T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞANLIURFA İLİ BİBER YETİŞTİRME ALANLARINDA BULUNAN FİTOPLAZMALARIN YABANCI OT KONUKÇULARININ BELİRLENMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Nesibe KILIÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2020

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında, Nesibe KILIÇ 'ın hazırladığı **"Şanlıurfa İli Biber Yetiştirme Alanlarında Bulunan Fitoplazmaların Yabancı Ot Konukçularının Belirlenmesi ve Karakterizasyonu"** konulu bu çalışma 26/06/2020 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. Behçet Kemal ÇAĞLAR ……..

Üye: 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: 18258

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 i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
3.MATERYAL ve YÖNTEM 13
3.1. Materyal 13
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller 13
3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için materyalin oluşturulması 13
3.2. Yöntem 13
3.2.1. Örneklerin toplanması 13
3.2.2. DNA ekstraksiyonu çalışmaları 14
3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonları 15
3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR) 16
3.2.5. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimeri ile kesilmesi (RFLP) 17
3.2.6. Agaroz jel elektroforez çalışmaları 18
3.2.7. F2n/R2 dizileri ile sekans analizi ve *in silico* RFLP 19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 20
4.1. Survey Çalışmaları ve Örnekleme 20
4.2. Moleküler Çalışmalar 23
4.2.1. DNA izolasyonu 23
4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve RFLP çalışmaları 23
4.2.3. Örnekleme yapılan yabancı otlarda fitoplazma tespiti 25
4.2.5. Sekans analizi ve filogenetik ağaç 27
4.2.6. *İn silico* RFLP 29
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 34
KAYNAKLAR 37
ÖZGEÇMİŞ 45

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİ BİBER YETİŞTİRME ALANLARINDA BULUNAN FİTOPLAZMALARIN YABANCI OT KONUKÇULARININ BELİRLENMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Nesibe KILIÇ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2020, Sayfa: 45

Türkiye biber üretimi açısından önemli bir yere sahip olan Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında fitoplazma etmeni daha önce rapor edilmiştir. Bu çalışma, Şanlıurfa ili biber üretim alanlarındaki fitoplazma hastalığının alternatif yabancı ot konukçularının tespit edilmesi amacıyla yürütülmüştür. Birecik ve Haliliye ilçelerindeki biber üretim alanlarında bulunan, şiddetli kloroz, bir noktada birden fazla sürgün ve cadı süpürgesi oluşumu, sararma ve küçük yaprak oluşumu biçiminde simptom gösteren Semizotu (*Portulaca oleracea*), Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.), Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.), Adi Eşek Marulu (*Sonchus oleraceus* L.), Köpek Üzümü (*Solanum nigrum* L.), Horoz İbiği (*Amaranthus albus* L.) ve Domuz Pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.) yabancı otlarından farklı sayılarda toplamda 82 adet örnek toplanmış ve fitoplazmaların saptanması için testlenmiştir. Toplanan örneklerden elde edilen total nükleik asitler R16F1/R16R0 üniversal primer çifti ile Direkt-PCR, R16F2n/R2 primerleri ile Nested-PCR ve RFLP testi yapılarak fitoplazmaların varlığı belirlenmiştir. Simptom gösteren farklı yabancı ot türlerinde toplamda 19 pozitif sonuç elde edilmiş ve toplanan örneklerdeki bulaşıklık oranı % 23.17 olarak bulunmuştur. R16F2n/R2 ürünleri çift yönlü olarak DNA dizilemesine tabi tutulmuş ve Genbank'ta kontrol edilmiştir. Sekans analizi sonuçlarına göre Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.) ve Semizotu (*Portulaca oleracea*) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimleri *Candidatus* Phytoplasma solani ile %99, Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimi *Candidatus* Phytoplasma asteris ile %99 benzerlik göstermiştir. Bu fitoplazmalar biber bitkisinde önemli enfeksiyonlar oluşturduğundan bu yabancı otların patojenin ara konukçusu olmasındaki rolü değerlendirilerek fitoplazmaların erken saptanması, fitoplazma hastalıklarının ekonomik açıdan önemli diğer kültür bitkilerine yayılmasının engellenmesinde önem arz etmektedir. Bu çalışma ile Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında bulunan Semizotu, Çukurova Fenerotu ve Tarla Sarmaşığı bitkilerinde fitoplazma etmeninin varlığı Türkiye'de ilk kez saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biber, yabancı ot, fitoplazma, PCR-RFLP, karakterizasyon, Şanlıurfa

ABSTRACT

MScThesis

CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF WEED HOSTS OF PHYTOPLASMAS IN THE PEPPER GROWING AREAS OF ŞANLIURFA PROVINCE

Nesibe KILIÇ

Harran University
Graduateschool of Natural and Applied
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR
Year:2020, Page:45

Phytoplasma agent has been reported previously in pepper cultivation areas of Şanlıurfa province, takes an important place in Turkey. This study was carried out to determine the weed hosts of phytoplasma disease in pepper production areas in Sanliurfa province. In total, 82 samples from the weeds such as Semizotu (*Portulaca oleracea*), Cutleaf groundcherry (*Physalis angulata* L.), bindweed (*Convolvulus arvensis* L.), Sow thistle (*Sonchus oleraceus* L.), Black nightshade (*Solanum nigrum* L.), Pigweed amaranth (*Amaranthus album* L.) and Cocklebur (*Xanthium strumarium* L.) exhibiting symptoms such as severe chlorosis, broom withches in many shoots, small leaf formation etc. were collected. The samples were tested for the possible phytoplasma identification. Total nucleic acid from the samples were tested via direct-PCR with R16F1/R16R0 universal primer pairs and with the nested-PCR with R16F2n/R2 primer pairs for the possible presence of phytoplasmas. A total of 19 positive results were obtained from 82 weed samples and the infestation rate was found to be 23.17% through the collected samples. Nested-PCR products were cut with *EcoRI* enzyme to confirm the presence of phytoplasma agent, then R16F2n/R2 products were subjected to DNA sequencing and it was checked by BLAST analysis in GenBank. According to BLAST analysis, the nucleotide sequence of phytoplasma from purslane (*Portulaca oleracea*) and bindweed (*Convolvulus arvensis* L.), samples were 99% similar to *Candidatus* Phytoplasma solani, the nucleotide sequence obtained from cutleaf groundcherry (*Physalis angulata* L.), sample showed 99% similarity with *Candidatus* phytoplasma asteris. Since these phytoplasmas constitute important infections in pepper plants, the early detection of the disease has prime importance in preventing the spread of phytoplasma diseases to other economically important crop plants. The presence of phytoplasma in purslane, bindweed and cutleaf groundcherry was determined for the first time in Turkey.

KEYWORDS: Pepper, Weeds, Phytoplasma, PCR-RFLP, Characterization, Şanlıurfa

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, maddi ve manevi her konuda destek olan, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR'e ve yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli yardımcı olan başta Doktora öğrencisi Havva GÜMÜŞ, Araştırma Görevlisi Eray ŞİMŞEK ve Doktora öğrencisi Hümeyra AYVACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4. 1. Horoz İbiği (*Amaranthus albus* L.)'nde gövdede kırmızılaşma ve küçük yaprak oluşumu (a), Semizotu (*Portulaca oleracea*)'nda küçük yaprak oluşumu, çalılaşma ve sarama simptomları (b) 20
Şekil 4. 2. Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.)'nda sararma ve küçük yaprak simptomu 21
Şekil 4. 3. Eşek Marulu (*Sonchus oleraceus* L.)'nda yapraklarda morarma simptomu (a); Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.)'nda sararma ve küçük yaprak simptomu (b)..... 21
Şekil 4. 4. Köpek Üzümü (*Solanum nigrum* L.)'nde gövde ve yapraklarda morarma ve küçük yaprak oluşumu 22
Şekil 4. 5. Domuz Pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.)'nda bir noktada birden fazla sürgün oluşumu ve küçük yaprak oluşumu 22
Şekil 4. 6. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1250 bp uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü 24
Şekil 4. 7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2,5) görüntüsü. 25
Şekil 4. 8. Fitoplazma etmeni açısından pozitif olarak saptanan Semizotu, Tarla Sarmaşığı, Çukurova Fenerotu yabancı ot örnekleri ve 42 fitoplazma türünün 16SrRNA gen dizilemesine göre *neighbour-joining* metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç..... 28
Şekil 4. 9. F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Fenerotu izolatı ve 16SrI-S alt grubunun kıyaslanmasıyla oluşturulan *in silico* RFLP profili..... 31
Şekil 4. 10. F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Semizotu,Tarla Sarmaşığı izolatları ve 16SrXII grubunun kıyaslanması ile oluşturulan *in silico* RFLP profilleri..... 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3. 1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri 16
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları 17
Çizelge 4. 1. Haliliye ilçesinden toplanan yabancı ot örnekleri 26
Çizelge 4. 2. Birecik ilçesinden toplanan yabancı ot örnekleri 26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	Santigrat derece
da	Dekar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
gr	Gram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
mM	Mili molar
pmol	Piko mol

KISALTMALAR

CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
bp	Baz çifti (base pair)
ddH_2O	Çift distile su
d	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromide
ETOH	Ethanol
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt
MLO	Mikoplazma Benzeri Organizma
ESFY	European stone fruit yellows
NaCl	Sodium Chloride
PVP	Polyvinylpyrrolydone

1.GİRİŞ

Solanacea familyasının bir üyesi olan biber bitkisi; Magnoliopsida sınıfının, Solanales takımının, *Capsium* L. cinsi içerisinde bulunmaktadır.

Biberin kökeninin Orta Amerika'dan geldiği bilinmektedir. Fakat yapılan taksonomik çalışmalar, biber türlerine göre kökeninin farklı dağılımlar gösterdiğini belirtmiştir. Örneğin; acı biberin orijininin Bolivya ve Brezilya olduğu tespit edilmiştir (McLeod ve ark., 1983). Biber yetiştiriciliği ilk defa M.Ö. 7.500'de yapılmış ve Amerika'da yetiştiriciliği yapılan ilk bitki türleri arasında yer almıştır. Biberin öncelikle Amerika'dan Avrupa'ya daha sonra ise Çin ve Hindistan'a hızla yayıldığı belirtilmiştir.

16. yy. başlarında İspanya'dan İngiltere'ye ulaşan biber bitkisi buradan da Avrupa ülkelerine geçmiştir. Biber Güney Afrika kıyıları vasıtasıyla İspanya'dan Hindistan'a ulaşmış daha sonra Asya kıtasına yayılmıştır. Türkiye'ye ise Basra Körfezi ve Kızıldeniz aracılığıyla Suriye üzerinden girdiği düşünülmektedir.

Sıcak ve ılıman iklim koşullarında yetişen biber bitkisi, bu faktörlerin etkisiyle tek veya birkaç yıllık olabilmektedir. Optimal gelişimi için sıcaklık, ışık yoğunluğu, toprak ve hava nemi gibi dış etkenler çok önemlidir. Gelişme periyodunun ilk aşamalarında ise sıcaklığa daha çok ihtiyaç duymaktadır. Sıcaklığın düşük olması durumunda geşimini tamamlamamış partenokap, kötü şekilli takoz meyveler oluşur.

Don olaylarına karşı çok hassas olduğundan sıcaklık sıfırın altında 2°C-3°C'ye düştüğünde gelişimine devam edemez. Bundan dolayı yastıklarda yetiştirilen fidelerin dikimi ilkbaharda don tehtidi geçtikten sonra, havanın ve toprağın sıcaklık koşulları optimum düzeye ulaştığında yapılmalıdır.

Ülkemizde Akdeniz bölgesi başta olmakla beraber Ege, Marmara, Karadeniz bölgelerinde biber üretiminin toplamda %85'i gerçekleştirilmektedir. Marmara ve Ege

bölgelerinde biber tarımı, sofralık ve gıda enstitüsünde farklı amaçlarda kullanılmak üzere yapılırken; Doğu ve Güneydoğuda pul ve toz biber üretmek amacıyla yapılmaktadır. Üretim hacminin büyük bir bölümü iç pazarda kullanılırken, %2'lik kadar az bir bölümü ise ihraç edilmektedir.

2019 yılı verilerine göre Türkiye'de 372.775 da'lık alanda 1.234.423 ton salçalık ve kapya, 122.952 da'lık alanda 371.918 ton dolmalık, 277.642 da'lık alanda 902.203 ton sivri, 19.305 da'lık alanda 117.125 ton çarliston biber üretimi yapılırken; Şanlıurfa'da 50.371 da'lık alanda 134.896 ton salçalık ve kapya, 1.438 da'lık alanda 3.286 ton dolmalık, 633 da'lık alanda 1.291 ton sivri biber üretimi yapılmıştır (TÜİK 2019).

Ülkemizde ve dünyada üretim payı artış gösteren ve ekonomik açıdan ciddi bir potansiyel kazanan biber yetiştiriciliğini kısıtlayan en önemli etmenler biyotik veya abiyotik etmenleridir. Biyotik faktörlerden biberlerde kök boğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici*), bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), biberde kök çürüklüğü (*Phythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp.) gibi fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin ve virüs hastalıklarının yanı sıra; Biber gal sineği (*Asphondylia capsici*), Telkurdu [*Heliothis armigera*, *Heliothis viriplaca* (=*Heliothis dipsacea*] Bozkurt (*Agrotis* spp.) Danaburnu (*Gryllotalpa gryllotalpa*) gibi zararlılar da ayrı bir öneme sahiptir. Abiyotik faktörlerden olan sıcaklık, nem, kuraklık, ışık gibi dış etmenler de biber yeiştiriciliğini etkilemektedir.

