T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ADIYAMAN VE ŞANLIURFA İLLERİNDE BAĞLARDA ENFEKSİYONLARA SEBEP OLAN FİTOPLAZMALARIN SAPTANMASI, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BİTKİ SAVUNMA TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ERAY ŞİMŞEK

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2021

Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR danışmanlığında, Eray ŞİMŞEK'in hazırladığı **"Adıyaman ve Şanlıurfa illerinde bağlarda enfeksiyonlara sebep olan fitoplazmaların saptanması, moleküler karakterizasyonu ve bitki savunma tepkilerinin araştırılması"** konulu bu çalışma 17/02/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR ……..

Üye : Prof.Dr. Emine ÇIKMAN ……..

Üye : Prof. Dr. İ. Özer ELİBÜYÜK ……..

Üye : Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN ……..

Üye : Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR ……..

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

Doç.Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAP Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 16189

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 vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
1.1. Fitoplazmalar 2
1.2. Bağ Bitkileri ve Fitoplazmalar 7
1.2.1. Asmalarda Fitoplazma Kaynaklı Hastalık Simptomları 13
1.2.2. Bitki-Patojen Etkileşimleri 14
1.3. Çoklu Lokus Dizilim Analizleri 17
1.4. Çalışmanın Amacı 20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
2.1. Türkiye'de Çeşitli Bitkilerde Fitoplazmalar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar 21
2.2. Bağ Bitkisi ile İlişkili Fitoplazmalar 25
2.3. Çoklu Lokus Dizi Analizleri ile İlgili Çalışmalar 30
2.4. Fitoplazma-Konukçu Etkileşimleri Üzerine Yürütülmüş Çalışmalar 33
3. MATERYAL ve YÖNTEM 37
3.1. Materyaller 38
3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel materyaller 38
3.1.1.1. DAS-ELISA Testlerinde Kullanılan Materyaller 40
3.1.2. Çelik köklendirme materyalleri 40
3.1.3. Böcek toplanmasında kullanılan materyaller 40
3.1.5. Nested-PCR ve RFLP Çalışmalarında Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar 41
3.1.6. Real-Time PCR analizlerinde kullanılan materyaller 43
3.1.7. Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Program ve Yazılımlar 43
3.2. Yöntem 44
3.2.1. Örneklerin Toplanması 44
3.2.1.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması 44
3.2.1.2. BöceklerinToplanması 45
3.2.1.3. Çeliklerin Toplanması ve Köklendirilmesi 45
3.2.1.4. DAS-ELISA Testleri 46
3.2.2. Patojenin Küsküt köprüleri vasıtasıyla *Catharanthus roseus* L. Bitkilerine Taşınması 47
3.2.3. Total DNA İzolasyonları 48
3.3.3. PCR/Nested PCR analizlerinde kullanılan metodlar ve PCR koşulları 50
3.3.3.1. PCR bileşenlerinin optimum konsantrasyonlarının ayarlanması 52
3.3.4. RFLP analizlerinde kullanılan metodlar 55
3.3.5. DNA Dizileme ve Filogenetik Analizlerde Kullanılan Metodlar 56
3.3.6. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Metodlar 56
3.3.6.1. Yapraklardaki toplam protein miktarlarının belirlenmesi 57
3.3.6.2. Antioksidan enzim analizleri 58
3.3.6.3. Yapraklardaki prolin miktarlarının belirlenmesi 58
3.3.6.4. Klorofil içeriklerinin belirlenmesi 59
3.3.6.5. Lipid Peroksidasyon Analizleri (MDA) 60
3.3.6.6. H_2O_2 analizleri 60
3.3.6.7. Toplam Fenolik Analizleri 61
3.3.6.8. Lignin ve Kalloz Birikiminin Belirlenmesi 61
3.3.7. İstatistiksel Analizler 62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 63
4.1. Arazi Çalışmaları ve Simptomatolojik Bulgular 63
4.1.1. Asmalarda Simptomatolojik Bulgular 64
4.1.2. Antepfıstığı Ağaçlarındaki Simptomatolojik Bulgular 68
4.1.3. Çeşitli Yabancıotlarda Simptomatolojik Bulgular 71

4.1.3. Toplanan Böcekler ile ilgili Bulgular 75
4.2. Fitoplazmaların tespiti ve Tanılanması ile İlgili Bulgular 78
4.3. '*Ca*.P. solani' nin *Tuf, VMP*1 ve *SecY* Gen karakterizasyonu ile ilgili Bulgular 81
4.4. Fitoplazma İzolatlarının Filogenetik Analizleri 87
4.5. Fitoplazmaların Küsküt ile Taşınması ile ilgili Bulgular 91
4.6. Asmada Bitki Savunma Tepkileri ile ilgili Bulgular 94
4.6.1. Asmada '*Ca*.P. solani' ve Oksidatif Stres ilişkisi 96
4.6.2. '*Ca*.P. solani' enfeksiyonunun asma yapraklarındaki total protein miktarına etkisi 99
4.6.3. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraklardaki prolin miktarına etkileri 100
4.6.4. Fitoplazmanın yaprak klorofil içeriklerine etkisi 101
4.6.5. Fitoplazma enfeksiyonunun malondialdehit (MDA) üzerine etkileri 102
4.6.6. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraktaki H_2O_2 içeriğine etkisi 103
4.6.7. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraktaki toplam fenolik maddelere etkisi 103
4.6.8. Fitoplazma enfeksiyonunun yaprakta lignin ve kalloz birikimine etkisi 105
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 107
KAYNAKLAR 111
ÖZGEÇMİŞ 133
EKLER 134

ÖZET

Doktora Tezi

ADIYAMAN VE ŞANLIURFA İLLERİNDE BAĞLARDA ENFEKSİYONLARA SEBEP OLAN FİTOPLAZMALARIN SAPTANMASI, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BİTKİ SAVUNMA TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Eray ŞİMŞEK

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Yıl: 2021, Sayfa: 139

Tarımsal üretimi neredeyse tehdit edecek seviyelere ulaşan fitoplazma hastalıklarının tahribatı yıldan yıla artmaktadır. Bu patojenlerin kültüre alınamamasından dolayı mücadele olanakları oldukça sınırlı kalmıştır. Bu gibi bitki hastalıkları ile mücadele edebilmenin ön koşulu, patojenin doğru ve detaylı bir biçimde tanılanması ve bitkilerde oluşturdukları ilk tepkilerin araştırılmasıdır. Bu çalışma ile son zamanlarda özellikle Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde asmalarda ve antepfıstığı üretim alanlarında artış gösteren sararma ve kurumaların görüldüğü bitkiler fitoplazmalar açısından testlenmiş, simptomatolojik bulguların bir kısmı fitoplazmalar ile ilişkilendirilmiştir. Asmalarda 16SrXII ve 16SrI grubu fitoplazmaların varlığı ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Fitoplazma-pozitif olan üzüm bağlarında bulunan antepfıstığı ağaçlarından da fitoplazma tespit edilmiştir. Saptanan fitoplazmaların 16SrDNA korunmuş gen bölgesi ve *VMP1*, *Tuf* ve *SecY* gibi protein kodlayan genler bakımından birbirileri ile %100 dizi benzerliği gösterdikleri Nested-PCR/RFLP, DNA dizileme, filogenetik evrimsel ilişkilerin analizi gibi yöntemler ile ortaya konulmuştur. Ayrıca etmen için inokulüm kaynağı olabilecek tarla sarmaşığı (*Convolvulus* spp.), sürünücü horoz ibiği (*Amaranthus blitoides*) ve çediotu (*Prosopis farcta*) örneklerinden de 16SrXII-A grubu fitoplazmalar belirlenmiştir. Bois noir fitoplazma hastalığının yabancıot konukçusu olarak bilinen *Convolvulus* spp. bitkilerine ilave olarak *Amaranthus blitoides* ve *Prosopis farcta*'da 16SrXII-A grubu fitoplazmaların varlığı ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. 16SrXII-A grubu fitoplazmaların *VMP1* gen dizileri filogeni yöntemleri ile araştırılmış ve GenBankasında kayıtlı Gürcistan'dan rapor edilen fitoplazmalar ile büyük benzerlikler gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca 16SrXII-A grubu fitoplazmaların Hönüsü isimli yerel bir asma çeşidindeki çeşitli savunma tepkileri araştırılmıştır. '*Ca*.P.solani' ile enfekteli bitkilerde katalaz, peroksidaz, prolin, MDA, H_2O_2 içeriği, toplam fenolikler, lignin ve kalloz birikimi artış gösterirken, toplam protein ve klorofil miktarında önemli düzeyde azalmalar tespit edilmiştir ($p<0.05$).

ANAHTAR KELİMELER: Fitoplazma, *Vitis vinifera*, *Pistacia vera*, *Convolvulus* spp., *Amaranthus* spp., *Prosopis farcta*, bitki tepkisi

ABSTRACT

Ph.D Thesis

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PHYTOPLASMAS CAUSING INFECTIONS IN GRAPEVINE IN ADIYAMAN AND ŞANLIURFA AND INVESTIGATION OF PLANT DEFENSE RESPONSE

Eray ŞİMŞEK

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet E. GÜLDÜR
Year: 2021 , Page: 139

The destruction of phytoplasma diseases, which almost threaten agricultural production, is increasing day by day. Due to the fact that these pathogens could not be cultured, their management possibilities were rather limited. The prerequisite for control of such plant diseases is the accurate and detailed identification of the pathogen and the investigation of the initial reactions it produces in plants. With this study, it was ensured that the yellowing and scorching symptoms, which increased in the grapevine and pistachio production areas in the provinces of Şanlıurfa and Adıyaman, were tested for phytoplasmas, and some of the symptomatological findings were associated with phytoplasmas. The presence of 16SrXII and 16SrI group phytoplasmas in grapevines was first demonstrated with this study. The presence of phytoplasma has also been detected from pistachio trees grown in phytoplasma-positive local vineyards. The presence of phytoplasmas have been proved by methods such as Nested-PCR/ RFLP, DNA sequencing, analysis of phylogenetic evolutionary relationships in terms of 16SrDNA conserved gene region and protein encoding genes such as *VMP1*, *Tuf* and *SecY*. In addition, 16SrXII-A group phytoplasmas were obtained from *Convolvulus* spp., *Amaranthus blitoides* and *Prosopis farcta* plants, which may be the source of inoculum for the agent. While *Convolvulus* spp. plants are a well known host for Bois noir disease in the world literature, the presence of 16SrXII-A group phytoplasmas in *Amaranthus blitoides* and *Prosopis farcta* plants was first revealed with this study. VMP1 gene sequences of 16SrXII-A group phytoplasmas were investigated by phylogeny methods and it was determined that they showed great similarities with the phytoplasmas previously registered in GenBank from Georgia. In addition, it was investigated to what extent 16SrXII-A group phytoplasmas affect various defense responses in a local grape variety named Hönüsü. Catalase, peroxidase, proline, MDA, H_2O_2 content, total phenolics, lignin and callose accumulation increased in plants infected with *'Ca*.P.solani', while significant decreases were found in the total amount of protein and chlorophyll ($p < 0.05$).

