat Müh.
2013-2015	Hektaş Ticaret T.A.Ş.	Ziraat Müh.
2015-2019	Bayer Türk Kimya	Ziraat Müh.

UZMANLIK ALANI: Bitki Koruma

YABANCI DİLLER: İngilizce