Bu etmenlerin yanı sıra son yıllarda ülkemizde ve dünyada biber yetiştirilen alanlarda sararmalar, yaprak nekrozları, çiçek kısırlığı, bir noktada birden fazla sürgün oluşumu ve bodurluk gibi simptomlar sergileyen; moleküler yöntemler vasıtasıyla saptanan ve adına fitoplazma denilen bakteriyel patojenler tespit edilmiştir.

Fitoplazmalar ilk kez 1967'de Japonya'da enfekteli dut dokusunda keşfedilmiştir (Zhu ve ark., 1998).

Biberde fitoplazma hastalığı, Amerika Birleşik Devletleri (Randall ve ark., 2009), Meksika (Lebsky ve Poghosyan, 2007, Santos-Cervantes ve ark., 2008, Lebsky ve ark., 2011), Kosta Rika (Villalobos ve ark., 2009), Bolivya (Arocha ve ark., 2010), İtalya (Murolo ve ark., 2010), Türkiye (Sertkaya ve ark., 2007), Hindistan (Khan ve Raj, 2006), Küba (Arocha ve ark., 2007), Lübnan (Choueiri ve ark., 2007), Australia (Tran-Nguyen ve ark., 2003), ve Spain (Castro ve Romero, 2002)'da rapor edilmiştir.

Oksal ve ark. 2016, yılında Malatya ili biber üretim alanlarında sararmalar, yaprak nekrozları, çiçek kısırlığı gibi simptomlar sergileyen bitkilerden DNA analizleri yapmışlar ve daha sonra yeni nesil dizileme teknolojileriyle bu simptomlara neden olan etmenin *Candidatus* Phytoplasma trifolii'den kaynaklandığını ortaya koymuşlardır.

Guo ve ark. (2017), Biberde yaptıkları çalışmada 16S rDNA dizilerinin filogenetik analizi, bu fitoplazmaların 16SrI "*Candidatus* Phytoplasma asteris" alt grubuna ait olduğunu bildirmişlerdir.

Fitoplazmalar, Prokaryotae aleminin Mollicute sınıfında yer alan, floemle sınırlı, hücre duvarı olmayan, hücreleri birbirinden 8-10 nm kalınlığında bir plazma membranıyla ayrılan, 70-1000 nm çaplı patojenler olup; tetrasiklin grubu antibiyotiklere karşı duyarlıdırlar (Ishiie ve ark., 1967; Agrios, 1997). Hücre duvarları olmadığından değişken şekillidirler. Konukçu hücrenin sitoplazmasında tomurcuklanarak çoğaldıkları, eşeyli çoğalmanın görülmediği bildirilmiştir (Welliver, 1999). Bazı böcek türlerinde veya bitkilerin floem dokularında obligat parazitler olarak özelleşmiş bakterilerdir.

Taksonomik olarak 1967'den 1994'e kadar Mikoplazma benzeri organizmalar (Mycoplasma Like Organisms-MLO) olarak adlandırılmaktayken, Seemüller ve ark., tarafından 1994'te fitoplazma olarak adlandırılmıştır. Mollicutes sınıfı içerisinde *Candidatus* Phytoplasma cinsine aittirler (IRPCM, 2004). Hücre çeperi olmayan gruba dahil organizmalar filogenetik yapısı ile ilgili olarak düşük G+C (Guanin+Sitozin) sahip, gram pozitif bakterilerdir (Weisburg ve ark., 1989; Pracros ve ark., 2006).

Fitoplazmalar çok çeşitli bitki türlerinde 300'den fazla bitki hastalığına neden olmaktadırlar (Hoshi ve ark., 2007). Enfekteli bitkiler sarılık, cadı süpürgesi, phyllody/virecense, yaprak bükülmesi ve geriye doğru ölüm şeklinde simptom göstermektedir (Bertaccini ve ark., 2005). İnfekteli bitkilerde en fazla görülen simptomlar karetenoidler ve klorofilin yıkılmasıyla ortaya çıkan sararma tipindeki belirtilerdir (Bertamini ve Nedunchezhian, 2001). Bitkiden bitkiye aktarılmalarının floemle beslenen yaprak pireleri aracılığıyla (Ploaie, 1981), aşıyla ya da *Cuscuta* spp. benzeri bazı parazitik bitkilerle olduğu tespit edilmiştir (Marwitz ve ark., 1974; Heintz, 1986; Seemüller, 1990).

Fitoplazmalar başlıca *Cicadellidae* (Yaprak pireleri), *Fulgoridae* (planthopper) ve *Psyllidae* familyalarına dahil böceklerle yayılmaktadırlar. Bitkilerin floem dokusuyla beslenen bu böcekler fitoplazma etmenini hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere taşımaktadırlar (Ploaie, 1981). Odunsu bitkilerin floem dokusunda bulunan fitoplazmalar sıcaklıkların artmasıyla, kök dokusundan vejetatif aksama doğru yayılmaktadırlar (Guthrie ve ark., 1998). İnfekteli bitkilerin floem dokusunda bulunan fitoplazmalar oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunduklarından bu etmenleri belirlemek oldukça zor olmaktadır (Berges ve ark., 2000).

Fitoplazma hastalığının ilk saptanması indikatör bitkiler ile olmuştur. DAPI ve serolojik yöntemler ile Elektron mikroskobuna dayalı teknikler fitoplazmaların saptanmasında indekslemeye alternatif bir yaklaşım getirmiştir (Hobbs ve ark., 1987). Son zamanlarda ise bitki üretim materyallerinde ve vektör böceklerde fitoplazmaların saptanmasında PCR'a dayalı teknikler kullanılmaktadır (Schaff ve ark., 1992). Günümüzde fitoplazmaların teşhisi 3 bölüme ayrılan PCR tekniği ile yapılmaktadır. Öncelikle simptomatik bitkilerden DNA ekstraksiyonu yapılır; sonra fitoplazmaya spesifik DNA, PCR ile çoğaltılır daha sonra ise RFLP analizi ile etmen saptanır (Marzachi, 2004). Fitoplazmalar ile infekteli örneklerin toplanması genellikle yaz sezonu boyunca yapılmaktadır (Christensen ve ark., 2004).

Fitoplazma hastalıkları ile mücadelede herhangi bir kimyasal ilaç etki etmediğinden genellikle mücadelesinde; dayanıklı bitki çeşitlerinin kullanımı,

bakteriostatik olarak tetrasiklinlerin kullanımı, vektör böcekler, yabancı ot ve küsküte karşı mücadele etmek hastalığın yayılmasını önlemede alınabilecek başlıca tedbirlerdendir.

Biber tarlalarında bazı hastalık etmenleri ve zararlı böceklerin yanı sıra verimi etkileyen diğer önemli faktörlerden birisi de yabancı ot problemidir. Şanlıurfa ili biber yetiştirilen alanlarda genel olarak bulunan yabancı otlar Semizotu (*Portulaca oleracea*), Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.), Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.), Adi Eşek Marulu (*Sonchus oleraceus* L.), Köpek Üzümü (*Solanum nigrum* L.), Horoz İbiği (*Amaranthus albus* L.), Domuz Pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.)'dir.

Yabancı otların biber bitkisine verdiği zarara baktığımızda, toprakta bulunan besin elementlerine ve suya ortak olmaları, biber bitkisinden hızlı gelişenlerin bibere gölge oluşturarak güneş ışığına engel olmaları en önemli zararlarındandır. Bunların yanı sıra yabancı otlar, ciddi hastalıklara neden olan fitoplazmalar için inokulum kaynağıdırlar ve hastalık etmenine konukçuluk yaparak yayılmasında önemli bir rol oynarlar (Blanche ve ark., 2003; Joomun ve ark., 2007; Pasquini ve ark., 2007; Harrison ve ark., 2008). Biber bitkisinin tarlada olmadığı zamanlarda zorunlu bir konukçuya ihtiyaç duyan fitoplazma hastalık etmenlerine konukçuluk yapmak suretiyle dolaylı yoldan da olsa zararları bulunmaktadır.

Fitoplazmalar, çeşitli yabancı otlarda hastalıklara neden olurlar. Bu da, fitoplazmaların ekonomik olarak önemli diğer bitkilere yayılmasını kolaylaştırabilir ve böylece yabancı otlar ekonomik kayıpları arttıran alternatif doğal konukçular olarak işlev görürler. Yabancı otlar üzerinde görülen en belirgin hastalık simptomları, yaygın kloroz, bir noktada birden fazla sürgün ve cadı süpürgesi oluşumu, sararma ve küçük yaprak oluşumlarıdır. Şimdiye kadar, dünyanın dört bir yanından bildirilen fitoplazma infeksiyonlarına sahip 43'den fazla yabancı ot türü saptanmıştır. Nükleotid dizisi çalışmaları, yabani ot fitoplazmalarının esas olarak 16SrI, 16SrIV, 16SrVIII, 16SrXI ve 16SrXIV gruplarına ait olduğunu göstermiştir. Bunların arasında 16SrI ve 16SrXIV

grubundaki fitoplazmalar, tüm dünyada daha geniş bir yayılıma sahiptir (Mall ve ark., 2010).

Yabancı otlar ile ilişkili olan bu fitoplazmaların erken saptanması, fitoplazma hastalıklarının ekonomik açıdan önemli kültür bitkilerine yayılma olasılığını kontrol etmek için çok önemlidir.

Fitoplazma konukçuları olarak tanımlanan yabancı otlar genellikle kültür bitkileri çevresinde bolca yetişmesine rağmen ekonomik olarak önemli kültür bitkilerine ve tersine geçişleri göz ardı edilemez. Bunun nedeni, fitoplazmaların birçok potansiyel ekonomik ürün içinde hayatta kalabilmeleri veya bir böcek vektörünün fitoplazmaları diğer yabancı otlardan sağlıklı bitkilere aktarma yeteneğine sahip olmalarıdır. Fitoplazmaların bu geniş konukçu aralığının bilinmesi hastalığın epidemiyoljisi ve mücadelesi için önemli bir parametredir.

Bu çalışma gerek dünya gerekse ülkemiz açısından ekonomik önemi olan biber bitkisinin Şanlıurfa iline bağlı Haliliye ve Birecik ilçelerindeki yetiştirme alanlarında bulunan fitoplazmaların alternatif yabancı ot konukçularini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Aynı zamanda fitoplazmalarla mücadele olanaklarının geliştirilmesi açısından hastalığın epidemiyolojisi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fitoplazmalar, Mollicutes sınıfına ait hücre duvarından yoksun floemle sınırlı bitki patojeni bakterilerdir (Lee ve ark., 1998).

Fitoplazmalar büyüklükleri 530 ila 1350 kilobaz arasında değişen küçük bir genom, % 24 ila %33 mol arasında bir G + C içeriği, iki rRNA operosu, düşük sayıda tRNA ve sınırlı bir dizi metabolik enzime sahiptir (Marcone ve ark., 1999; Oshima ve ark., 2004).

Fitoplazmalar yabancı otlar da dahil olmak üzere yüzlerce bitki türünde hastalıklarla ilişkilidirler (Marcone ve ark., 1997).

Tipik fitoplazma simptomları; phyllody/virecense, çiçek kısırlığı, bir noktada birden fazla sürgün ve cadı süpürgesi oluşumu, çalılaşma ve genel olarak bitkide bodurluktur (Bertaccini ve ark., 1996; 2014).

Fitoplazmalar, vektör böceklerin beslenme aktivitesi sırasında böcek vücuduna alınır ve yine bu böcekler aracılığıyla bitkiden bitkiye yayılırlar. Bu fitoplazmalar bitki floeminde ve böcek hemolimfinde hayatta kalır ve çoğalırlar (Bertaccini ve ark., 2014).

Günümüzde, fitoplazmaların karakterizasyonu ve sınıflandırılması esas olarak RFLP, 16SrDNA veya diğer daha az korunmuş genlerin sekans analizine dayanırken, tespit esas olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testiyle yapılır (Bertaccini ve ark., 2014; Lee ve ark., 2000; Seemüller ve ark., 1998).

Delić ve ark. (2016), Nested-PCR ve RFLP analizleri vasıtasıyla ilk kez *Candidatus* Phytoplasma solani etmenini Bosna Hersek'te kereviz ve biber bitkilerinde saptamışlardır. Biberde sararma ve bodurlaşma simptomları gözlenirken, kerevizde ise yapraklarda beyazlaşma ve bodurlaşma gözlenmiştir.

Akdeniz havzasında bulunan bazı bölgelerden domates, biber ve patatesin fitoplazma ile enfeksiyonu olduğu rapor edilmiştir (Avinent ve Llacer, 1995; Cousin ve ark., 1968; Cousin ve ark., 1989; Fos ve ark., 1992; Marcone ve Ragozzino, 1995; ZimmermanGries ve Klein, 1978).

Türkiye'de 2002-2004 yılları arasında patlıcan, biber ve susamda fitoplazma etmeni teşhis edilmiştir. Saptanan etmenlerin RFLP desenleri 16SrVI-A grubuna ait olan ırklarla ve domates iri tomurcuk fitoplazmasıyla yakından ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Sertkaya ve ark., 2007).