KEYWORDS : Phytoplasma, *Vitis vinifera*, *Pistacia vera*, *Convolvulus* spp., *Amaranthus* spp., *Prosopis farcta*, plant response

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde öncelikle geniş bilgi ve tecrübe birikimi ile beni en başından beri yetiştiren danışmanım Prof.Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR'e sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Biyokimyasal analizlerin yürütülmesinde laboratuvar imkanlarını bana sunduğu için Doç.Dr. Murat DİKİLİTAŞ ve Dr.Öğr.Ü. Sema KARAKAŞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımlarını esirgemeyen Bitki Koruma bölümü lisans öğrencileri ve Fitopatoloji laboratuvarı lisansüstü öğrencilerine çok teşekkür ederim.

Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsünde Zir.Yük.Müh. Osman ÇİFTÇİ'ye Real-Time PCR çalışmalarına yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni en iyi şekilde yetiştirmeye çabalayan, herşeyin en güzeline layık olan canım anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve kendisini tanıdığım günden beri beni hep motive eden biricik eşim Ümmühan ve tezin yazım aşamasında aramıza katılan canım kızım Zeynep Neva'mıza teşekkür ederim.

COVID19 salgınının devam ettiği bu zorlu günlerde, toplumun çıkarlarını bireyin çıkarlarından daima üstün tutan değerli bilim insanlarına teşekkür ederim.

Başöğretmen Gazi Mustafa Kemal Atatürk'ün "*Geleceğin güvencesi sağlam temellere dayalı bir eğitime, eğitim ise öğretmene dayalıdır*" sözüne istinaden, üzerimde emeği geçen tüm eğitimcilere sonsuz şükranlarımı sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. 1. Resmi olarak kabul edilen 41 farklı Fitoplazma türünün filogenetik ilişkileri. Taksonlar arasındaki filogenetik ilişki Neighbour-Joining metoduna göre oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987). Ağaç oluşturulurken türler arasındaki evrimsel mesafe aynı birimdeki bar ile ölçeklendirilmiştir. Evrimsel mesafeler ise Maximum Composite Likelihood metoduna göre oluşturulmuştur (Tamura ve ark., 2004). Bu analiz Mega X programı ile yürütülmüştür (Kumar ve ark., 2018).....6
Şekil 1. 2. Fitoplazmaların böcek vektörler ile bitkiden bitkiye taşınma şeması 8
Şekil 1. 3. Bozova ilçesinde antepfıstığı ve asmaların iç içe yetiştirildiği bir bahçe.....13
Şekil 1. 4. 'Ca.P.solani' için farklı strainlerin VMP1 ve Stamp genlerinin birleştirilmesiyle elde edilen filogenetik ağaç (Angelini ve ark. (2018)'den modifiye edilmiştir). 19
Şekil 3. 1. Fitoplazma ile enfeteli bir asma'dan atrap ile böcek örneklemesi yapılması (solda), atrap içindeki emici böcekleri yakalayan emgi şişesi (sağda) 40
Şekil 3. 2. Çeliklerin toplanması ve köklendirilmesi. A: Doğal enfekteli anaçtan çelik alınması, B: toplanan çeliklerin köklendirme ortamına alınması, C: Köklenen çelikler, D: İlk hastalık belirtilerinin gözlenmesi.....46
Şekil 3. 3. Küsküt köprüleri ile konukçular arasında fitoplazma taşınması. **A:** Sağlıklı pervane çiçeği fideleri, **B:** pervane çiçeğinin küsküt ile parazitlenmesi, **C:** küsküt tohumlarının çimlenmesi, **D:** Doğal enfekteli asma anacından alınan köklendirilmiş kalem, **E:** Pervane çiçeği ile Asma arasında kurulan küsküt köprüleri. 47
Şekil 3. 4. Yaprak orta damarları steril bistüri ile ayrılan DNA izolasyonuna hazırlanan bir örnek ..48
Şekil 3. 5. Rutin tanılama işlemlerinde kullanılan Nested PCR iş akış diyagramı 51
Şekil 3. 6. 16S-23S rDNA operonunun şematik gösterimi, fitoplazmaların PCR ile teşhisi için kullanılan üniversal primerlerin bazılarının pozisyonunu göstermektedir.....52
Şekil 3. 7. Protein miktarının tayini için Coomassie blue yöntemi ile (Bradford, 1976) protein kalibrasyon standardı.....57
Şekil 3. 8. L- prolin kalibrasyon standardı 59
Şekil 4. 1. Antepfıstığı ile asmaların iç içe tesis edildiği bir bahçe (Bozova) 63
Şekil 4. 2. Hönüsü asma çeşidinde düzensiz yaprak kızarmaları 64
Şekil 4. 3. Fitoplazma enfeksiyonu sonucu sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme 65
Şekil 4. 4. Fitoplazma enfeksiyonu sonucu sürgünlerde üst üste binmiş yapraklar 65
Şekil 4. 5. Yapraklarda fitoplazma enfeksiyonu nedeni ile sararma ve renk açılması belirtisi 66
Şekil 4. 6. Genç sürgünlerde lignifikasyon eksikliği nedeni ile odunlaşamayan dokular 66
Şekil 4. 7. Fitoplazma kaynaklı ölü sürgün oluşumunun gözlenmesi belirtileri.....67
Şekil 4. 8. Antepfıstığı ağacında yaprak yanıklık belirtisi şeklinde gözlenen fitoplazma belirtileri ..70
Şekil 4. 9. Yeni aşılanmış bir fitoplazma-pozitif antepfıstığında Cadı süpürgesi belirtisi oluşumu...70
Şekil 4. 10. Tipik fitoplazma hastalık belirtisi (yaprakların bir kısmında kızarma ve gelişme bozukluğu) gösteren bir tarla sarmaşığı.....71
Şekil 4. 11. *Amaranthus blitoides'*de sararma ve küçük yaprak oluşumu belirtileri 72
Şekil 4. 12. Fitoplazma-pozitif bir *Amaranthus blitoides'*de küçük yaprak oluşumu ve kızarıklık belirtileri 72
Şekil 4. 13. Prosopis farcta'da şiddetli yaprak sararması gösteren bir örnek (fitoplazma pozitif) 73
Şekil 4. 14. *Glycyrrhiza glabra*'da genç yapraklarda sararma ile başlayan ve nekrotik lezyon oluşumuna varan belirtiler.....74
Şekil 4. 15. Yapraklarda kısmi olarak kızarma ve antosiyanin birikimi belirtisi gösteren bir kanyaş bitkisi.....75
Şekil 4. 16. Zyginidia spp.'ye ait bir böcek (fitoplazma negatif) 76
Şekil 4. 17. Empoasca spp ve Asymetresca spp.'nin karışık bir görüntüsü 76
Şekil 4. 18. Dictyophara europaea L. türünün tersten çekilmiş bir görüntüsü.....77
Şekil 4. 19. Sogatella vibix (Haupt, 1927) emici böceği.....77
Şekil 4. 20. M1/M2 primerlerinin çoğalttığı yaklaşık 0.5 kb uzunluğundaki fragmentler ile R16F(I)1/R1 primerlerinin çoğalttığı fitoplazmaya özgü 16SrDNA gen fragmentlerinin görüntüsü. 78
Şekil 4. 21.iPhyClassifier online sınıflandırma programının kullanımına dair bir görsel 79
Şekil 4. 22. GrS72 izolatının 17 RFLP enzimi ile in silico kesim görüntüleri 80
Şekil 4. 23. GrS19 izolatının 17 RFLP enzimi ile in silico kesim görüntüleri 80

Şekil 4. 24. FtufAY/RtufAY primerlerinin çoğalttığı Tuf geni fragmentleri 81
Şekil 4. 25. FtufAY/RtufAY primerlerinin HpaII kesim profilleri. 1-4 Asmalardan elde edilen fitoplazma, 5-6 antepfıstığı, 7-9 Convolvulus arvensis'ten elde edilen fitoplazma DNA'sı. 10 numarada kesilmemiş bir örnek bırakılmış ve 11 numara negatif kontrolü göstermektedir. Soldaki marker 1 kb'lik DNA ladder iken sağtaki ise 100bk'lik DNA'ladder dizisidir. en sağdaki Tuf-a ve Tuf-b'nin in silico kesimi izolat ayrımını netleştirmek için eklenmiştir. 82
Şekil 4. 26. Grs19 izolatının Tuf geni fragmentinin HpaII kesim profili 83
Şekil 4. 27. VMP1 geni üzerinden TYPH10F/R primerlerinin çoğalttığı 1.4kb uzunlığundaki bantlar (solda) ve SecY geni üzerinden PosecF3/R3 primerlerinin çoğalttığı yaklaşık 0.99 kb uzunluğundaki bantlar (sağda)..... 84
Şekil 4. 28. GenBankasından çekilen P7 izolatı ve GrS19 izolatının detaylı BLAST analizi sonucu 85
Şekil 4. 29. GrS19 izolatının VMP1 genine dayalı TYPH10F/R primer ürünlerinin RsaI kesim profili..... 86
Şekil 4. 30. GenBankasından çekilen CaPsolSecY-JO3 izolatı ve GrS19 izolatının detaylı BLAST analizi sonucu..... 86
Şekil 4. 31. GrS19 ve GrS72 kodlu izolatların diğer bilinen fitoplazmalar ile akrabalık ilişkilerini gösteren, Neighbour-Joining metodunu esas alan bir filogenetik ağaç (Bootstrap örnekleme değeri 1000 olarak ayarlanmıştır). 88
Şekil 4. 32. VMP1 genine dayalı 21 adet tiplendirmenin temsilci izolatlar ile filogenetik ilişkisini gösteren dendogram..... 89
Şekil 4. 33.GenBankasındaki tüm'Ca.P.solani' VMP1 tiplerinin GrS19 izolatı ile filogenetik ilişkisi 90
Şekil 4. 34. Emeçleri ile Catharanthus sp. bitkisine tutunmuş ve hastalık taşımaya hazır bir küsküt 91
Şekil 4. 35.Catharanthus roseus'dan küsküt ile fitoplazma taşındıktan sonra ortaya çıkan virescence ve phyllody belirtileri. 92
Şekil 4. 36. Catharanthus roseus'da çiçeklerde yaprak benzeri yapıların oluşması belirtisi (Phyllody)..... 93
Şekil 4. 37. Hastalık taşıma çalışmalarına bitkisel materyal hazırlığından bir görsel 94
Şekil 4. 38. Analizlerde kullanılan sağlıklı (solda) ve 'Ca.P. solani' ile bulaşık kalemler..... 95
Şekil 4. 39. Köklenmeden sonra çıkan ilk yapraklardaki sararma hastalık belirtileri 96
Şekil 4. 40. Sağlıklı ve 'Ca.P.solani' bulaşık asmaların yapraklarında ölçülen CAT değerleri 97
Şekil 4. 41. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki POX enzim aktivitesi..... 98
Şekil 4. 42. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki toplam protein düzeyleri..... 99
Şekil 4. 43. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki prolin düzeyleri..... 100
Şekil 4. 44. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki toplam klorofil düzeyleri 101
Şekil 4. 45. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki MDA düzeyleri..... 102
Şekil 4. 46. Sağlılı ve fitoplazma ile bulaşık asma bitkisinin yapraklarındaki H_2O_2 (nmol g^{-1}) düzeyleri..... 103
Şekil 4. 47. Sağlılı ve fitoplazma ile bulaşık asma bitkisinin yapraklarındaki toplam fenolik madde düzeyleri..... 104
Şekil 4. 48. Yapraklardaki lignin birikimini gösteren belirtiler..... 105
Şekil 4. 49. Yapraklarda fitoplazma kaynaklı kalloz birimine dair görseller 106

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. Bilimsel olarak kabul edilmiş fitoplazma türleri ve ribozomal grupları 4
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyalin bölgelere göre dağılımı 38
Çizelge 3. 2. Asmalardan çeşit bazında alınan örnek sayısı ve bazı çeşit özellikleri 39
Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan Primerlerin isimleri, baz dizileri, çoğalttığı gen özellikleri ve baz uzunlukları ve kaynakları 42
Çizelge 3. 4. qPCR'da kullanılan primerler ve prob özellikleri 43
Çizelge 3. 5. PCR reaksiyon bileşenleri, miktar ve konsatrasyonları 53
Çizelge 4. 1. Sürvey yapılan bağ alanlarında tanılanan fitoplazmaların dağılımı 67
Çizelge 4. 2. VMP1 genine dayalı filogenetik ilişkilerin belirlnmesinde kullanılan izolatlar (Quaglino ve ark. (2016)'dan ve SEE-ERANET isimlendirme (X. Foissac, France) modifiye edilmiştir. 85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
bp	base pair, baz çifti
Ca.	Candidatus
CAT	Katalaz
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	DNA nükleotit bazları
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
Kb	kilobase pair
M	Marker
MDA	Malondialdehit
$MgCI_2$	Magnezyum Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POX	Peroksidaz
PVP	Polyvinylpyrrolidone
rDNA	ribozomal DNA
RFLP	Restriction fragment length polimorphism
RNA	Ribo Nükleik asit
rRNA	ribozomal RNA
UV	Ultraviolet
IBA	İndol-3-Bütirik Asit
BN	Bois Noir
FD	Flavescence doreé
Rpm	Revolutions per Minute
g	Gram
ΔA	Delta Absorbans
mL	Mililitre
VMP1	Vacuole membran protein 1
Tuf	Ef-tu proteini kodlayan gen
16SrDNA	16 Svedberg ribosomal ribonükleik asit
TAE	tris-acetate Etilendiamin Tetraasetikasit
°C	degree Celsius (santigrat derece)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
MBO	Mikoplazma benzeri organizma
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trikloroasetik Asit

1. GİRİŞ

Genel olarak orman ağaçları, çiçekler, kültür bitkileri, yabani bitkiler, yabancıotlar dünyadaki canlılar aleminin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadırlar. Bitkiler direkt ve dolaylı olarak bitkiler doğadaki besin zincirinde vazgeçilmez bir öneme sahiptirler. Bitkiler güneş ışınlarını kullanarak güneş enerjisini karbonhidratlar, proteinler ve yağlarla kullanılabilir kimyasal enerji olarak depolayabilen canlılardır (Agrios, 2005).

Bitki hastalıkları tarımsal üretim sistemi içerisinde bitki korumanın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bitki hastalıkları tarımda ürün ve kaliteyi önemli düzeyde azaltmaktadır. Hastalık etmenleri ile bulaşık bitkilerde normal gelişim ve fizyolojik fonksiyonlar normalden sapmakta ve bitkiler zarar görmektedir (Agrios, 2005).

Bir hastalık etmeninin doğru tanılanması hastalık etmenine karşı en uygun mücadele yönteminin geliştirilmesi açısından önemli bir adım sayılmaktadır. Genel olarak bitki hastalıklarıyla mücadelede ilk adım olarak hastalığa neden olan etmenin biyotik (patojen) veya abiyotik etmenlerden (çevresel faktörler) mi kaynaklandığına karar vermektir. Çünkü bitki hastalıkları ya cansız etmenlerden (abiyotik, patojenik olmayan vs.) ya da canlı etmenlerden (biyotik, patojenik, parazitik vs.) oluşmaktadır. Yani bitki hastalıkları, hastalıktan etkilenen bitki kısımları veya hastalığa neden olan etmenlerin türüne dayalı olarak gruplandırılmaktadır (Agrios, 2005).

Genel olarak bitki hastalığı, bitkilerde uygun olmayan çevrenin neden olduğu veya canlı parazit etmenlerin yarattığı yapısal ya da fizyolojik işlevlerdeki değişiklikler olarak tanımlanır ve genellikle bitkinin ekonomik veya pazarlanabilir değerini düşürmektedir. Bitkiler tarafından hastalığa neden olan etmenlere tepki olarak ortaya çıkan, doku içinde veya dışında meydana gelen birtakım değişimlere simptom denilmektedir. Çoğu zaman bitki koruma uzmanları bitki hastalıklarının saptanmasını bitkideki hastalık simptomlarına dayanarak yapmaktadırlar. Fitopatoloji alanı patojenleri ve bitkide hastalığa neden olan çevresel faktörleri inceleyen ayrıca hastalığın zararını kontrol etme veya önlemeye yönelik çalışmaları kapsayan bir bilim

dalıdır. Bitki hastalıkları kontrol altına alınmadığında düşük verim, daha yüksek fiyatlı ve düşük kaliteli gıdalar ile karşılaşmamıza neden olabilmektedir (Agrios, 2005).

Geçtiğimiz 20-30 yıllık süreçte moleküler fitopatoloji alanında çalışan bilim insanları bitki patojenlerini tanılamada kullanılan yeni tanılama araçları ve bazı teknikleri uygulamaya koymuşlardır. Bu gelişmeler monoklonal antikorlarla tespit, nükleik asit hibritlenmesinin yüzdelerinin hesaplanması ve patojenlerin nükleik asitlerinin nükleotid dizilerinin belirlenmesi, tüm genomun dizilenmesi, RNAseq çalışmaları gibi yöntemleri içermektedir. Bu teknikler geliştikçe bitki hastalıklarını tespit etme ve bunlar ile mücadele etmek şüphesiz daha da kolaylaştırmaktadır.

1.1. Fitoplazmalar

Fitoplazmalar birçok bitki türünde çeşitli hastalıklara neden olan prokaryot organizmaların *mollicutes* sınıfına ait, hücre duvarı olmayan ve tek hücreli mikroorganizmalardır (Bertaccini ve Lee, 2018). Bitkilerde neden oldukları hastalık belirtilerine bakılarak önceleri virüs ve virüs benzeri hastalık etmeni organizmalar olarak değerlendirilmişlerdir (Kunkel, 1926). Daha sonra Japon bilim insanları tarafından elektron mikroskobu ile incelendiklerinde mikoplazmalara benzedikleri saptanmış ve Mikoplazma Benzeri Organizma (MBO) olarak adlandırılmışlar ve ayrı bir tür olarak değerlendirilmişlerdir (Doi ve ark., 1967).

Bu mikroorganizmalardan kaynaklanan bitki hastalıklarının isimlendirilmesi kendilerinden daha önce yapıldığı için, doğada varlığı sonradan keşfedilen farklı fitoplazma etmenlerinin isimlendirilmeleri için herhangi bir düzenleme yapılamamıştır. Moleküler teşhis yöntemlerinin gelişmesi ile neredeyse aynı hastalık belirtilerinin bu mikroorganizmanın farklı türlerinden kaynaklandığı ve aynı zamanda farklı isimler ile adlandırılan hastalıkların aynı organizma türü tarafından oluşturulduğu farkedilmiştir. Ayrıca bu bitki patojeni organizmalar *in vitro* koşullarda kültüre alınamadığından, isimlendirilmeleri ve taksonomilerinin araştırılması da oldukça karmaşık bir şekilde ilerlemiştir. Bu alandaki ilgili teknolojik gelişmelerle birlikte *16S rRNA* gen dizileri (korunmuş gen) analizlerinin karşılaştırılması ile

prokaryotlar içinde bulunan ve aynı evrimsel atadan gelen bu organizmaların *Mollicutes* sınıfı içinde büyük bir monofiletik grup oluşturduğu saptanmıştır. İsimlendirme problemini aşmak adına 2004 yılında Uluslararası Mikoplazmoloji Organizasyonu (The International Organization for Mycoplasmology, IRPCM)'na bağlı Fitoplazma/Spiroplazma Çalışma Takımı- Fitoplazma Taksonomi Grubu tarafından bir fikirbirliğine varılmış ve bu patojenlerin yeni bir organizma türü olduğu ve cins ismi olarak "*Candidatus* Phytoplasma" ismi önerilmiştir (Firrao ve ark., 2004). Buna göre, bir fitoplazmanın farklı bir tür olarak kabul edilebilmesi, *16S rRNA* gen parçası baz dizilimlerinin (yaklaşık 1200 baz çifti uzunluğunda) daha önce tanımlanmış olan türlerinkine benzerliği %97.5'ten daha düşük olduğu durumlarda geçerli kılınmıştır (Firrao ve ark., 2004). Fitoplazmaların *in vitro* kültüre alınmasındaki başarısızlıklar ve elektron mikroskobu altında değişken şekilli olmaları nedeniyle fenotipik karakterizasyonları yapılamamaktadır ve günümüzde bu organizmaların tür/cins ayrımında ve isimlendirilmesinde halen bu sistemin kuralları uygulanmaktadır (Bertaccini ve Lee, 2018).