'*Candidatus* fitoplazma solani' Avrupa-Akdeniz bölgesinde, asma, mısır, patates, biber, kereviz ve tütünde dahil olmak üzere bir çok ekili bitkinin çeşitli hastalıklarına bağlı olarak yaygın olarak bulunan bir fitoplazmadır (Bertaccını ve ark., 2014).

Yabacı otlar, hem fitoplazma infeksiyonu için bir rezervuar hem de vektörler için reprodüktif konukçu olarak görev yapar (Singh ve Upadhyaya, 2013).

Fitoplazmalarla infektelenen birçok yabancı otun sararma, cadı süpürgesi ve beyaz yaprak oluşumu gibi çok çeşitli simptomlar gösterdiği bilinmektedir (Dabek, 1983; Shiomi ve ark., 1983; Choi ve ark., 1985; Reddy ve Jeyarajan, 1990; ÇTran-Nguyen ve ark., 2000; Arocha ve ark., 2005; Marcone ve Rao, 2008).

Fitoplazmaların Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.), Yabani Marul (*Lactuca serriola* L.), Kanyaş [*Sorghum halepense* (L.) Pers.], Köpek Dişi Ayrığı [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.], Kanada Şifa Otu [*Conyza canadensis* (L.) Cronq.] ve diğer bazı yabancı otlarda dahil olmak üzere hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Arocha-Rosete ve Jones, 2010; Babaie ve ark., 2007; Li ve ark., 2013; Marcone ve ark., 1997; Salehi ve ark., 2006; Shubhrata, 2004; Thereza ve Baross, 2002; Vali Sichani ve ark., 2014).

Litvanya' da *Poa stunt* (PoaS) ve *Festuca yellow* (FeaY) fitoplazmaları Çayır Salkım Otu (*Poa pratensis*) ve Kamışsı Yumak (*Festuca arundinacea*)'ta tespit edilmiş ve bunlar altgrup 16SrI-C'nin üyeleri olarak tanımlanmıştır (Valiūnas ve ark., 2007).

Çin'de buğday tarlaları yakınında bulunan Kaba Tüylü Solmaz Çiçek (*Amaranthus retroflexus*), Taşkesen Otu (*Lithospermum arvense)*, Sadırotu (*Descurainia sophia*), Çalgıcı Otu (*Erysimum cheiranthoides*), Yabani Yulaf (*Avena fatua*), Salkım Yulaf (*Eragrostis cilianensis*), Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum*), Ak Üçgül (*Trifolium repens*) gibi yabacı otlar 16SrI-C altgrup buğday cüce fitoplazmasının konukçuları olarak tanımlanmıştır (Wu ve ark., 2010).

Çin'in Qijiang şehrinde biber arazisinde küçük yapraklı bir yabancı ot olan meksika çayı (*Chenopodium ambrosioides*)'nda 16SrI-B grubu ile ilişkili bir fitoplazma tespit edilmiştir (Li ve ark., 2012).

İran'da yerfıstığında küçük yaprak, boğum arası kısalığı, çalılaşma simptomları ile Çediotu (*Prosopis farcta*)'da; Çiçek kısırlığı, phyllody/viresence, cücelik simptomları ile Diğnik (*Cardaria draba*)'te; phyllody simptomu ile Aynısefa (*Calendula officinalis*) yabancı otlarında Peanut Witches' Broom (16SrII) ile ilişkili fitoplazmalar tespit edilmiş (Esmailzadeh Hosseini ve ark., 2011a, b).

Macaristan'da bağ üretim alanlarında Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) ve Devedikeni (*Cirsium* spp.)'de 16SrIII grubu fitoplazmaları saptanmış (Palermo ve ark., 2004). Sırbistan'da köygöçüren (*Cirsium arvense*)'de benzer fitoplazma tespit edilmiş (Rančić ve ark., 2005).

2007 yılında Suudi Arabistan'daki misket limonu ağaçlarının yaklaşık %25'i verimini kaybetmiş. Bunun üzerine yapılan bir araştırmada limon ağaçlarında; *Chenopodium murale, Plantago lanceolate,* ve *Convolvulus arvensis* yabancı otlarında; *Empoasca decipiens* zararlısında 16SrII grubu fitoplazmalar tespit edilmiş (Alhudaib ve ark., 2009).

İran'da yonca tarlalarında büyüyen *Convolvulus arvensis* yabancı otunun *Ca.* Phytoplasma amanense ile %99 benzerlik gösteren fitoplazmalarla enfekteli olduğu saptanmış fakat yapılan spesifik RFLP analizleriyle ondan ayrılarak 16SrXXIX-B alt grubuna ait olduğu tespit edilmiş (Esmailzadeh Hosseini ve ark., 2016a).

İran'da Kanyaş (*Sorghum halepense*), Kanada Şifa Otu (*Conyza canadensis*), ve Kökboya Bitkisi (*Rubia tinctorum*)'nde cadı süpürgesi, küçük yaprak ve sarılık simptomları ile 16SrVI ribozomal gruba ait fitoplazmalar saptanmış (Zibadoost ve Rastgou, 2016).

İran'ın Hormozgan şehrinde narenciye bahçelerinde bir yabancı ot olan Çoban İğnesi (*Bidens alba*)'nde küçük yaprak, cadı süpürgesi, virescense/phyllody simptomları gözlemlenmiş ve analizlerden sonra '*Ca*. P. phoenicium' (16Sr-IX) ile ilişkilendirilmiş (Hemmati ve ark., 2017).

Credi ve ark. 2006, İtalya'nın Emilia-Romagna bölgesindeki üzüm bağlarında 30 bitki türünden oluşan 162 ekinsiz doğal bitki örneğini incelemiş ve aralarında *Sonchus oleraceus* konukçusununda bulunduğu örneklerin % 48.1'inin "stolbur" fitoplazması için pozitif sonuç verdiğini bulmuşlardır.

Almaya'da elma bahçesi etrafında toplanan Köygöçüren (*Cirsium arvense*)'nin cirsium phyllody (CIRP) ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Bu bitki SCWL grup üyeleri ile yakından ilişkilendirilmiş. SCWL ve BVK fitoplazmaları ile sırasıyla %96.9, %96.7 oranında 16SrRNA sekans özelliği paylaştığı bildirilmiştir (Schneider ve ark., 1997).

Çek Cumhuriyetin'de 2 üzüm bağından ve yoğun sebze ekim alanlarından topladıkları Kaba Tüylü Solmaz Çiçek (*Amaranthus retroflexus*), Köygöçerten (*Cirsium arvense*) ve Boru Çiçeği (*Datura stramonium*), Isırgan Otu (*Urtica Dioica*) gibi yabancı otlarda *tuf*-tip b tipine ait olan stolbur fitoplazmasını rapor etmişlerdir (Fialová ve ark., 2009).

BGWL fitoplazması Köpek Dişi Ayrığı (*Cynodon dactylon* L.)'nda beyaz yaprak hastalığına neden olan bir fitoplazma etmenidir ve ilk olarak Tatvan'da rapor edilmiştir (Chen ve ark., 1972).

Livingston ve ark. (2006), Umman'da bir yabacı ot olan Sütotu (*Polygala mascatense)*'nda bodurluk, küçük yaprak, gür büyüme simptomları ile 16SrII grubu fitoplazmayı ilk kez raporlamışlardır.

Reeder ve ark. (2008), İngiltere'de sararma simptomu gösteren Bostan Kanaryaotu (*Senecio jacobaea)*'nda 16SrI grubuna ait bir fitoplazma rapor edilmiştir.

Kloroz, küçük yaprak oluşumu, boğum arası kısalığı, bodurluk gibi fitoplazma benzeri simptomlara neden olan fitoplazma etmenlerini tespit etmek amacıyla, sonbahar boyunca Türkiye'nin güneydoğusundaki dört ilin (Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Şanlıurfa) yoğun ekim alanlarındaki biber (Capsicum annum L.) üzerinde kapsamlı bir araştırma yapılmıştır. Çalışma sonucuna göre Şanlıurfa'dan alınan izolat "*Candidatus* Phytoplasma trifolii" (16SrVI) ile % 99 benzerlik göstermiştir ve 16SrVI-A altgrubunun bir üyesi olduğu saptanmış. Mersin'den alınan izolat ise "*Candidatus* Phytoplasma asteris" (16SrI) % 96 benzerlik göstermiştir (Yılmaz ve ark., 2019).

Hindistan'da yaygın olarak ortaya çıkan *Acalypha indica* L. üzerinde küçük yaprak, sararma, bodurluk, kloroz gibi tipik fitoplazma simptomları gözlenmiş. 16SrRNA gen dizisine ve sanal RFLP'ye dayanarak *Acalypha indica* L. da 16SrI-B altgrubu olan '*Ca*. P. asteris' tespit edilmiştir (Chaube ve ark., 2015).

Palmiye, çay, kahve bitkilerinin bulunduğu fidanlık ve otlaklarda, yaygın ve önemli çok yıllık bir yabancı ot olan Küstüm Otu (*Mimosa pudica*) , Endonezya'da cadı süpürgesi, bodurluk ve sararma gibi simptomlar göstererek '*Ca*. P. asteris' ile ilişkilendirilmiştir (Boa ve ark., 2010).

Tuf geninin sekansına ve RFLP profiline göre, Langer ve Maixner (2004), "stolbur" fitoplazmasını iki ana gruba ayırmıştır. Bunlar doğal salgın döngülerinde rol oynayan genetik tipler, *tuf* tip I (*tuf* tip a) ve *tuf* tip II (*tuf* tip b)'dir. *Tuf*-tipi a'ya ait türler çoğunlukla Almanya'da *U. dioica* yoluyla yayılırken, *tuf*-tipi b türleri daha az spesifiktir ve *C. arvensis*, *C. sepium*, *Prunus spinosa* ve *Solanum nigrum*'da bulunmuştur.

Bangladeş'te *Mikania* sp. yabancı otunda *Ca*. Phytoplasma asteris saptanmış (Kelly ve ark., 2009).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve bitkisel materyaller

Araştırma Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırma bitkisel materyallerini Şanlıurfa iline bağlı Haliliye ve Birecik ilçelerinde biber üretim alanlarındaki fitoplazma belirtileri gösteren yabancı otlar oluşturmuştur.

3.1.2. PCR ve RFLP çalışmaları için materyalin oluşturulması

Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında bulunan ve tipik fitoplazma simptomları gösteren yabancı otlardan DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen bu DNA'lar PCR ve RFLP çalışmaları için materyal olarak kullanılmıştır.

RFLP çalışmalarında *EcoR*I (Thermo Scientific, ABD*),* enzimi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması

Şanlıurfa iline bağlı Haliliye ve Birecik ilçelerinde biber ekim alanlarında görülen; yapraklarda sararma, yaprak ve gövdede morarma, küçük yaprak oluşumu, kloroz, bir noktada birden fazla sürgün ve cadı süpürgesi oluşumu oluşumu biçiminde simptom gösteren ve fitoplazma ile bulaşık olduğundan şüphelenilen yabancı otlar güdümlü örnekleme yapılarak toplanmıştır. Bu örnekler polietilen poşetlerde muhafaza edilmiş, alındığı tarihe ve yere ilişkin verileri içerecek şekilde etiketlenerek

laboratuvara getirilmiştir. Örnekler total nükleik asit izolasyonu işlemine kadar +4 derecede korunmuştur.

3.2.2. DNA ekstraksiyonu çalışmaları

DNA ekstraksiyonu çalışmaları Ahrens ve Seemüller (1992)'in kullandığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

1- İnfekteli bitkilerin genç yaprak ve floemlerinden alınan örnek (1 g örnek için 6 ml) CTAB buffer [4g CTAB (%2), 16.364g NaCI (1.4M) 1.169g EDTA (20mM), 2.422g Tris-HCI (100mM), 400 µl β-mercaptoethanol(%2), PH:8.0] ile DNA ekstraksiyon poşeti içinde ezilmiştir.

2- Ekstraksiyon poşetlerinde ezilen örneklerden 1000 mikrolitre alınıp 1.5. ml'lik Eppendorf tüplerine konulmuş ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

3- Santrifüj yapılan örneklerin süpernatant kısmından 600 mikrolitre alınıp 1.5 ml'lik yeni Eppendorf tüplerine transfer edilip; tüpler 30 dakika 65°C de su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır.

4- Daha sonra parçalama için tüpler içerisine 600 mikrolitre kloroform/ izoamilalkol (24:1) ilave edilerek 1 dakika süreyle karıştırılmıştır.

5- Tüpler 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

6- Santrifüjden alınan örneklerin süpernatant kısmından 500 mikrolitre alınarak yeni eppendof tüpelerine aktarılmış ve üzerine 500 mikrolitre kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenerek 1 dk vortex yapılmıştır.

7- Daha sonra tüpler 12.000 rpm'de 10 dakika 5°C'de santrifüj edilmiştir.

8- Santrifüjden alınan tüplerin süpernatant kısmından 300 mikrolitre alınarak yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine 2/3 oranında isopropanol eklenerek -20 derecede 1 saat bekletilmiştir.

9- Sıvı kısmı dökülen örneklerin üzerine 1000 mikrolitre %70'lik etanol eklenerek 13.000 rpm'de 7 dk santrifüj yapıldıktan sonra tekrardan akışkan kısım tamamen dökülmüştür.