Fitoplazmaların *16S rRNA* geninin taksonomik sınıflandırma çalışmalarında kullanılmasının nedeni oldukça korunmuş bir diziye sahip olmasının yanı sıra, tür içi taksonomik sınıflandırmaları yapabilecek kadar çeşitliliğe de sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer yandan *16S rRNA* geni sadece fitoplazmalarda değil, tüm bakterilerin genomunda fonksiyonel olarak korunmuş bir gen olarak yer almakta ve sistematikte kullanılmaktadır (Woese ve Fox, 1977). Fitoplazmalar zaman içinde tarımsal açıdan verimi kısıtlayıcı ve yayılıcı karaktere sahip olmalarından dolayı artış gösteren bir araştırma konusu olmuş ve bu sayede doğada '*Candidatus* Phytoplasma' türlerinin keşfedilmeleri ve ribozomal grup/altgrup'larının sayısı zaman içinde artış göstermiştir (Bertaccini ve ark., 2014). Hatta son birkaç yıl gibi kısa bir süre içerisinde bile "*Ca*. P. wodyetiae" ve "*Ca*. P. noviguineense" gibi yeni fitoplazma türleri önerilmiştir (Miyazaki ve ark., 2018; Naderali ve ark., 2017).

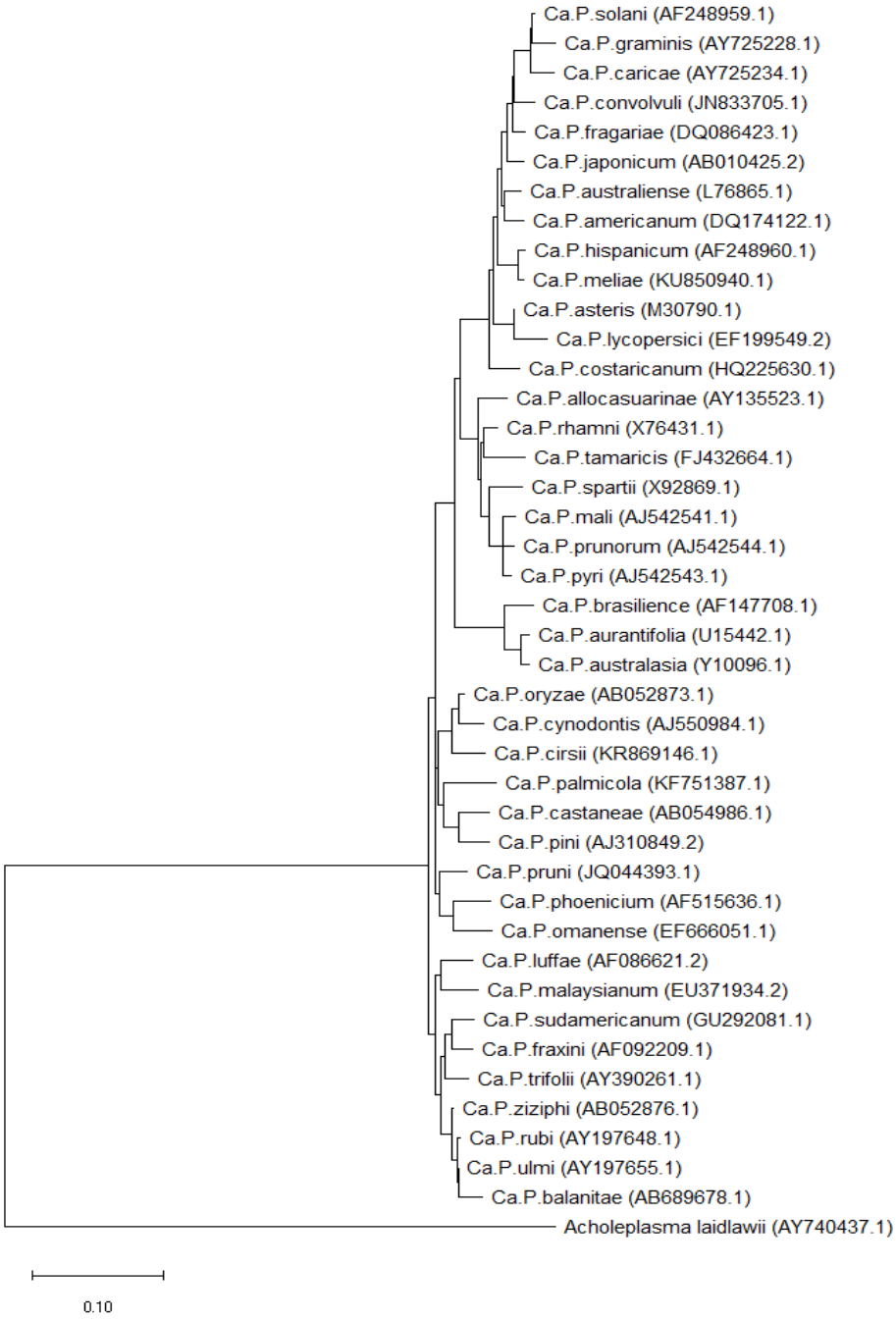
Günümüzde fitoplazmalar korunmuş ribozomal *16S rRNA* gen dizilerine dayalı olarak 33 ana grup altında 41 farklı türü bulunmaktadır (Çizelge 1. 1). Ayrıca 159 farklı fitoplazma streyinin NCBI'da referans numarasına dayalı kaydı bulunmaktadır

(Bertaccini ve Lee, 2018). Fitoplazmalar korunmuş *16S rRNA* genime dayalı olarak sınıflandırılmaktadırlar ve taksonomik çalışmalar bu gen üzerinden yapılmaktadır.

Çizelge 1. 1. Bilimsel olarak kabul edilmiş fitoplazma türleri ve ribozomal grupları

Sıra	**16Sr Grup adı**	**Tür adı**	**NCBI erişim no**	**Kaynak**
1	16SrI-B	'*Ca*. P. asteris'	M30790	(Lee ve ark., 2004a)
2	16SrI-Y	'*Ca*. P. lycopersici'	EF199549	(Arocha ve ark., 2007)
3	16SrII-B	'*Ca*. P. aurantifolia'	U15442	(Zreik ve ark., 1995)
4	16SrII-D	'*Ca*. P. australasia'	Y10096	(White ve ark., 1998)
5	16SrIII-A	'*Ca*. P. pruni'	JQ044393	(Davis ve ark., 2013)
6	16SrV-A	'*Ca*. P. ulmi'	AY197655	(Lee ve ark., 2004b)
7	16SrV-B	'*Ca*. P. ziziphi'	AB052876	(Jung ve ark., 2003a)
8	16SrV-E	'*Ca*. P. rubi'	AY197648	(Malembic-Maher ve ark., 2011)
9	16SrV-F	'*Ca*. P. balanitae'	AB689678	(Win ve ark., 2013)
10	16SrVI-A	'*Ca*. P. trifolii'	AY390261	(Hiruki ve Wang, 2004)
11	16SrVI-I	'*Ca*. P. sudamericanum'	GU292081	(Davis ve ark., 2012)
12	16SrVII-A	'*Ca*. P. fraxini'	AF092209	(Griffiths ve ark., 1999)
13	16SrVIII-A	'*Ca*. P. luffae'	AF086621	(Davis ve ark., 2017)
14	16SrIX-B	'*Ca*. P. phoenicium'	AF515636	(Verdin ve ark., 2003)
15	16SrX-A	'*Ca*. P. mali'	AJ542541	(Seemüller ve Schneider, 2004)
16	16SrX-B	'*Ca*. P. prunorum'	AJ542544	(Seemüller ve Schneider, 2004)
17	16SrX-C	'*Ca*. P. pyri'	AJ542543	(Seemüller ve Schneider, 2004)
18	16SrX-D	'*Ca*. P. spartii'	X92869	(Marcone ve ark., 2004a)
19	16SrXI-A	'*Ca*. P. oryzae'	AB052873	(Jung ve ark., 2003b)
20	16SrXI-E	'*Ca*. P. cirsii'	KR869146	(Šafářová ve ark., 2016)
21	16SrXII-A	'*Ca*. P. solani'	AF248959	(Quaglino ve ark., 2013)
22	16SrXII-B	'*Ca*. P. australiense'	L76865	(Davis ve ark., 1997)
23	16SrXII-D	'*Ca*. P. japonicum'	AB010425	(Sawayanagi ve ark., 1999)
24	16SrXII-E	'*Ca*. P. fragariae'	DQ086423	(Valiunas ve ark., 2006)
25	16SrXII-H	'*Ca*. P. convolvuli'	JN833705	(Martini ve ark., 2012)
26	16SrXIII-A	'*Ca*. P. hispanicum'	AF248960	(Davis ve ark., 2016)
27	16SrXIII-G	'*Ca*. P. meliae'	KU850940	(Fernández ve ark., 2016)
28	16SrXIV-A	'*Ca*. P. cynodontis'	AJ550984	(Marcone ve ark., 2004b)
29	16SrXV-A	'*Ca*. P. brasiliense'	AF147708	(Montano ve ark., 2001)
30	16SrXVI-A	'*Ca*. P. graminis'	AY725228	(Arocha ve ark., 2005)
31	16SrXVII-A	'*Ca*. P. caricae'	AY725234	(Arocha ve ark., 2005)
32	16SrXVIII-A	'*Ca*. P. americanum'	DQ174122	(Lee ve ark., 2006)
33	16SrXIX-A	'*Ca*. P. castaneae'	AB054986	(Jung ve ark., 2002)
34	16SrXX-A	'*Ca*. P. rhamni'	AJ583009	(Marcone ve ark., 2004a)
35	16SrXXI-A	'*Ca*. P. pini'	AJ310849	(Schneider ve ark., 2005)
36	16SrXXII-A	'*Ca*. P. palmicola'	KF751387	(Harrison ve ark., 2014)
37	16SrXXIX-A	'*Ca*. P. omanense'	EF666051	(Al-Saady ve ark., 2008)
38	16SrXXX-A	'*Ca*. P. tamaricis'	FJ432664	(Zhao ve ark., 2009a)
39	16SrXXXI-A	'*Ca*. P. costaricanum'	HQ225630	(Lee ve ark., 2011)
40	16SrXXXII-A	'*Ca*. P. malaysianum'	EU371934	(Nejat ve ark., 2013)
41	16SrXXXIII-A	'*Ca*. P. allocasuarinae'	AY135523	(Marcone ve ark., 2004a)

Yakın zamanda araştırıcılar böceklerde ve bitkilerde saptanan bazı fitoplazma türlerinde tür içi korunmuş gen dizilimlerindeki (Interoperon sequence heterogenicity) farklılıkları rapor ederek bu türün biyoçeşitliliğine dikkat çekmişlerdir (Ho ve ark., 2001; Schneider ve Seemüller, 1994). Fitoplazmaların *16S rRNA* genine dayalı filogenetik analizler ile sınıflandırılmaları (Şekil 1. 1), tür düzeyinde evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde ve taksonomide başarılı olarak kullanılmaktadır. Ancak biyoçeşitlilik göz önüne alındığında *16S rRNA* gen analizlerinin alt grup seviyesinde sınıflandırılmasında eksiklikler göze çarpmaktadır (Zhao ve ark., 2009b). PCR/RFLP'ye dayalı sınıflandırma ile bu problemi çözmek adına önceleri verimli sonuçlar elde edilmiştir ancak daha sonra araştırıcılar tarafından fitoplazma strainlerini birbirinden ayıran 17 adet restriksiyon enziminin (*Bam*HI, *Alu*I, *Bfa*I, *Dra*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Hha*I, *Hin*fI, *Eco*RI, *HaeI*II, *Hpa*I, *Hpa*II, *Mse*I, *Kpn*I, *Sau3*AI (*Mbo*I), *Rsa*I, *Taq*I ve *Ssp*I) kullanılabilir olduğu tespit edilmiş ve laboratuvar ortamında ve bilgisayar destekli RFLP analizlerinde kullanılmıştır (Lee ve ark., 1998; Wei ve ark., 2008). Yani aynı ribozomal grup içerisinde ayrıca çeşitli alt gruplar da yer almaktadır ve bu alt gruplar ise korunmuş gen bölgesinde bulunan restriksiyon kesim bölgelerine göre birbirinden ayırt edilmektedir (Lee ve ark., 1998).



Şekil 1. 1. Resmi olarak kabul edilen 41 farklı Fitoplazma türünün filogenetik ilişkileri. Taksonlar arasındaki filogenetik ilişki Neighbour-Joining metoduna göre oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987). Ağaç oluşturulurken türler arasındaki evrimsel mesafe aynı birimdeki bar ile ölçeklendirilmiştir. Evrimsel mesafeler ise Maximum Composite Likelihood metoduna göre oluşturulmuştur (Tamura ve ark., 2004). Bu analiz Mega X programı ile yürütülmüştür (Kumar ve ark., 2018).

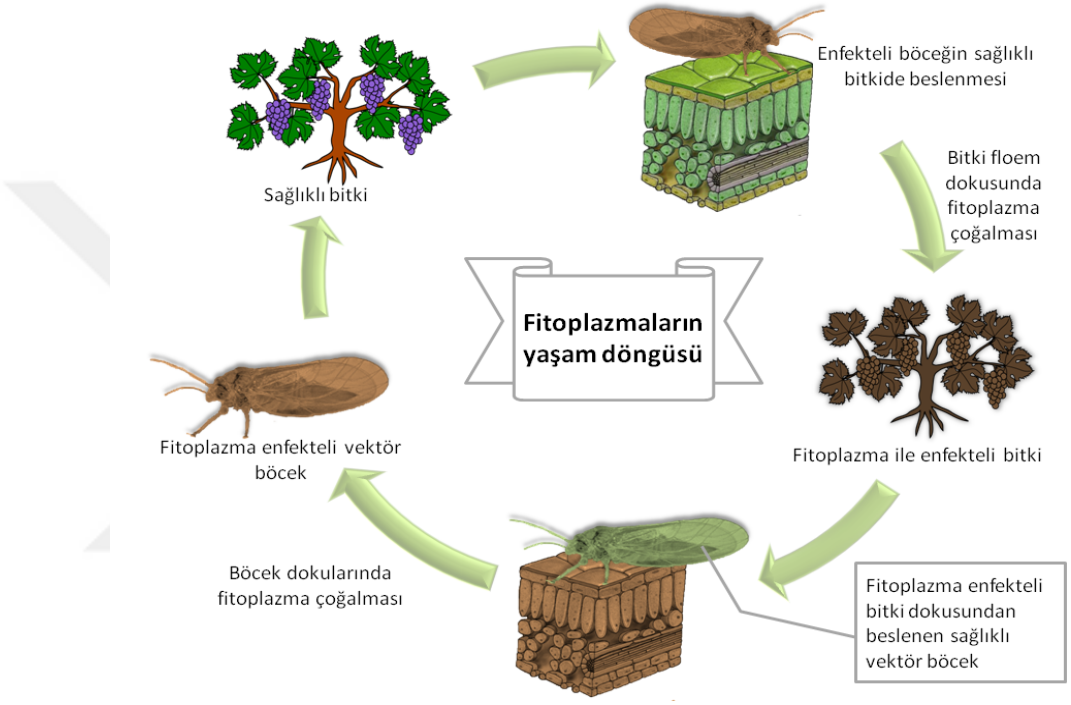
1.2. Bağ Bitkileri ve Fitoplazmalar

Fitoplazmaların keşfedilmesinden önce bile tüm dünyada önemli bağ üretim alanlarında fitoplazmalardan kaynaklanan hastalıklar genel olarak "bağ sarılık hastalıkları" (Grapevine yellows disease) olarak isimlendirilmiştir (Bertaccini, 2017; Caudwell, 1957; Schvester ve ark., 1961). Kırmızı ve beyaz birçok asma çeşidinin fitoplazma kaynaklı hastalıklara karşı duyarlı olduğu ve bazı çeşitlerin fitoplazma enfeksiyonu altında hastalık simptomu göstermeden kalabildiği bilinmektedir (Constable, 2009). Ancak genel olarak fitoplazmalar bağ üretimini önemli derecede sınırlayıcı ve yayılıcı karaktere sahip patojenler olarak kabul edilmiş ve bazı fitoplazma türleri karantina etmeni kapsamında değerlendirilmiştir (EPPO, 2018). Serolojik ve moleküler yöntemler geliştirilmeden önce bağ sarılığı fitoplazmalarının birbirinden ayırt edilmesi biyolojik özelliklerine dayalı olarak yürütülmüştür. Örneğin "Bois noir" (BN) hastalığına neden olan fitoplazma ile "Flavescence doreé" (FD) hastalığına neden olan fitoplazma türü biribirinden vektör böceğin patojeni taşıyıp taşımamasına göre ayırt edilmiştir. *Scaphoideus titantus* Ball. (Hemiptera: Cicadellidae) olarak isimlendirilen böcek hastalığı yeni bitkiye taşıyorsa bu FD fitoplazması, eğer taşımıyorsa BN fitoplazması olarak değerlendirilmiştir (Caudwell, 1990).

Moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesinden önce bu gibi karakterizasyon yöntemleri ile fitoplazmalar birbirinden ayırt edilmiştir. Ancak 2015 yılından sonra, *16SrRNA* geninin dizilenmesi ve PCR/RFLP analizleri ile dokuz farklı 16Sr ribozomal gruba ait (16SrI, -II, -III, -V, -VII, -IX, -X, -XII ve -XXIII) 24 farklı fitoplazma türünün asmaları enfekte ettiği rapor edilmiştir (Constable ve Bertaccini, 2017). Ayrıca aynı fitoplama türünün bölgesel bazda biyolojileri, epidemiyolojileri ve virülenslik derecelerinin farklılık gösterdiği çeşitli araştırmalarda öne sürülmüştür (Constable, 2009).

Özellikle Avrupa kıtası bağ üretim alanlarında BN ve FD hastalıkları öne çıkan iki önemli fitoplazma hastalığıdır. Bu hastalıkların ülkelerdeki/bölgelerdeki varlığının belirlenmesi üretimde meydana gelecek verim kayıplarının önlenmesinde ve mücadele stratejilerinin oluşturulmasında atılacak ilk adımı oluşturmaktadır. Bunun için de

patojenin biyolojisinin, taşınmasının, epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Asma sarılığı hastalıklarının Avrupa ülkelerinde hızlı epidemilere neden olmasında en önemli etken, hastalığı taşıyan uygun bir vektör böcek varlığının bulunması sayılabilir. Böceğin hastalığı taşıma stratejisi Şekil 1. 2'de şematize edilmiştir. Bu sistem bitki virüslerindeki persistent taşıma sistemine benzemektedir.



Şekil 1. 2. Fitoplazmaların böcek vektörler ile bitkiden bitkiye taşınma şeması

Flavescence doreé (FD) Avrupa ülkelerinde bağ yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli fitoplazma hastalığıdır. Şiddetli epidemilerde %100'e varan verim kayıplarına neden olmaktadır ve EPPO A1 karantina listesinde yer almaktadır (EPPO, 2018). FD'ye neden olan fitoplazmalar *16S rRNA* genine göre 16SrV-C ve -D olarak iki farklı ribozomal altgrup altında toplanmış (Martini ve ark., 1999) ve yaprak piresi *Scaphoideus titanus* Ball. (Hemiptera: Cicadellidae) ile taşınmaktadır (Mori ve ark., 2002). Bağ üretim alanlarında nispeten daha yaygın olan FD-D Fransa, İspanya, Portekiz, İsviçre, ve İtalya'nın kuzey bölgelerinde rapor edilirken, FD-C varlığı ise Slovenya, Sırbistan, Hırvatistan, Avusturya, Macaristan ve İsviçre'de rapor edilmiştir (Casati ve ark., 2017; Duduk ve ark., 2004; Malembic-Maher ve ark., 2011; Martini

ve ark., 1999; Musić ve ark., 2011; Radonjić ve ark., 2013; Reisenzein ve Steffek, 2011). FD-C bağ haricinde *Ailanthus altissima*, *Corylus avellana*, *Clematis vitalba* gibi yabancıotlarda saptanmıştır (Casati ve ark., 2017). FD fitoplazması yeni alanlara enfekteli üretim materyalleri ve *Scaphoideus titanus* Ball. yaprak piresi ile taşınmaktadır (Papura ve ark., 2012). Ayrıca *Orientus ishidae*, *Euscelidius variegatus* Kirschbaum, *Dictyophara europaea* gibi bağ üretim alanlarında bulunan ve patojeni taşıyabilecek potansiyel vektörler de bulunmaktadır (Mehle ve ark., 2010).

16SrXII ribozomal grupta sınıflandırılan fitolazmalar, çok çeşitli bitkileri enfekte etmektedir ve Cixiidae familyasının polifag bitki zararlıları tarafından taşınmaktadır. 16S rRNA gen dizileri ve biyolojik özelliklere dayanarak, grup 16SrXII, '*Candidatus* Phytoplasma japonicum', '*Ca.* Phytoplasma australiense' ve '*Ca.* Phytoplasma fragaria' gibi türler dahil olmak üzere birkaç farklı türü içermektedir (Oliveri ve ark., 2015). 16SrXII fitoplazma grubunun diğer strainleri, yabancıotlar ile birlikte otsu ve odunsu bitkilerde enfeksiyonlara neden olan stolbur hastalıkları bois noir hastalığı ile ilişkili strainlerdir. Ancak ilk defa Quaglino ve ark. (2013) tarafından yürütülen çalışma ile '*Ca*.P.solani' ilk kez diğer strainlerden ayrı bir takson olarak isimlendirilmiştir.