10- Santrifüjden alınan tüplerin sıvı kısmi tamamen dökülerek elde edilen pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra pellet 50 µl TE (1X) buffer ile çözdürülen total DNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C de korunmuştur.

11- Alınan tüplerin sıvı kısmi tamamen dökülerek elde edilen pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra pellet 50 µl TE (1X) buffer ile çözdürülen total DNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C de korunmuştur.

3.2.3. PCR çalışmalarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonları

PCR işlemi 200 µl'lik PCR tüplerinde 50 µl hacimde yürütülmüştür. PCR işlemi için kaynak olan DNA miktarları yoğunluk baz alınarak 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir. Amplifikasyon sırasında her primer 10 pmol/µl konsantrasyona ayarlanmıştır.

Çalışmada gerekli olan hedef bölgelerin çoğaltımı için 100'er mM Deoksinükleotid trifosfat (dTTP, dATP, dGTP, dCTP)' lar dan 20'şer µl alınarak 25 mM olan 80µl'lik dNTP karışımı elde edilmiştir ve karışıma 120µl ddH_2O ilave edilerek 200 µl' ye tamamlanmıştır. Bu karışımda dNTP'ler 10 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. DNA'nın çoğaltılması aşamasında kullanılan 25 mM $MgCl_2$ stok solüsyonu 1,5 mM çalışma hacminde ve Taq Buffer'ın son hacmi 1X konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Taq DNA Polimeraz (5u/µl) enzimi 1,25u kullanılırken, ddH_2O'nun son hacmi 50 mikrolitre olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.4. Hedef bölgelerin çoğaltılması (PCR)

Araziden toplanan örneklerden elde edilen nükleik asitler PCR çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmaları patojenin 16SrDNA geni üzerinden yapılmıştır. PCR çalışmalarında örneklerde patojenin saptanması için Direkt-PCR ve Nested-PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmıştır. Direkt-PCR'da 1.400 bp ürün veren universal R16F1/R16RO primerleri ve Nested-PCR'da 1.250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve dizileri

	DNA uzunluğu	Primerler	Baz dizilimi	Referans
Üniversal Primer çifti	1.400 bp	R16F1	5'-AAGACGAGGATAACAGTGG-3'	(Lee ve ark., 1994)
		R16R0	5'GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3'	(Davis ve ark., 1997)
Nested Primer çifti	1.250 bp	R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	(Lee ve ark.,1995)
		R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	(Lee ve ark., 1995)

200 µl'lik PCR tüpüne 2 µl DNA, 1 µl forward primer (10 pmol/µl,), 1 µl reverse primer (10 pmol/µl,), 1 µl dNTP karışımı (10 mM), 5 µl Dream Taq Green Buffer (10X), 1.25 Taq polimeraz enzimi (5u/µl) ve 38.75 µl ddH_2O ile son hacmi 50 µl olacak şekide ayarlanmıştır. PCR tüpleri programlanması önceden yapılmış olan termocycle cihazına yerleştirilmiştir. Örneklerin tabi tutulduğu termocycle programında 35 döngü içerisinde bulunan bağlanma sıcaklığı (annealing temperatutre) primerin tm (melting temperature) değeri dikkate alınarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları

Primer	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Primer Bağlanması	Uzama	Son Uzama
	(1 döngü)		(35 döngü)		(1 döngü)
R16F1 / **R16R0**	95°C 3 dk	95°C 1 dk	52°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

R16F1/R16R0 primer çifti ile yapılan direkt-PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılmış ve sulandırılmış üründen alınan 1 µl PCR ürünü nested-PCR da hedef nükleik asit olarak kullanılmıştır. Nested-PCR çalışması yukarda belirtildiği şekilde yürütülmüştür. Nested-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri 1X TAE (pH 8,0)'de hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 80 V'ta 80 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Agaroz jel 10 dakika ethidium bromide ile boyanıp daha sonra 10 dakika su ile yıkanmıştır. Agaroz jelde beklenen bant görüntüsü UV ışık ile kontrol edilmiştir.

PCR çalışmaları sonucunda beklenen molekül ağırlığına sahip DNA bantları, RFLP çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimeri ile kesilmesi (RFLP)

RFLP çalışması için PCR aşamasında agaroz jel elektroforez yöntemi ile bant görüntüsü elde edilen PCR ürünlerinin bir fitoplazma etmenine ait olup olmadığı *Eco*RI enzimi kullanılarak kontrol edilmiştir (Nejat ve ark., 2009). *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde fitoplazma hastalığının varlığını ortaya koyan 750 bp ve 500 bp'lik bantlara ayrılan örneklerde fitoplazma etmeninin varlığı kesinleşmiştir. RFLP çalışmaları enzimin alındığı firmanın (Thermo Scientific, ABD), önerdiği protokol dikkate alınarak yürütülmüştür.

RFLP çalışmalarında 10 µl PCR ürünü, 14 µl ddH_2O ile sulandırılmış ve 2 µl RE 10X buffer, 4 µl restriksiyon enzimi eklenmiştir. Enzimin geni hedef noktadan kesmesi için örnekler 37 °C 4 saat boyunca inkube edilmesinin ardından 1X TAE (pH 8,0)' de hazırlanmış %2,5'lik agaroz jelde incelenmiştir.

3.2.6. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Agaroz Jel Elektroforez çalışmalarında PCR ve RFLP çalışmaları sonucunda çoğaltılacak DNA'ler kontrol edilmiştir. Agaroz Jel Elektroforez çalışması Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre yapılmıştır.

İşlemler sırasıyla;

1- Agaroz 800 mg olacak şekilde 80 ml 1X TAE buffer içerisine konulmuştur.

2- Bu Agaroz-TAE buffer karışımı kaynayıp, agaroz eriyene kadar bir mikrodalga fırın içerisinde ısıtıldıktan sonra volum 20 ml'ye ayarlanmıştır.

3- Karışım 60°C olana kadar soğumaya bırakılmış ve ardından tarak geçirilmiş olan tank içerisine boşaltılmıştır.

4- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çekilip elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jel'in üzerini 1-2 mm geçecek şekilde 1X TAE buffer ilave edilmiştir.

5- 6 µl örnek jeldeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa 6 µl marker konulmuştur. Jel elektroforez 80 Voltta yaklaşık 80 dakika çalıştırılmıştır.

6- 80 dakika sonunda jel, oda sıcaklığında 10 dakika 100 ml H_2O +30 µl (10mg/ml distilate su) ethidium bromide karışımı içerisinde boyanmıştır

ve daha sonra jel üzeindeki fazla ethidium bromide uzaklaştırmak için 10 dakika suda bekletilerek yıkanmıştır.

Sonuçlar transilluminatör ile incelenmiştir.

3.2.7. F2n/R2 dizileri ile sekans analizi ve *in silico* RFLP

Çalışmada pozitif olarak saptanan yabancı ot örneklerinden elde edilen 1250bp'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI enzimi ile kesilerek fitoplazma hastalığının varlığının kesinleştirilmesinin ardında R16F2n/R2 dizileri, veri tabanı araştırması için MEGA7 programı birleştirilmiş ve daha sonra NCBI gen bankasında Blast edilmiştir. GenBank'ta mevcut olan yakından ilişkili diziler belirlenmiştir.

Fitoplazma tür teşhisi, 16Sr grubu/alt grubu sınıflandırması ve *İn silico* RFLP benzerlik katsayısı tespiti, *i*Phyclassifier yazılımı kullanılarak F2n/R2 dizilerinden gerçekleştirilmiştir (Zhao ve ark., 2009). Yabancı otlarda teşhis edilen fitoplazmaların RFLP profilleri *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I ve *Taq*I enzimlerine göre kıyaslanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları ve Örnekleme

Şanlıurfa ilinin biber yetiştirilen alanlarında bulunan fitoplazmaların yabancı ot konukçularının belirlenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmada, Birecik ve Haliliye ilçelerinin biber yetiştirilen alanlarında yapılan surveyde şiddetli kloroz, bir noktada birden fazla sürgün oluşumu, sararma ve küçük yaprak oluşumu biçiminde tipik fitoplazma simptomu gösteren yabancı otlar güdümlü örnekleme yapılarak alınmıştır.

Survey yapılan alanlarda en çok rastlanan yabancı otlar Semizotu (*Portulaca oleracea*) (Şekil 4.1.), Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.) (Şekil 4.1.), Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.) (Şekil 4.2.), Adi Eşek Marulu *(Sonchus oleraceus* L.*)* (Şekil 4.3.), Köpek Üzümü (*Solanum nigrum* L.) (Şekil 4.4.), Horoz İbiği (*Amaranthus albus* L.) (Şekil 4.5.), Domuz Pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.) (Şekil 4.6.)'dir. Bu yabancı otlar üzerinde gözlemlenen dikkat çekici simptomlar tüm bitkilerde sararma, bodurluk, gövdede kızarma, çalılaşma gibi tipik fitoplazma simptomlarıdır.



Şekil 4. 1. Horoz İbiği (*Amaranthus albus* L.)'nde gövdede kırmızılaşma ve küçük yaprak oluşumu (a), Semizotu (*Portulaca oleracea*)'nda küçük yaprak oluşumu, çalılaşma ve sarama simptomları (b)



Şekil 4. 2. Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.)'nda sararma ve küçük yaprak simptomu



Şekil 4. 3. Eşek Marulu (*Sonchus oleraceus* L.)'nda yapraklarda morarma simptomu (a); Çukurova Fenerotu (*Physalis angulata* L.)'nda sararma ve küçük yaprak simptomu (b)



Şekil 4. 4. Köpek Üzümü (*Solanum nigrum* L.)'nde gövde ve yapraklarda morarma ve küçük yaprak oluşumu



Şekil 4. 5. Domuz Pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.)'nda bir noktada birden fazla sürgün oluşumu ve küçük yaprak oluşumu

Mezreli ve Güldür, 2019 yılında Şanlıurfa iline bağlı Birecik, Siverek, Bozova ve Haliliye ilçelerindeki biber üretim alanlarında fitoplazma etmenini saptamışlardır. Fitoplazma açısından pozitif olarak saptanan biber bitkilerinde gözlemledikleri en yaygın simptomlar sararma, bodurlaşma, küçük yaprak oluşumu, birden fazla sürgün oluşması şeklinde olmuştur. Şanlıurfa ili biber üretim alalarındaki fitoplazmaların alternatif yabancı ot konukçularını belirlemek amacıyla yürüttüğümüz bu çalışmada biber bitkisinde daha önce belirlenen simptomların benzeri yabancı otlarda da gözlemlenmiştir.

Marcone ve ark. (1997), İtalya'da Tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.)'nda fitoplazma etmenini tespit ettikleri çalışmada sararma, küçük yaprak oluşumu ve çalılaşma biçiminde simptomlar gözlemlemişlerdir. Şanlıurfa ili biber üretim alanlarındaki yabancı otlarda bulunan fitoplazmaların teşhisi için yürütülen bu çalışmada da Tarla sarmaşığı'nda gözlenen simptomlar bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

4.2. Moleküler Çalışmalar

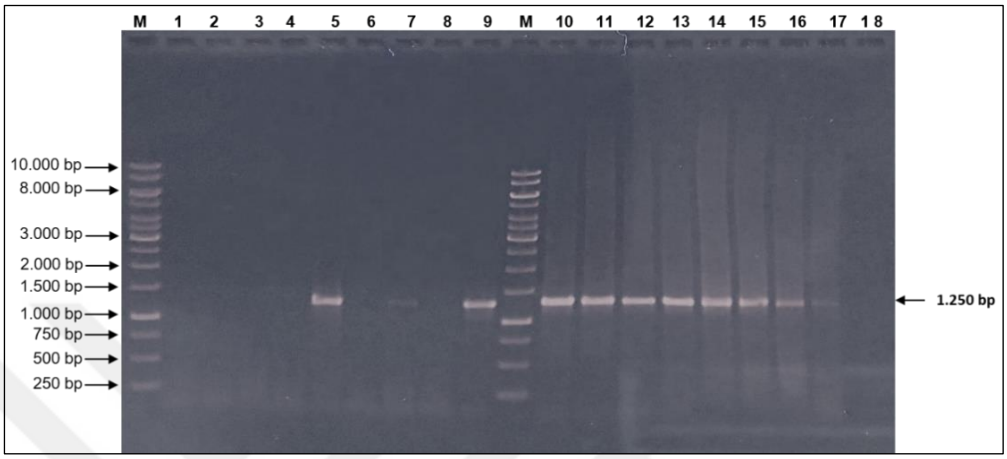
4.2.1. DNA izolasyonu

Biber yetiştirilen alanlardaki yabancı otlarda fitoplazma etmenini saptamak amacıyla fitoplazma simptomu gösteren yabancı otların yaprak orta damarı veya küçük yapraklarından total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu Ahrens ve Seemüler 1992, yönteminde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve RFLP çalışmaları