Bois noir (BN) hastalığı ise ilk kez 1961 yılında Fransa'da asma üretim alanlarında saptanmıştır (Caudwell, 1961). Sürgünlerin odunlaşamayan dokularının kış döneminde siyah renk alması nedeniyle bu hastalığa ''Siyah odun'' anlamına gelen "Bois Noir" ismi verilmiştir. Hastalık belirtisi olarak FD fitoplazmasının neden olduğu belirtilere çok benzemektedir ve hatta bu alandaki araştırıcılar daha az yaygınlıkta bulunduğu için BN hastalığına FD'nin epidemik olmayan formu olarak düşünmüşlerdir. *S.titaus* vektörünün bulunmadığı asma alanlarında BN saptanması ve deneysel olarak BN'nin bu vektör ile taşınmadığı anlaşıldığında bu hastalığın FD'den farklı bir hastalık olduğu kanısına varılmıştır. Hastalık Almanya'da ilk olarak "Vergilbungskrankheit" olarak adlandırılmış, daha sonra Fransada Bois noir olarak adlandırılmıştır. Günümüzde bu iki hastalığa neden olan patojenin aynı olduğu ve 16SrXII-A grubu "*Candidatus* Phytoplasma solani" olduğu bilinmektedir (Belli ve ark., 2010; Quaglino ve ark., 2013). BN asma üreticiliği yapılan neredeyse tüm

ülkelerde bulunmakta ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. BN hastalığına neden olan '*Ca*.P.solani' ilk olarak 16srXII-A altgrubunda sınıflandırılırken daha sonraki yapılan çalışmalarla 16SrXII-F, -G, -J ve -K gibi çeşitli ribozomal alt gruplara sahip olduğu rapor edilmiştir (Quaglino ve ark., 2017). BN fitoplazmasının asma ve alternatif konukçu bitkilerden elde edilen izolatları *tuf* geni analizlerine göre üçe ayrılmaktadır (Langer ve Maixner, 2004). Patojenin üç farklı ekolojik *tuf* profili bulunmaktadır;

- Tuf-tipA *Urtica dioica-H.obsoletus-Vitis vinifera* arasında,
- Tuf-tipB *Convolvulus arvensis -Hyalestes obsoletus-Vitis vinifera* arasında,
- Tuf-tipC ise *Calystegia sepium- H.obsoletus- Vitis vinifera* arasında bir patosistem'e sahiptir.

Almanya, Avusturya, İspanya ve İtalya'nın kuzeyinde bağ üretim alanlarında *Urtica dioica* ve *Convolvulus arvensis* yabancıotlarının *H.obsoletus*'un ana konukçusu olduğu rapor edilmiştir (Mori ve ark., 2013). BN fitoplazmalarının biyolojisi karışık ve bunların patojenisiteleri birbirinden farklılık gösterdiğinden farklı moleküler markır arayışları devam etmiştir. BN fitoplazmalarının *SecY*, *VMP1* ve *Stamp* genleri üzerinden yapılan MLST analizleri tuf profili ile karşılaştırıldığında daha çok çeşitlilik gösterdiği keşfedilmiştir (Foissac ve ark., 2013; Murolo ve Romanazzi, 2015). Ayrıca '*Ca*.P.solani' popülasyonlarından elde edilen VMP1 geninin *Rsa*I-RFLP analizleri ile bunların 23 farklı profil sergilediği rapor edilmiştir (Murolo ve ark., 2014; Pacifico ve ark., 2009).

Chenopodium album ve *Malva sylvestris* gibi bazı yabancıotların da '*Ca*.P.solani' konukçusu olabileceği ve bağ üretim alanlarında BN hastalığının yayılmasında önemli rol oynadıkları rapor edilmiştir (Marchi ve ark., 2015; Mori ve ark., 2015; Oliveri ve ark., 2015). Ancak Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde polifag beslenme özelliği gösteren *H. obsoletus* tercihen bağ üretim alanlarında veya çevrelerinde yabancıot olarak bulunan *C. arvensis*, *Artemisia vulgaris, U. dioica*, ve *Vitex agnus-castus* üzerinde yaşamaktadır (Langer ve Maixner, 2004; Sforza ve ark.,

1998). Son yıllarda *Reptalus panzeri* ve *R. quinquecostatus* sırasıyla Sırbistan ve Fransa'da bağ üretim alanlarında BN hastalığının vektörü olarak rapor edilmiştir (Chuche ve ark., 2016; Cvrković ve ark., 2014). Ayrıca bağ üretim alanlarında bulunmamasına rağmen *Anaceratagallia ribauti* de stolbur fitoplazmasının vektörü olarak rapor edilmiştir (Riedle-Bauer ve ark., 2008).

BN fitoplazması, bitkiden bitkiye Cixiidae familyasında yer alan *H. obsoletus* tarafından taşınmaktadır. Bununla birlikte, *H. obsoletus'*un olmadığı veya çok düşük popülasyon yoğunluklarında bulunduğu bağ yetiştirme alanlarında, yüksek BN enfeksiyonlarına rastlanması birçok araştırıcıya alternatif vektörlerin olabileceğini düşündürmüştür ve bu vektörlerin tespit edilmesi hastalıkla mücadelede oldukça önem arz ettiği rapor edilmiştir (Oliveri ve ark., 2015).

BN hastalığının karmaşık epidemiyolojisi bağ üretim alanlarında etkili bir mücadele stratejisi oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Bağ üretim alanlarında *H.obsoletus* popülasyonlarının kontrol altına alınması ve BN hastalığının yayılmasının engellenmesi konusunda insektisit uygulamalarının yeterli olmadığı da rapor edilmiştir (Maixner, 2007; Mori ve ark., 2008). Ancak *H.obsoletus*'a karşı yürütülen etkili mücadelenin BN hastalığının yayılmasını önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (Mori ve ark., 2012). Üretim materyallerine karşı uygulanacak önleyici karantina tedbirleri ve sertifikasyon programı dahilinde yetiştirilen üretim materyali için kullanılacak olan başlangıç kaynak bitkilere termoterapi uygulamaları ile hastalığın uzak mesafelere veya ülkeler arası taşınmasının engellenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca *H.obsoletus* gibi vektör böceklerin beslenebileceği yabancıotlar veya ara konukçuların ortadan kaldırılması, hastalıkla bulaşık anaçların aşı yerlerinin üzerinden gövdelerinin kesilmesi ve bitkilerde direnç oluşturucu aktivatörlerin kullanımı gibi uygulamalar BN hastalığı ile mücadelede kullanılabilecek diğer önemli yöntemlerdir (Mori ve ark., 2015). BN hastalığına neden olan '*Ca*.P.solani'nin geniş konukçu dizisi hastalıkla mücadeleyi oldukça zorlaştırmaktadır. Asmalarda sarılık benzeri hastalık belirtileri gösteren BN hastalığının belirtileri, FD hastalığı belirtilerine benzerlik göstermektedir. Bu şekildeki hastalık belirtisi FD hastalığının da belirtileri arasında yer almasından dolayı, bu belirti gösteren asmalar risk oluşturmaktadır ve

mutlaka hastalık karakterizasyonu yapılmalıdır. Bundan dolayı bu gibi hastalık belirtilerinin görüldüğü yerlerde mutlaka fitoplazma teşhis çalışmaları yürütülmelidir.

Ülkemizde ve özellikle bu çalışmanın geçtiği Güneydoğu Anadolu Bölgesinde genel olarak polikültür tarım yapıldığından, fitoplazmaların yayılması için uygun alternatif konukçuların bulunduğu tahmin edilmektedir ve bu hastalık gelecekte üretimi tehdit edebilecek epidemilere neden olabileceği düşüncesi ile çalışma yapılan bölgelerde patojenin detaylı karakterizasyon çalışmasının yapılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

Şanlıurfa ilinde antepfıstığı ağaçlarında da "*Ca*.P.solani" ile ilişkili fitoplazma varlığı yakın zaman önce rapor edilmiştir (Guldur ve ark., 2018). Asma ve antepfıstığı Şanlıurfa ilinde çoğu üretim alanında aynı alanlarda yetiştirilmektedir (Şekil 1. 3).

Fitoplazma kaynaklı hastalıkların her iki bitkide de varlığının tespit edilmesi, hastalık epidemiyolojisinin araştırılması ve bu iki önemli kültür bitkisinden elde edilen patojenin genetik karakterizasyonu ile akrabalık ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için bağ üretim alanlarındaki hastalık belirtisi gösteren antepfıstığı ağaçlarından da yaprak örnekleri alınmış ve bunlardan elde edilen fitoplazmalar moleküler yöntemler ile incelenmiştir.

Bakımsız olan bahçelerde vektör böceklerin varlığı ve yabancıotların da hastalık taşınmasında önemli rol oynayabileceği düşüncesi ile, epidemiyolojinin araştırılmasında potansiyel vektör böcekler ve çeşitli yabancıotlar da toplanarak moleküler yöntemler ile araştırılmıştır.



Şekil 1. 3. Bozova ilçesinde antepfıstığı ve asmaların iç içe yetiştirildiği bir bahçe

1.2.1. Asmalarda Fitoplazma Kaynaklı Hastalık Simptomları

Constable ve Bertaccini (2017)'ye göre asmalardaki fitoplazma hastalık belirtileri genel itibariyle şu şekilde belirtilmiştir;

- Beyaz asma çeşitlerinin yapraklarında düzensiz sararmalar,
- Kırmızı asma çeşitlerinde düzensiz yaprak kızarmaları,
- Sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme,
- Yaprakların arkaya doğru kıvrılması,
- Enfeksiyonlu sürgünlerde yaprakların üst üste binmesi,
- Sürgün boğum aralarında kısalmalar,
- Ölü sürgünler,
- Genç sürgünlerde lignifikasyon eksiklikleri sonucu yeşil-odunsu bölgeler,
- Büzüşük meyve oluşumu ve salkımların erkenden kuruması.

Genel olarak hastalık belirtileri asma örneklerinin yapraklarında, sürgünlerinde ve meyve salkımlarında meydana gelmektedir. Tomurcuklar patladıktan sonra ilk

olarak yaprak ve sürgünlerdeki belirtiler ortaya çıkmaktadır. Sürgünlerde boğum araları kısalmakta ve lignifikasyon eksikliği sonucu sürgünlerde yeşil ve odunsu dokuların iç içe geçtiği görülmektedir. Çiçekler solgun ve dökülmeye meyilli olmaktadır. İlkbahar aylarında hastalığın diğer biyotik/abiyotik hastalıklar veya fizyolojik problemler ile karıştırılması oldukça muhtemeldir. Ancak mevsim ilerledikçe ve yaz aylarında simptomlar belirginleşmeye başlamaktadır. Kırmızı çeşitlerde yapraklar kızarmaya ve beyaz çeşitlerde ise yaprak damarı dahil sararmaya başladığı açıkça görülebilmektedir (Angelini ve ark., 2018).

Şanlıurfa ilinde de bazı bağlarda yukarıda anılan hastalık belirtilerini gösteren asmaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir.

1.2.2. Bitki-Patojen Etkileşimleri

Asmalar ve fitoplazmalar arasındaki ilişkiler hakkında oldukça az araştırma yürütüldüğünden, bu konuda bilgi sınırlı kalmıştır (Dermastia ve ark., 2017). Fitoplazma ile bulaşık bitkilerdeki metabolik faaliyetlerin araştırılması hem asmanın çok yıllık bir bitki olması hem de fitoplazmaların kültüre alınmasındaki yetersizlikten dolayı oldukça yavaş ilerlemiştir (Contaldo ve ark., 2016). Diğer biyotrofik patojenler gibi fitoplazmalar da konukçu oldukları hücrelerde çeşitli hücresel tepkileri tetiklemektedirler. Bilinen bakteri-bitki etkileşimlerinde olduğu gibi, bitkilerin fitoplazma enfeksiyonlarına karşı oluşturduğu tepkiler de çeşitlilik göstermektedir. Asmaların tarla koşullarında maruz kaldıkları çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörleri bu bitkilerin fitoplazmalara karşı oluşturduğu spesifik tepkilerin ölçülmesini zorlaştırmaktadır (Izawa, 2015). Ancak farklı asma çeşitlerinin kontrollü koşullarda fitoplazma enfeksiyonuna karşı oluşturduğu spesifik tepkilerin karşılaştırılması veya enfekteli bitki ile sağlıklı bitkilerin arasındaki savunma mekanizmalarının ortaya konulması, kısmi olarak tolerant veya duyarlı çeşitlerin tespit edilmesi bu patojenlerle mücadelede geliştirilecek stratejilerin belirlenmesinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Fitoplazmalar bulaşık bitkilerdeki bazı metabolik değişikliklerin biyokimyasal teknikler kullanarak araştırılması ile konukçu bitkide oluşan primer ve sekonder metabolik faaliyetlerin etkilendiği birçok çalışma ile rapor edilmiştir (Bertamini ve ark., 2002; Prezelj ve ark., 2016; Rusjan ve ark., 2012a, 2012b; Rusjan ve Mikulic-Petkovsek, 2015). Fitoplazma ile enfekteli asmalardaki fotosentezin olumsuz etkilendiği ve hastalık simptomu gelişiminin bununla doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (Margaria ve ark., 2013). Bitki stresi ile prolin seviyesinin pozitif korelasyon içerdiği bilinen bir gerçektir. Prolin birikimi bitkileri stres koşullarında antioksidatif savunma molekülü ve sinyal molekülü olarak görev almakta ve bitkileri stresten korumaktadır (Hayat ve ark., 2012).

Prezelj ve ark. (2016) tarafından yürütülen çalışmada BN ile bulaşık asmaların yapraklarında prolin seviyesinin sağlıklı bitkiler ile karşılaştırıldığında altı kat arttığı rapor edilmiştir. BN fitoplazması ile bulaşık asma bitkisindeki kalloz depolanmasının da bitkinin stres toleransı geliştirmesi ile doğrudan ilişkisi bulunmaktadır (Musetti ve ark., 2013; Santi ve ark., 2013).

BN fitoplazması genom dizisi konukçu ile etkileşim halinde olan VMP1 ve Stamp membran proteinleri içermektedir ve bunların konukçu-patojen ilişkilerinin epidemiyolojisini araştıran çalışmalar yürütülmüştür (Cimerman ve ark., 2009; Fabre ve ark., 2011).

Aynı koşullarda yetiştirilseler bile tüm asma türleri ve çeşitleri fitoplazma enfeksiyonuna karşı aynı duyarlılığı göstermemektedir. Genel olarak anaç çeşitlerin fitoplazma enfeksiyonları kaynaklı simptom oluşumunda daha az duyarlı oldukları bilinmektedir (Eveillard ve ark., 2016). Simptom oluşumu bitki dokusundaki fitoplazma konsantrasyonu, laboratuvar ve tarla koşullarındaki farklılıklar ve asma çeşitlerine göre değişkenlik göstermektedir (Constable, 2009; Eveillard ve ark., 2016). Ayrıca simptom oluşumundaki duyarlılık farklılıkları asma çeşidinin veya vektör böceğin genetik ve epigenetik özellikleri ile tarımsal üretim uygulamalarındaki (Bitki besleme, pestisit kullanımı vb.) farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bulaşık asmalar kendiliğinden veya bir takım hormon uygulamaları ile fitoplazma kaynaklı hastalıklardan kurtulabilmektedir ve hastalık belirtileri bir sonraki üretim döneminde ortadan kalkabilmektedir (Galetto ve ark., 2014). Bu durum literatürde "recovery phenomena" olarak geçmektedir ve buradan itibaren bu terim "iyileşme olayı" olarak anılacaktır. İyileşme olayı fitoplazmanın türüne, konukçu bitki türüne (Bellomo ve ark., 2007) anaç kalem kombinasyonlarına (Romanazzi ve Murolo, 2008), çevresel koşullara ve tarımsal üretim faaliyetlerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Birçok araştırma bu iyileşme olayının bağların abiyotik stres'e maruz kaldıklarında daha da arttığını göstermiştir (Romanazzi ve ark., 2013). Ancak iyileşme belirtilerinin fizyolojik temelleri henüz bilinmemektedir (Bianco ve ark., 2019). Fitoplazma ile ilişkili hastalıklardan kurtulan ve iyileşme olayını gösteren asmaların floem dokularındaki H_2O_2 miktarının aşırı üretimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Musetti ve ark., 2007). Bu sonuç patojen virülensliğinin azaltılması veya bitkinin iyileşme olayının desteklenmesinde H_2O_2 birikiminin aktif rolü olduğu hipotezini ortaya çıkarmıştır.

H_2O_2 birikimi ve fitoplazma enfeksiyonu sonucu simptom oluşumu ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilen verilere dayalı olarak, bu tez çalışmasında fitoplazma enfeksiyonunun en çok rastlanan çeşitlerdeki H_2O_2 birikimi ölçülmüştür. Bunun sonucunda hastalık yaygınlığı ve çeşitlerin patojene karşı verdikleri tepki ilişkisi araştırılmıştır. Asmaların en önemli fitoplazma hastalıklarından FD fitoplazmaları EPPO (Europan Plant Protection Organisation) tarafından karantina etmeni olarak değerlendirilirken (EPPO, 2018), BN hastalığına neden olan fitoplazmalar karantina etmeni olarak değerlendirilmese de, BN hastalığının bağ üretim alanlarında önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Endeshaw ve ark., 2012). Türkiyede BN hastalığına neden olan fitoplazmanın varlığı asma ve diğer birçok kültür bitkisinde rapor edilmiştir. Ancak Şanlıurfa ve Adıyaman illeri için yerli asma anaçlarının bu patojene karşı duyarlılık durumlarını araştıran herhangi bir veri

bulunmamaktadır. Ayrıca bağ fitoplazmaları ve asmalar arasındaki patojen-konukçu etkileşimleri konusunu araştıran oldukça az sayıda çalışma yürütülmüştür.

1.3. Çoklu Lokus Dizilim Analizleri

Multilokus dizi tiplendirme veya Çoklu lokus dizilim analizleri, [Multilocus sequence typing (MLST)] epidemiyolojik ve evrimsel çalışmalarda bakteriyel patojen popülasyonlarının araştırılmasında kullanılan bir sistem olarak kullanılmaktadır (Urwin ve Maiden, 2003). Fitoplazma strainlerinin birbirinden ayırt edilmesinde *16S rRNA* dizi analizleri yetersiz kalmasından dolayı, yeni bazı housekeeping genler ve bazı membran proteinlerini kodlayan genlere dayalı fitoplazma genotiplemesi rapor edilmiştir (Foissac ve ark., 2013). Temel olarak MLST korunmuş gen dizilerinin belirli bölgelerini inceleyen ve bu bilgiyle bakteriyel izolatların daha net bir biçimde teşhis edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım hali hazırda meyve ağaçlarında enfeksiyonlara neden olan '*Candidatus* P. mali', '*Ca*. P. pyri' ve '*Ca*. P. prunorum', gibi önemli fitoplazmaların genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Danet ve ark., 2011). Çoklu lokus dizilim analizlerindeki amaç taksonomik çalışmalarda veya aynı familya içerisindeki organizmaların daha iyi karakterize edilmesinde kullanılan modern bir sistemdir. Bu karakterizasyon işlemi patojen epidemiyolojisi hakkında klasik sınıflandırmaya göre daha detaylı bilgiler sunmaktadır. Avrupa kıtasında bağ üretim alanlarında en yaygın olan BN ve FD hastalıklarına neden olan fitoplazma strainlerinin detaylı incelenmesine olanak sağlayan birçok gen veya gen bölgesi moleküler markır olarak kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2009).

FD fitoplazmasının ekonomik öneminden dolayı epidemiyolojisini ortaya çıkarmaya yönelik MLST analizleri araştırılmış, *tuf, rpsC-rplV, rplF-rplR,* ve *map* genleri moleküler markır genler olarak kullanılmıştır. Bunun sonucunda genetik çeşitliliği ve epidemiyolojisine dair önemli bulgular elde edilmiştir (Arnaud ve ark., 2007; Malembic-Maher ve ark., 2011).

Son yıllarda yürütülen çalışmalardan da görüldüğü üzere *Stamp* ve *VMP1* markırlarına dayalı moleküler epidemiyoloji yaklaşımları Akdeniz iklim kuşağındaki ülkelerde bağ üretim alanlarındaki BN hastalığının popülasyon çeşitliliği hakkında yeni bilgiler elde edilmesine olanak sağlamıştır (Fabre ve ark., 2011; Fialová ve ark., 2009; Foissac ve ark., 2013; Murolo ve ark., 2014; Murolo ve Romanazzi, 2015). Güncel çalışmalar *Vitex-agnus castus* bitkilerinin *H.obsoletus* vektörü aracılığı ile BN hastalığının bağlara yayılmasında direk rol oynadığını (Kosovac ve ark., 2016) ve *Reptalus panzeri*'nin mısırlardan asmalara '*Ca*.P.solani' taşıdığını göstermiştir (Cvrković ve ark., 2014).