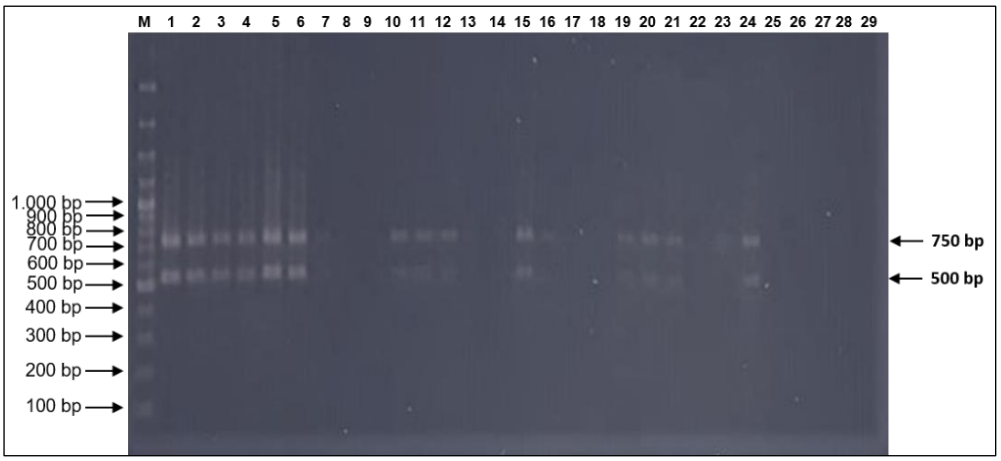
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi, Direkt-PCR ve Nested-PCR olmak üzere iki aşamada yapılmıştır. Direkt-PCR'da 1.4 kb ürün veren üniversal R16F1/R16R0 primerleri, Nested-PCR'da ise 1.25 kb ürün veren R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, fitoplazma açısından daha önce pozitif olarak saptanmış olan Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*)'nin DNA'sı

kullanılırken su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Direkt-PCR ürünleri 1/50 oranında sulandırılarak Nested-PCR yapıldığında; fitoplazma simptomu gösteren bazı yabancı ot örneklerinde beklenen düzeyde bant (1.250 bç) elde edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 6. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan 1.250 bp uzunluğundaki Nested PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Çalışma sonucunda elde edilen ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek beklenen düzeyde (1250 bp) bant veren DNA örnekleri, etmenin fitoplazma olup olmadığı konusunda kesin kanıya varmak için *Eco*RI enzimi kullanılmıştır (Nejat ve ark.,2009; Marzachi 2004; Seemüler 1998; Christensen ve ark., 2004). RFLP çalışmasında kullanılan enzimin temin edildiği üretici firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yürütülmüştür. Çalışmada pozitif olduğu saptanan yabancı otlardan elde edilen 1250 bp'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI enzimi ile kesildiğinde 750 bp ve 500 bp'lik bantlara ayrılarak PCR sonucunda elde edilen 1.250 bp DNA' nın fitoplazma etmenine ait olduğu ve sonuçta fitoplazma kaynaklı bir hastalığın varlığı kesinleştirilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 7. R16F2n/R2 primerleri ile çoğaltılan PCR ürünlerinin *Eco*RI restrüksiyon endonükleaz enzimi ile muamelesi sonucu elde edilen agaroz jel (%2,5) görüntüsü.

4.2.3. Örnekleme yapılan yabancı otlarda fitoplazma tespiti

Nested-PCR sonuçlarına göre survey yapılarak Şanlıurfa ili Haliliye ilçesiden 04.10.2018 tarihinde alınan ve fitoplazma simptomları gösteren 9 Semizotu (*P. oleracea*), 12 Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.), 7 Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.), 3 Domuz Pıtrağı (*X. strumarium* L.), 5 Eşek Marulu (*S. oleraceus* L.) ve 6 Köpek Üzümü (*S. nigrum* L.) olmak üzere toplam 42 örnekten; 4 Semizotu (*P. oleracea*), 3 Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.) ve 2 Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.) olmak üzere toplamda 9 örnekten pozitif sonuç alınırken (Çizelge 4.1.); Şanlıurfa ili Birecik ilçesinden 18.10.2018 tarihinde alınan ve fitoplazma simptomları gösteren 5 Semizotu (*P. oleracea*), 4 Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.), 6 Köpek Üzümü (*S. nigrum* L.), 10 Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.), 3 Domuz Pıtrağı (*X. strumarium* L.), 7 Eşek Marulu (*S. oleraceus* L.) ve 5 Horoz ibiği *(A. albus* L.) olmak üzere toplam 40 örnekten; 2 Semizotu (*P. oleracea*), 2 Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.), 4 Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.) ve 2 Eşek Marulu (*S. oleraceus* L.) olmak üzere toplamda 10 örnek pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.2.). Elde edilen veriler dikkate alındığında farklı türde ve sayıda toplanan 82 yabancı ot örneğinden toplam 19 pozitif sonuç elde edilmiştir. Şanlıurfa'nın Birecik ve Haliliye ilçelerindeki biber arazilerinde toplanan ve pozitif olduğu saptanan Tarla Sarmaşığı, Çukurova Fenerotu, Semizotu ve Adi Eşek Marulu gibi yabancı otların toplandığı arazilerdeki fitoplazma hastalığı ile bulaşıklık oranının % 23.17 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 1. Haliliye ilçesinden toplanan yabancı ot örnekleri

Yabancı ot	Simptom	Toplam örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı
Semizotu (*P. oleracea*)	Küçük yaprak oluşumu ve sarama	9	4
Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.)	Küçük yaprak oluşumu ve sararma	12	3
Domuz Pıtrağı (*X. strumarium* L.)	Bir noktada birden fazla sürgün oluşum	3	0
Eşek Marulu (*S. oleraceus* L.)	Gövdede kırmızılaşma, küçük yaprak oluşumu	5	0
Köpek Üzümü (*S. nigrum* L.)	Gövdede kırmızılaşma, küçük yaprak oluşumu	6	0
Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.)	Küçük yaprak oluşumu ve sararma	7	2

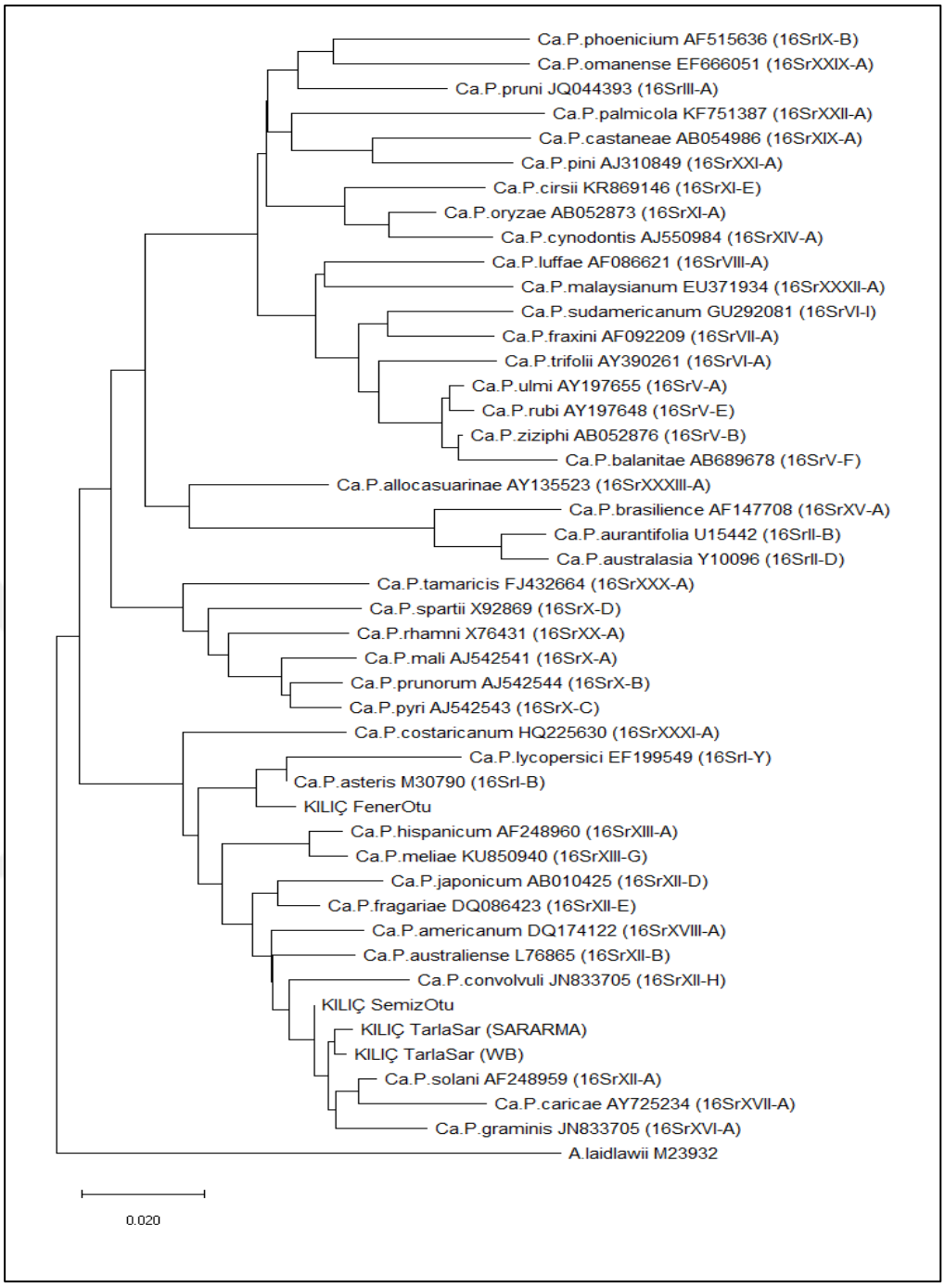
Çizelge 4. 2. Birecik ilçesinden toplanan yabancı ot örnekleri

Yabancı ot	Simptom	Toplam örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı
Semizotu (*P. oleracea*)	Küçük yaprak oluşumu ve sararma	5	2
Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.)	Küçük yaprak oluşumu ve sararma	10	4
Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.)	Küçük yaprak oluşumu ve sararma	4	2
Domuz Pıtrağı (*X. strumarium* L.)	Bir noktada birden fazla sürgün oluşum	3	0
Eşek Marulu (*S. oleraceus* L.)	Gövdede kırmızılaşma, küçük yaprak oluşumu	7	2
Köpek Üzümü (*S. nigrum* L.)	Gövdede kırmızılaşma, küçük yaprak oluşumu	6	0
Horoz ibiği (*A. albus* L.)	Gövdede kırmızılaşma, küçük yaprak oluşumu	5	0

4.2.5. Sekans analizi ve filogenetik ağaç

Çalışmada pozitif olduğu saptanan yabancı ot örneklerinden elde edilen 1250bp'lik Nested-PCR ürünleri *Eco*RI enzimi ile kesilerek fitoplazma hastalığının varlığının kesinleştirilmesinin ardından R16F2n/R2 dizileri, veri tabanı araştırması için NCBI'da Blast yapılmıştır. Veri tabanı araştırmasından alınan sonuçlara göre; Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.) ve Semizotu (*P. Oleracea* L.) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimi *Candidatus* Phytoplasma solani ile %99, Çukurova Fenerotu (*P angulata* L.) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimi *Candidatus* Phytoplasma asteris ile %99 benzerlik göstermiştir.

F2n/R2 dizisine dayalı olarak, Şanlıurfa'da biber yetişitirilen alanlardan toplanan yabancı ot örneklerinden fitoplazmaların 16SrDNA dizilimlerini içeren filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.8.). Filogenetik ağaç, örnekleri temsil eden 3 PCR ürünün 16SrRNA bölgesinin gen dizileri NCBI Genbank'taki *Ca.* Phytoplasma 16Sr grubu temsilcilerinin 42'siyle kıyaslanıp *neighbour-joining* kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 4. 8. Fitoplazma etmeni açısından pozitif olarak saptanan Semizotu, Tarla Sarmaşığı, Çukurova Fenerotu yabancı ot örnekleri ve 42 fitoplazma türünün 16SrRNA gen dizilemesine göre *neighbour-joining* metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

Yaptığımız bu çalışma ile Çukurova Fenerotu'nda *Ca.* Phytoplasma asteris (16SrI) ve Semizotu'nda *Ca.* Phytoplasma solani (16SrXII) için dünyada ilk kez rapor edilmiştir. Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis*)'nda tespit ettiğimiz 'stolbur' fitoplazma ise İtalya, Avusturya ve Kuzeydoğu İspanya'da yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

İtalya'da sararma, küçük yaprak ve bir noktada birden fazla sürgün oluşumu gibi simptomlar gösteren Tarla Sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*)'nda, "stolbur" (*Ca.* Phytoplasma solani) fitoplazması tespit edilmiştir (Marcone ve ark., 1997b; Martini ve ark., 2008).

Avusturya'da 2003-2008 yılları arasında *C. arvensis* ve asmada 'stolbur' fitoplazmasına ait bir grup olan *tuf*-tipi b (*tuf* tip II) bulunmuştur (Riedle-Bauer ve ark., 2006,2008; Tiefenbrunner ve ark., 2007).

Batlle ve ark. (2000), Kuzeydoğu İspanya'nın üç bölgesinde "stolbur" fitoplazmayı *C. arvensis*, *Lavandula officinalis*, *Polygonum Convolvulus* ve *Solanum nigrum*'da pozitif bulmuşlardır.

Çalışmamızda Tarla Sarmaşığı ve Semizotu'nda saptadığımız stolbur fitoplazmanın, Biber (*Capsicum annuum* L.*)* ve bir çok solaneceous türü bitkiyi etkileyebileceği belirtilmiştir (McCoy ve ark., 1989; Fos ve ark., 1992).

Çukurova Fenerotu'nda tespit ettiğimiz asteris grubu ile ilişkilendirilen fitoplazma, Küba'nın Holguín eyaletinde dolmalık biberde yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Arocha, 2007).

4.2.6. *İn silico* RFLP

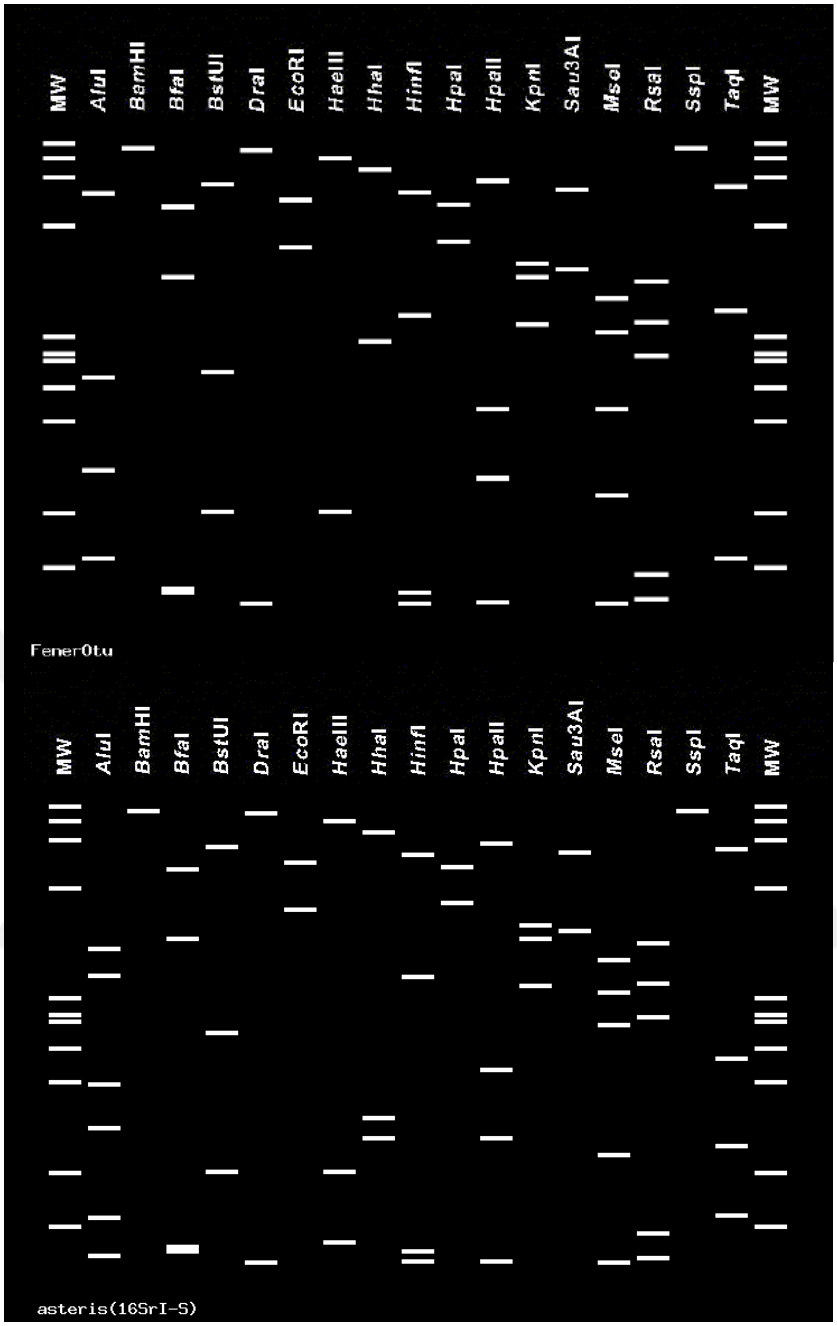
Çalışmada fitoplazma açısından pozitif olduğu saptanan ve F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Fenerotu (*P. angulata* L.), Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.) ve Semizotu (*P. oleracea*) örneklerinin dizileri 16Sr grubu/alt grubu sınıflandırması

ve *in silico* RFLP benzerlik katsayısı tespiti, *i*Phyclassifier yazılımı kullanılarak F2n/R2 dizilerinden gerçekleştirilmiştir (Zhao ve ark., 2009). Yabancı otlarda teşhis edilen fitoplazmaların RFLP profilleri *Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI, *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I ve *Taq*I enzimlerine göre kıyaslanmıştır.

F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Fenerotu (*P. angulata* L.) örneklerinin *i*Phyclassifier programı kullanılarak 16SrI-S alt grubunda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9.). Literatür araştırmalarına göre daha önce Fenerotu ile ilgili herhangi bir fitoplazma grup/altgrup tespiti yapılmadığından çalışmamız dünyada ilk olma niteliğindedir.

16SrI grubuna ait; A, B, C, D, E, F, I, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z olmak üzere 23 tane altgrup olduğu rapor edilmiştir (Bertaccini and Lee, 2018). Bu altgrup izolatları aynı enzimlerle kesilmelerine rağmen, enzim kesim profilleri bazen farklılık gösterebilmektedir.

Çalışmamızdaki Fenerotu ve 16SrI-S altgrubu izolatlarının *in silico* RFLP'de *Alu*I enzimi ile kesim profili farklılık göstermiştir (Şekil 4.9.). Bunun sebebinin F2n/R2 dizilerini, 5' A G↓ C T 3'/ 3' T C ↑ G A 5' hedef noktalarından kesen *Alu*I enziminin restrüksiyon kesim bölgesinde meydana gelmiş nokta mutasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

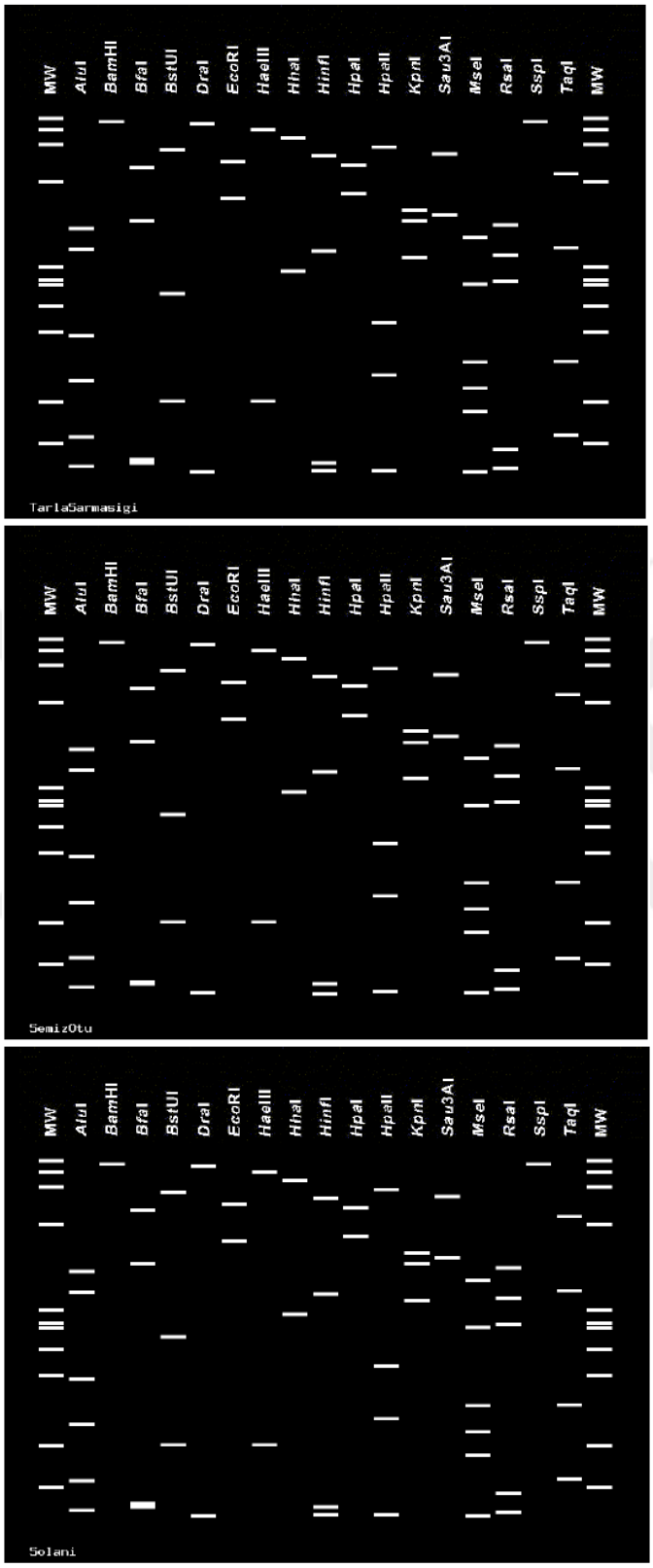


Şekil 4. 9. F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Fenerotu izolatı ve 16SrI-S alt grubunun kıyaslanmasıyla oluşturulan *in silico* RFLP profili

F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Tarla sarmaşığı (*C. arvensis* L.), Semizotu (*P. oleracae*) örneklerinin *i*Phyclassifier programı kullanılarak 16SrXII-A alt grubunda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10.).

Çalışmamız İtalya (Marcone ve ark., 1997b; Martini ve ark., 2008), Avustralya (Riedle-Bauer ve ark., 2006,2008; Tiefenbrunner ve ark., 2007). ve İspanya'da (Batlle ve ark., 2000) Tarla Sarmaşığı'nda "stolbur" (*Ca.* Phytoplasma solani) olarak bildirilen çalışmalarla paralellik göstermektedir.

İtalya'da kayısı bahçelerinde Semizotu'nda tespit edilen fitoplazma *Ca.* Phytoplasma asteris ile ilişkilendirilmiştir (Schneider ve ark., 1997). Fakat Şanlıurfa biber yetiştirilen alanlarda yürütülen bu çalışmada Semizotu'nda saptanan fitoplazma *Ca.* Phytoplasma solani ile ilişkili bulunmuştur.



Şekil 4. 10. F2n/R2 primerleriyle çoğaltılan Semizotu,Tarla Sarmaşığı izolatları ve 16SrXII grubunun kıyaslanması ile oluşturulan *in silico* RFLP profilleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Biber, ülkemizde olduğu gibi bütün dünyada da yaygın olarak ve çok fazla tüketilen bir sebze türüdür. Çeşitli amaçlarla kullanılan biberin, Şanlıurfa ilinde genellikle pul ve toz biber üretmek amacıyla geniş alanlarda tarımı yapıldığından bu il ülkemiz biber üretiminde önemli bir yere sahiptir. Nitekim biber yetiştiriciliğinde verimi sınırlayan çeşitli biyotik/abiyotik faktörler ve yabancı otlar biber bitkisine zarar vererek ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde biber yetiştirilen alanlarda sararma, küçük yaprak oluşumu, çiçek kısırlığı, çalılaşma ve bodurlaşma biçiminde simptomlar sergileyen fitoplazma enfeksiyonları tespit edilmiştir. Herhangi bir kimyasal mücadelesi bulunmayan fitoplazmalar kültür bitkilerinin yetiştiği alanlarda aşı, vektör böcekler ve yabancı otlar ile hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere taşınmaktadır. Birçok kültür bitkisinin gelişimine çeşitli yollarla engel olan, verimini ve ekonomik değerini düşüren yabacı otlar aynı zamanda önemli fitoplazma rezervuarlarıdır ve doğal alternatif konukçu olarak hizmet ederek fitoplazmaların yayılmasında önemli bir rol oynarlar.

Şanlıurfa ili biber üretim alanlarındaki fitoplazmaların alternatif yabancı ot konukçularını belirlemek amacıyla yürüttüğümüz bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

i. Haliliye ve Birecik ilçelerindeki biber yetiştirilen alanlardaki yabancı otlarda gözlenen en yaygın simptomlar tipik fitoplazma simptomları ile benzer olan sararma, küçük yaprak oluşumu, bodurluk ve çalılaşma olmuştur.

ii. Çalışmada adı geçen bölgelerden alınan yabancı ot örneklerinden nükleik asit izolasyonu, PCR-RFLP testi yapıldığında toplanan 82 örneğin 19'u fitoplazma açısından pozitif sonuç vermiştir. Semizotu,

Tarla Sarmaşığı, Çukurova Fenerotu ve Eşek Marulu'nda fitoplazma etmeni saptanırken; Horoz İbiği, Köpek Üzümü ve Domuz Pıtrağı'nda etmen saptanmamıştır.

iii. Toplanan tüm yabancı ot örneklerinin hastalık ile bulaşıklık oranı %23,17 olarak tespit edilmiştir.

iv. Ülkemizde Semizotu, Tarla Sarmaşığı, Çukurova Fenerotu ve Eşek Marulu'nda fitoplazma etmeninin teşhisi ilk kez bu çalışmayla rapor edilmiştir.

v. Dünyada Semizotu, Tarla Sarmaşığı ve Eşek Marulu'nda fitoplazma etmeni daha önce rapor edilirken; Çukurova Fenerotu'nda fitoplazma etmeninin tespiti daha önce rapor edilmemiştir. Çukurova Fenerotu'nda fitoplazma etmeni dünyada ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir.

vi. Fitoplazma açısından pozitif olarak saptanan yabancı ot örneklerinin sekans analizi yapıldığında, Tarla Sarmaşığı (*C. arvensis* L.) ve Semizotu (*P. oleracea*) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimleri *Ca.* Phytoplasma solani ile %99, Çukurova Fenerotu (*P. angulata* L.) örneğinden elde edilen nükleotid dizilimi *Candidatus* Phytoplasma asteris ile %99 benzer bulunmuştur.

vii. Semizotu'nu enfekteleyen fitoplazma etmeninin *Ca.* Phytoplasma solani ile ilişkilendirilmesi dünyada ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Elde edilen bu bilgiler Şanlıurfa ili biber yetiştirme alanlarındaki yabancı otların da fitoplazma etmeninin alternatif konukçusu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Şanlıurfa ili biber üretim alanlarında bulunan yabancı otların patojene ara konukçu olmasındaki rolü dikkate alınarak fitoplazmaların erken saptanması, fitoplazma hastalıklarının ekonomik açıdan önemli diğer kültür bitkilerine yayılmasının engellenmesinde önem

arz etmektedir. Böylelikle herhangi bir kimyasal mücadelesi bulunmayan fitoplazma hastalıklarının yönetiminde alternatif konukçuların belirlenerek fitoplazmanın olası risklerini azaltacak kontrol stratejileri geliştirilmelidir.

Bu çalışma biber ve diğer kültür bitkilerinde yabancı otlarla mücadelenin ürün verimi, hastalık kontrolü açısından önemini ön plana çıkarmıştır. Çalışmamızdan aldığımız bilgiler ışığında; özellikle biber arazisinde yabancı otlar ile erken dönemde mücadele ederek, fitoplazma hastalığının ara konukçu kaynaklı olarak yayılmasının kontrol altına alınabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

AGRIOS, G.N., 1997. Control of Plant Diseases. In: Plant Pathology, 4th Edition, Academic Press, San Diego, 200-216.

AHRENS, U. and SEEMULLER, E., 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.

AHRENS, U. and SEEMULLER, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. *Phytopathology*, 82(8): 828-832.

ALHUDAİB. K., AROCHA, Y., WİLSON, M., JONES, P., 2009. Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. *Crop Protection*, 28: 13–18.

AROCHA, Y., HORTA, D., PINOL, B., PALENZUELA, I., PICORNELL, S., ALMEIDA, R. and JONES, P., 2005. First report of Phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease in Cuba. Plant Pathol, 54: 233.

AROCHA, Y., PIÑOL, B., PICORNELL, R., ALMEIDA and P. JONES., 2007. Broad bean and sweet pepper: two new hosts associated with *Candidatus* Phytoplasma asteris (16SrI phytoplasma group) in Cuba. Plant Pathol, 56: 345.

AROCHA, Y., PLATA, G., FRANCO, J., MAIN, G., VERAMENDI, S., LAZCANO, F., CRESPO, J. L., LINO, V., CALDERÓN, C., LLERENA, R., ANDREW, R., ANTEZANA, O., GUTIÉRREZ, A., COCA, M., and BOA, E., 2010. First report of a 16SrIII phytoplasma (X-disease group) affecting bell pepper, strawberry (frutilla), Schinus molle and Arracacia xanthorrhiza in Cochabamba, Bolivia. Plant Pathol, 59: 395.

AROCHA-ROSETE, Y. and JONES P., 2010. Phytoplasma diseases of the Gramineae. In: Phyllis, GW., Jones, P., (eds) Phytoplasma, genomes, plant host and vectors. London, UK, 170-187.

AVINENT, L. and LLACER, G., 1995. Stolbur detection in Spain by polymerase chain reaction (PCR). Plagas, 21: 417–423.

BABAIE, G., KHATABI, B., BAYAT, H., RASTGOU, M., HOSSEINI, A., SALEKDEH, G. H., 2007. Detection and characterization of phytoplasma infecting of ornamental and weed plants in Iran. Journal of Phytopathology, 155(6): 368–372.

BAI, X., ZHANG, J., HOLFORD, I. R. and HOGENHOUT, S. A., 2004. Comparative genomic identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. FEMS Microbiol. Lett, 235: 249-258.

BATLLE, A., MARTÍNEZ, MA., LAVİÑA, A., 2000. Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 811–816.

BERGES, R., ROTT, M., SEMULLER, E. 2000. Range of phytoplasmas concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. Phytopathology, 90: 1145-1152.

BERTACCINI, A., and LEE, I., 2018. Phytoplasmas: An Update 'Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – I. Springer, Singapore, p. 1-31.

BERTACCINI, A., BELLARDI. M. G., VIBIO, M., 1996. Virus diseases of ornamental shrubs. X. Euphorbia pulcherrima Willd. infected by viruses and phytoplasmas. Phytopathologia Mediterranea, 35: 129-132.

BERTACCINI, A., DUDUK, B., PALTRINIERI, S. and CONTALDO, N., 2014. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. American Journal of Plant Sciences, 5: 1763-1788.

BERTACCINI, A., DUDUK, B., PALTRINIERI, S., CONTALDO, N., 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. American Journal of Plant Science, 5: 1763-1788.

BERTACCINI, A., FRANOVA, J., BOTTI, S., TABANELLI, D., 2005. Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciations in the Czech Republic. Fems Microbiology Letters, 249: 79-85.

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.

BLANCHE, K. R., TRAN-NGUYEN, L. T. T. and GIBB, K. S., 2003. Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northen Australia. Plant Pathol, 52: 505-512.

BOA, E., AROCHA, Y., HARLING, R., TOBING, C., KELLY, P., REEDER, R., 2010. First report of group 16SrI, '*Candidatus* Phytoplasma asteris' associated with Mimosa pudica yellows in Indonesia. Plant Pathology, 59: 397.

BOSCO, D., MINUCCI, C., BOCCARDO, G., and CONTI, M., 1997. Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. Entomol. Exp. Appl, 83: 219–224

BOVE, J. M., 1984. Wall-less prokaryotes of plants. Ann. Rev. Phytopathol, 22: 361396.

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

CHAUBE, S., MALL, S., DUBEY, D. K., RAO, G. P., 2015. Phyllanthus niruri L.: a new host of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' in India. Phytopathogenic Mollicutes, 5(1-Supplement): 87–88.

CHEN, T. C., LEE, C. S., CHEN, M. J., 1972. Mycoplasmalike organisms in Cynodon dactylon and Brachiaria distachya affected by white leaf disease. Report of Taiwan Sugar Experiment Station, 56: 49–55.

CHEN, T. C., LEE, C. S., CHEN, M. J., 1972. Mycoplasmalike organisms in Cynodon dactylon and Brachiaria distachya affected by white leaf disease. Report of Taiwan Sugar Experiment Station, 56: 49–55.

CHEN, X. F., LIANG, Y. C., CHEN, N., SU, W. M., XIAO, H., WANG X, ZHU, X. P., 2013. Molecular identification of a phytoplasma associated with Sophora root yellows. Forest Pathology, 43: 415–421.

CHOI, Y. M., LEE, S. H., LEE, E. K. and KIM, J. S., 1985. An investigation of underscribed witches'broom symptom caused by MLO on *Bupleurum falcatum, Cnidium officinale* and *Plantago asiatica* in Korea. Korean J. Mycol, 13 (1): 49-51.

CHOUEIRI, E., SALAR, P., JREIJIRI, F., EL ZAMMAR, S., MASSAAD, R., ABDUL-NOUR, H., BOVÉ, J. M., DANET J. L. 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.

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.

COUSIN, M. T., DAFALLA, G., DEMAZEAU, E., THEVEU, E. AND GROSCLAUDE, J., 1989. In situ detection of MLOs for Solanaceae stolbur and faba bean phyllody by indirect immunofluorescence. Journal of Phytopathology, 124: 71–79.

COUSIN, M. T., MAILLET, P. L., GOURRET, J. P., GRISON, C. and STARON, T., 1968. Pre ´sence de particules de type mycoplasme dans les plantes atteintes de ‘‘jaunisse europe ´enne’’ Le stolbur de la tomate, l’aster yellow du glaı ¨eul, la phyllodie du tre `fle. Etudes cytologiques et ultrastructurales, Premiers essais de lutte chimique. Compte rendu de l’Acade ´mie des Sciences se ´rie D Paris, 54: 887–895.

CREDİ, R., TERLİZZİ, F., MİLANESİ, L., BONDAVALLİ, R., CAVALLİNİ, G., MONTERMİNİ, A., DRADİ, D., 2006. Wild host plants of “stolbur” phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine “bois noir” occurrence in Emilia-Romagna, Italy. 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 182–183.

DABEK, A. J., 1983. Leaf hopper transmission of Rhynchosia little leaf, a disease associated with MLO in Jamaica. Phytopathol Z, 107 (4): 345-361.

DAVIS, R.E., E.L. DALLY, D.E. GUNDERSEN, I.M. LEE and N. HABILI, 1997. “*Candidatus* Phytoplasma australiense”, a new phytoplasma taxon associated with Australian Grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47: 262–269.

DELIC, D., CONTALDO, N., LOLIC, B., MORAVCEVIC, D., BERTACCINI, A., 2016. Fırst Report Of ‘*Candıdatus* Phytoplasma solani’ In Pepper And Celery In Bosnia and Herzegovina.

ESMAILZADEH HOSSEINI, S. A., SALEHI, M., KHANCHEZAR, A., SHAMSZADEH, M., 2011a. The first report of a phytoplasma associated with pot marigold phyllody in Iran. Bulletin of Insectology, 64(Supplement): 109-110.

ESMAILZADEH HOSSEINI, S. A., SALEHI, M., MIRZAIE, A., 2011b. Alternate hosts of alfalfa witches’ broom phytoplasma and winter hosts of its vector Orosius albicinctus in Yazd-Iran. Bulletin of Insectology, 64(Supplement): 247-248.

ESMAİLZADEH HOSSEİNİ, S.A., SALEHİ, M., MİRCHENARİ, S.M., CONTALDO, N., PALTRİNİERİ, S., BERTACCİNİ, A., 2016a. Occurrence of a ‘*Candidatus* Phytoplasma omanense’-related strain in bindweed witches’ broom disease in Iran. *Phytopathogenic Mollicutes*, 6: 87–92.

EŞİYOK, D. ve BOZOKALFA, M.K., 2006. http://www.dunyagida.com.tr/haber/biberin-anavatani-ve-yayilisi/2045

FIALOVÁ, R., VÁLOVÁ, P., BALAKISHIYEVA, G., DANET, J. L., ŠAFÁROVÁ, D., FOISSAC, X., NAVRÁTIL, M., 2009. Genetic variability of “stolbur” phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia. Journal of Plant Pathology, 91: 411–416.

FOS, A., DANET, J. L., ZREIK, L., GARNIER, M., and 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 Disease, 76: 1092–1096.

GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, Adana-Turkey, 89-99.

GUNDERSEN, D. E. and LEE, I. M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia Mediterranea, 35: 144-151.

GUO, C., LU, M., ZHAO, Z., HU, J., NIE, W., SHI, L. and GUO, J., 2017. molecular detectıon and characterızatıon of a phytoplasma from xıanlajıao chılı pepper ın shaanxı provınce, chına. pak, j. bot, 49(3): 1097-1104.

GUTHRIE, J. N., WHITE, D. T., WALSH, K. B., SCOTT, P. T.. 1998. Epidemiology of phytoplasma associated papaya diseases in Queensland, Australia. Plant Disease, 82: 1107-1111.

HARRISON, N. A. AND OROPEZA, C., 2008. Coconut Lethal Yellowing, pp. 219-248. In: Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas (eds. N. A. Harrison, G. P. Rao & C. Marcone). Studium Press LLC, U.S.A.

HEINTZ, W., 1986. Cuscuta odorata an effective vector for mycoplasma-like organisms (MLO). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 38: 138-141.

HEMMATI, C., NIKOOEI, M., BAGHERI, A., FAGHIHI, M. M., 2017. First report of a '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium'-related strain associated with Bidens alba phyllody in Iran. New Disease Reports, 35: 8.

HOBBS, H.A., REDDY, D. V. R., REDDY, A. S., 1987. Detection of a mycoplasma-lke organism in peanut plants with witches' broom using indirect enzyme-linked immunosorben assay (ELISA). Plant Pathology, 36: 164-167.

HOSHI, A., ISHII, Y., KAKIZAWA, S., OSHIMA, K., NAMBA, S., 2007. Host-parasite interaction of hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. Phytopathology, 90: 1145-1152.

ISHIIE, T., DOI, Y., YORA, K., ASUYAMA, H., 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom developement of mulberry dwarf disease. Annals of Phytopathological Society of Japan, 33: 267-275.

JOOMUN, N., DOOKUN-SUAMTALLY, A., SUAMTALLY, S. and GANESHAN, S., 2007. Sugarcane leaf yellows phytoplasmas in Mauritius: Molecular characterization, transmission and alternative hosts. Proc. Int. Sugarcane Technol, 26: 1005–1013.

KELLY, P.L., AROCHA, Y., DİDER, S.Z., 2009. First report of a 16SrI, '*Candidatus* Phytoplasma asteris' isolate affecting eggplant and *Mikania* sp. in Bangladesh. *Plant Pathology*, 58: 789.

KHAN, M. S. and RAJ, S. K., 2006. First report of molecular detection of an Aster yellows phytoplasma ('*Candidatus* phytoplasma asteris') isolate infecting chili (*Capsicum annuum*) in India. Plant Pathol, 55: 822.

LANGER, M., MAİXNER, M., 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the "stolbur" group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis,* 43: 191–199

LEBSKY, V. and POGHOSYAN, A., 2007. Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview. Bull Insect, 60: 131-132.

LEBSKY, V., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, J., ARGUELLO-ASTORGA, G., CARDENAS-CONEJO, Y. and POGHOSYAN, A., 2011. Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. Bull Insect, 64: S55-S56.

LEE, I. M., DAVIS, R. E., GUNDERSEN, D. E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology, 54: 221-255.

LEE, I. M., GUNDERSEN, D. E., BERTACCINI, A., 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. Phytopathology, 88: 1359-1366.

LEE, I.-M., GUNDERSEN, D. E., HAMMOND, R. W., DAVIS, R. E., 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed- MLO infections in a single host plant. Phytopathology 84: 559– 566.

LEE, I-M, BERTACCİNİ, A., VİBİO, M. and GUNDERSEN, D.E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology, 85, 728-735.

LI, T. T., SUN, X.C., WU, G. X., 2012. First report of a group 16SrI phytoplasma infecting epazote in China. Journal of Plant Pathology, 94: S4.89.

LIVINGSTON, S., AL-AZRI, M. O., AL-SAADY, N. A., AL-SUBHI, A. M. and KHAN, A. J., 2006. First report of 16Sr DNA II group phytoplasma on Polygala mascatense, a weed in Oman. Plant Dis, 90(2): 248.

MALL, S., RAO, G. P. and MARCONE, C., 2010. Phytoplasma Dıseases Of Weeds: Detectıon, Taxonomy And Dıversıt. Nova Science Publishers, Inc, 87-108

MARCONE, C. and RAO, G. P., 2008. '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis': The causal agent of Bermuda Grass White Leaf Disease, 353-364. In: Characterization, Diagnosis and Managemen of Phytoplasmas (eds: Harrison, N. A., Rao, G. P., and C. Marcone, C.,). Studium Press LLC, U.S.A.

MARCONE, C., and RAGOZZINO, A., 1995. Tomato big bud disease in southern Italy and characterization of its causal agent by RFLP analysis. Petria, 5: 195–205.

MARCONE, C., NEIMARK, H., RAGOZZINO, A., LAUER, U. AND SEEMULLER, E., 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. Phytopathology, 89: 805-810.

MARCONE, C., RAGOZZINO, A., SEEMULLER, E., 1997. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and foliage crops in southern Italy. Journal of Plant Pathology, 79: 211-217.

MARCONE, M., RAGOZZINO, A., SEEMULLER, E., 1997b. Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. Plant Pathology, 46: 530–537.

MARTİNİ, M., CARRARO, L., MARCONE, C., MAİXNER, M., DELİC, D., MYRTA, A., 2008. Caratterizzazione molecolare di fitoplasmi associati a giallume in convolvolo. *Petria*, 18: 341–344.

MARWITZ, R., PETZOLD, H. and KUNZE, L., 1974. Investigation on the transfer of possible causal agent of Apple Proliferation to a herbaceaus host. Phytopathologische Zeitschrift, 81: 85-91.

MARZACHI, C., MILNE, R.G. and BOSCO, D. 2004. Phytoplasma–plant–vector relationships. In: Pandalai, S.G. and Gayathri, A. (eds) Recent Research Development in Plant Pathology, Vol. 3. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, 211–241.

MCCOY, R. E., CAUDWELL, A., CHANG, C. J., CHEN, T. A., CHİKOSWSKİ, L. N., COUSİN, M. T., DALE, J. L., DE LEEUW, G. T., GOLİNO, D., HACKETT, K. J., KİRKPATRİCK, B. C., MARWİTZ, R., PETZOLD, H., SİNHA, R., SUGİURA, M., WHİTCOMB, 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, Acholeplasmas and Mycoplasmas of Plants and Arthropods, Academic Press, New York. USA. pp. 545-640.

MCLEOD, M. J., GUTTMAN, S. I., ESHBAUGH, W. H. and RAYLE, R. E., 1983. An Electrophoretic Study of the Evolution in Capsicum (Solanaceae). Evolution, 37: 562-574.

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

MUROLO, S., MARCONE, C., PROTA, V., GARAU, R., FOISSAC X. and ROMANAZZI, G., 2010. Genetic variability of the stolbur phytoplasma vmp1 gene in grapevines, bindweeds and vegetables. J. Appl. Microbiol, 109: 2049-2059.

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.

OKSAL, H., APAK, F. K., OKSAL, E., TURSUN, N., SIPAHIOĞLU, H. M., 2017. Detection and Molecular Characterization of two '*Candidatus* Phytoplasma Trifolii' Isolates Infecting Peppers at the Same Ecological Niche. INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BİOLOGY, ISSN Online, 1814–9596.

OSHIMA, K., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., JUNG, H. Y., WEI, W., SUZUKI, S., ARASHIDA, R., NAKATA, D., MIYATA, S., UGAKI, M. and NAMBAI, S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nature Genet, 36: 27-29.

PALERMO, S., ELEKES, M., BOTTI, S., EMBER, I., ALMA, A., OROSZ, A., BERTACCINI, A., KÖLBER, M., 2004. Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. Vitis, 43: 201–203.

PASQUİNİ, G., FERRETTİ, L., BARBA, M., 2007. Diffusione del legnonero dell vite nel Lazio e caratterizzazione molecolare dell agente eziologico. Inf Fitopatol, 4: 42–47.

PLOAIE, P. G.,1981. Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe, 61-104. In Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology. MARAMOROSCH, K.,and HARRİS, K. F., eds. Academic Press, New York.

PRACROS, P., RENAUDIN, J., EVEILLARD, S., MOURAS, A., 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: 62–8.

RANČIĆ, D., PALTRINIERI, S., TOŠEVSKI, I., PETANOVIĆ, R., STEVANOVIĆ, B., BERTACCINI, A., 2005. First report of multiple inflorescence disease of Cirsium arvense and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. Plant Pathology, 54: 561–561.

RANDALL, J. J., BOSLAND, P. W. and HANSON, S. F., 2009. Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of chile peppers. Plant Dis, 93: 968.

REDDY, A. V. and JEYARAJAN, R., 1990. Rice yellow dwarf- host range studies and its effect on growth of weed host. Indian J. Mycol. and Plant Pathology, 20 (1): 26 – 29.

REEDER, R. and AROCHA, Y., 2008. '*Candidatus* Phytoplasma asteris' identified in Senecio jacobaea in the United Kingdom. Plant Pathology : http:// www.bspp.org.uk/ndr / jan 2008/2007 - 91. asp.

RİEDLE-BAUER, M., SÁRA, A., REGNER,. F., 2008. Transmission of a "stolbur" phytoplasma by the Agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology*, 156: 687–690.

RİEDLE-BAUER, M., TİEFENBRUNNER, W., OTREBA, J., HANAK, K., SCHİLDBERGER, B., REGNER, F.,, 2006. Epidemiological observations on "bois noir" in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg*, **56**: 177–181.

SALEHI, M., IZADPANAH, K., NEJAT, N., 2006. A new phytoplasma infecting lettuce in Iran. Plant Disease, 90: 247.

SANTOS-CERVANTES, M. E., CHÁVEZ-MEDINA, J. A., MÉNDEZ-LOZANO, J. and LEYVA-LÓPEZ, 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: 1007-1011.

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

SCHNEIDER, B., MARCONE, C., KAMPMANN, M., RAGOZZINO, A., LEDERER, W., COUSİN, M. T., SEEMULLER, E., 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. European Journal of Plant Pathology, 103: 675–686.

SEEMULLER, E., 1990. Apple Proliferation. Compendium of Apple and Pear Diseases, AmericanPhytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA ,6768.

SEEMULLER, E., MARCONE, C., LAUERI U., RAGOZZINO, A., GOSCHL, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. Plant Pathology, 80: 3-26.

SEEMULLER, E., SCHNEIDER, B., MAURER, R., AHRENS, U., DAIRE, X., KISON, H., LORENZ, K.H., FIRRAO, G., AVINENT, L. and SEARS, B.B., 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 440-446.

SERTKAYA, G., MARTINI, M., MUSETTI, R. and OSLER, R., 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. Bull Insect, 60: 141-142.

SHIOMI, T. and SUGIURA, M., 1983. Water dropwort yellows and chrysanthemum witches' broom occurred in Ishikawa Prefecture (in Japanese with English summary). Ann Phytopath Soc Japan, 49: 367–370.

SHUMBHRATA, R. M., 2004. Mulicutes and Plant Diseases. New Delhi. Discovery Publishing House.

SINGH, N., MALL, S., UPADHAYA, P.P., RAO, G.P., 2013. *Ranunculus sceleratus*: a new host of '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' in India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 3: 82–86.

THEREZA, S., BAROSS, L., 2002. Erigeron witches' broom in Brazil represents new subgroup VII. The Ash Acta agriculturae Slovenica, 107 - 1, marec 2016 136 yellows phytoplasma group. Phytopathology, 86: 1142-1148.

TRAN-NGUYEN, L. T. T., PERSLEY, D. M. and. GIBB, K. S., 2003. First report of phytoplasma disease in capsicum, celery and chicory in Queensland, Australia. Aust. Plant Pathol, 32: 559-560.

TRAN-NGUYEN, L., BLANCHE, K. R., EGAN, B. and GIBB, K. S., 2000. Diversity of phytoplasmas in northern Australian sugar cane and other grasses. Plant Pathol, 49: 666-679.

TUIK, 2019. https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr

VALI SICHANI, F., BAHAR, M., ZIRAK, L., 2014. Characterization of phytoplasma related to aster yellows group infecting annual plants in Iran, based on the studies of 16S rRNA and rp genes. Journal of Plant Protection Research, 54(1): 1-8.

VALIŪNAS, D., URBANAVIČIENĖ, L., JOMANTIENĖ, R., DAVIS, R. E., 2007. Molecular detection, classification and phylogenetic analysis of subgroup 16SrI-C phytoplasmas detected in diseased Poa and Festuca in Lithuania. Biologija, 53: 36–39.

VILLALOBOS, W., MOREIRA, L., RIVERA, C. and LEE, I. M., 2009. First report of new phytoplasma diseases associated with soybean, sweet pepper, and passion fruit in costa rica. Plant Dis, 93: 201.

WEISBURG, W. G., TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H.,YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T. G., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. J Bacteriol, 171: 6455–6467.

WELLIVER, R., 1999. Diseases Caused by Phytoplasmas. Regulatory Horticlture vol.25, No.1, Plant Pathology Circular No. 82, Pennsylvania Dept. of Agriculture, Bureau of Plant Industry, 17–22.

WU, Y., HAO, X., LI, Z., GU, P., AN, F., XIANG, J., WANG, H., LUO, Z., LIU, J., XIANG, Y., 2010. Identification of the phytoplasma associated with wheat blue dwarf disease in China. Plant Disease, 94: 977–985.

YILMAZ, S., ÇAĞLAR, B. K., DJELOUAH, K., 2019. Molecular characterization of phytoplasma diseases of pepper in Turkey. *J Phytopathol*, 167:479–483. https ://doi.org/10.1111/jph.12820.

ZHAO, Y., WEI, W., LEE, I.M., SHAO, J., SUO, X., DAVİS, R.E., 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 2582–2593. DOI: 10.1099/ijs.0.010249-0

ZHU, S. F., ZHAO, B. Q., HU, J. B., ZHANG, X. L. and ZHANG, C.L., 1998. Research progress and quarantine importance of phytoplasma. Plant Quarantine, 12: 237-240.

ZIBADOOST, S., and RASTGOU, M., 2016. Molecular identification of phytoplasmas associated with some weeds in West Azerbaijan province, Iran. Acta Agriculturae Slovenica, 107: 129–136.

ZIMMERMAN-GRİES, S. and KLEIN, M., 1978. A tomato big budlike disease of tomatoes in Israel and its association with mycoplasma like organisms. Plant Disease Reporter, 62: 590–5.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** Nesibe KILIÇ
Uyruğu **:** T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi **:** 29/09/1995-ŞANLIURFA
Telefon **:** 05458534965
e-mail **:** nsbbklcc@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe/İl	Bitirme Yılı
Lise :	Akabe Toki Lisesi	Eyyübiye/ŞANLIURFA	2012
Üniversite :	Harran Ünv, Ziraat Fakültesi	Haliliye/ŞANLIURFA	2017

UZMANLIK ALANI: BİTKİ KORUMA/FİTOPATOLOJİ

YABANCI DİLLER: İngilizce

YAYINLAR:

KILIÇ, N., GÜLDÜR, M.E., 2019. A New Host for *Candidatus* Phytoplasma Solani in Sanliurfa Province Pepper Growing Areas: Purslane (*Portulaca oleracea*)**,** 1st Internatıonal Gobeklıtepe Agrıculture Congress, 25-27 November 2019.