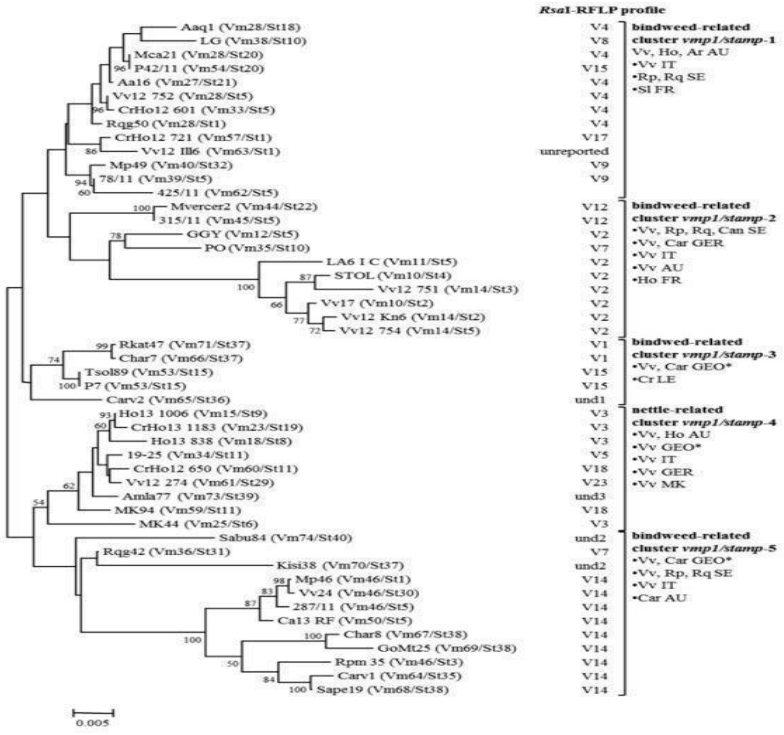
Özellikle BN hastalığının biyolojik ve yaşam döngüsündeki karmaşıklık, bu patojenin detaylı karakterizasyonunda moleküler markır genlerin araştırılması çalışmalarını tetiklemiştir. MLST analizleri SecY, VMP1, Stamp ve Tuf genleri gibi çeşitli housekeeping genlerin çeşitliliğinin araştırılması üzerine yapılan bir moleküler epidemiyoloji çalışmalarıdır (Murolo ve Romanazzi, 2015). Bağlarda BN fitoplazmasının genetik çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasında türe özgü *vmp1* ve *stamp* genleri ile birlikte daha az çeşitlilik gösteren *tuf* ve *secY* genlerine dayalı olarak çalışmalar yürütülmüştür (Cimerman ve ark., 2009; Fabre ve ark., 2011; Pacifico ve ark., 2009). '*Ca*.P.solani' strainlerinin VMP1 geni fragmentlerinin *RsaI*-RFLP analizleri 23 farklı kesim profili olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak '*Ca*.P.Solani' strain popülasyonları için NCBI gen bankasından elde edilen verilere göre VMP1 ve Stamp geni dizi kimliğine dayalı olarak 80 tane VMP1 (VM1-VM80) ve 46 Stamp (St1-St46) gen dizi varyantı olduğu rapor edilmiştir. Bu veriler ışığında VMP1 ve Stamp gen dizilerinin birleştirilmesiyle 49 VMP1/Stamp varyantı kullanılarak elde edilen filogenetik ağaç beş farklı kümeye ayrılmıştır (Şekil 1. 4) (Angelini ve ark., 2018).

VMP1 ve *Stamp* genlerine dayalı yeni markırları kullanan moleküler epidemiyoloji yaklaşımları Akdeniz-Avrupa iklim kuşağındaki '*Ca*.P.solani' popülasyonlarının yapısı, dinamikleri ve taşınma rotaları hakkındaki bilgi birikimine katkı sağlamıştır (Murolo ve Romanazzi, 2015). Asmalara '*Ca*.P.solani'nin *H.obsoletus* kaynaklı taşınma mekanizmasında *Vitex agnus-castus* bitkilerinin direk

epidemiyolojik rolü (Kosovac ve ark., 2016), *Reptalus panzeri*'nin '*Ca*.P.solani'yi kırmızı yaprak hastalığı olan mısırdan asmalara taşınmasındaki rolü ortaya konmuştur (Cvrković ve ark., 2014). Ayrıca '*Ca*.P.solani'nin *TufB* geninin dizi analizleri çeşitli kültür bitkilerinde üç farklı profil sergilediği ve ekolojik farklılıkların gen çeşitliliğine neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (Langer ve Maixner, 2004). Şu ana kadar '*Ca*.P.solani'nin *Tuf* genine dayalı olarak aşağıdaki gibi sıralanan üç temel doğal ekolojisi tanımlanmıştır;

1- {*Convolvulus arvensis*- *H.obsoletus*- Kültür bitkisi} sistemi Tuf-Tip-B strainleri,
2- {*Urtica dioica*- *H.obsoletus*- Kültür bitkisi} sistemi Tuf-Tip-A strainleri,
3- {*Calystegia sepium*- *H.obsoletus*-Kültür Bitkisi} sistemi ise Tuf-Tip-C strainleri.

Sadece VMP1/Stamp-4 kümesi (*Tuf*-Tip-A) ısırgan otu ile ilişkili biyolojik döngüye dahil edilirken, diğer dört küme (*Tuf*-Tip-B) tarla sarmaşığı ile ilişkili biyolojik döngüye dahil edilmiştir (Quaglino ve ark., 2016).



Şekil 1. 4. '*Ca*.P.solani' için farklı strainlerin VMP1 ve Stamp genlerinin birleştirilmesiyle elde edilen filogenetik ağaç (Angelini ve ark. (2018)'den modifiye edilmiştir).

1.4. Çalışmanın Amacı

Çalışmada Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde bulunan bağ üretim alanlarındaki yerli asma çeşitlerinde fitoplazma enfeksiyonlarının belirlenmesi, fitoplazmalara alternatif konukçuluk eden muhtemel yabancıotlar ve patojeni taşıyan olası vektörler araştırılmıştır. Ayrıca bazı asma çeşitlerinde en yaygın enfeksiyon oranına sahip olan '*Ca*.Phytoplasma solani'ye karşı oluşturulan biyokimyasal bitki tepkileri araştırılmıştır. Bununla birlikte çalışmanın spesifik amaçlarını şu şekilde sıralamak mümkündür;

1. Yerli asma çeşitlerindeki bazı hastalık belirtilerinin fitoplazmalar ile ilişkisi Nested-PCR ile incelenmiştir. Bu sayede illerdeki ve çeşitler bazındaki fitoplazma enfeksiyonu yaygınlıkları belirlenmiştir.
2. Teşhis edilen fitoplazmaların çeşitli genleri MLST analizlerine tabi tutularak popülasyonların moleküler epidemiyolojisi araştırılmış ve olası yabancıot ve kültür bitki konukçuları incelenmiştir.
3. Fitoplazma ile bulaşık bulunan bahçelerden toplanan Hemiptera takımına ait böceklerin fitoplazma taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır.
4. Özellikle Şanlıurfa ilindeki asma ile antepfıstığı bahçelerinin iç içe olması nedeniyle her iki bitkiden elde edilen fitoplazma izolatları çoklu gen karakterizasyonu ile karakterize edilmiş ve iç içe üretimin fitoplazma epidemiyolojisi ve teşhis edilen fitoplazmaların filogenetik akrabalık ilişkileri incelenmiştir.
5. Çeşit bazında en fazla/en az enfeksiyon yaygınlık oranına sahip olan asma çeşitlerinden alınan çelikler kontrollü koşullarda köklendirilmiş ve bunların "*Ca*.Phytoplasma solani" etmenine karşı göstermiş oldukları biyokimyasal tepkiler karşılaştırılarak, yaygınlık oranı ile çeşit duyarlılığı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Türkiye'de Çeşitli Bitkilerde Fitoplazmalar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Jarausch ve ark. (2000) Akdeniz ülkelerindeki sert çekirdekli meyve ağaçlarından aldıkları örneklerde fitoplazma enfeksiyonlarını araştırmışlar ve Türkiye'de ilk defa İzmirden alınan Japon eriği ağacından (*P. salicina*) "Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması" (ESFY) olarak adlandırılan fitoplazmanın varlığını rapor etmişlerdir.

Sertkaya ve ark. (2005) ülkemizde badem, kayısı ve şeftali ağaçlarını enfekte eden "Avrupa sert çekirdekli meyve sarılığı fitoplazması" (ESFY,16SrX-B) ve bir armut ağacını enfekte eden "Armut yıkım fitoplazması" nın varlığını (Pear decline: PD, 16SrX-C) ilk olarak rapor etmişlerdir.

Ulubaş Serçe ve ark. (2006) 2003-2005 yıllarında yürüttükleri sürvey çalışmalarında Antalya, Gaziantep, İçel, Isparta ve Yalova illerinde yerli kayısı çeşitlerinde "*Candidatus* Phytoplasma pronorum" ve Bursa ilinde Deveci armudu yetiştirilen ticari bahçelerde "*Candidatus* Phytoplasma pyri" enfeksiyonunu saptamışlardır. Ayrıca Japonyadan ithal edilen japon eriği, kayısı ve badem ağaçlarında da '*Candidatus* Phytoplasma pronorum' enfeksiyonlarını rapor etmişlerdir.

Sipahioglu ve ark. (2006) Türkiye'nin doğu anadolu bölgesinde sert çekirdekli meyve ağaçlarını viroid, fitoplazma ve fungal hastalıklarının araştırılmasına yönelik bir sürvey çalışması yürütmüşlerdir. Ancak toplanan örneklerden herhangi bir fitoplazma enfeksiyonunun bulunmadığını bildirmişlerdir.

Canik ve Ertunc (2007) Isparta, Yalova ve Ankara illerinde elma bahçelerinde fitoplazma enfeksiyonlarını araştırmışlardır. PCR/RFLP analizleri ile Starkrimson, Krimson, Starking, Granysmith ve Gloster elma çeşitlerinde Türkiyede ilk defa

'*Candidatus* Phytoplasma mali' enfeksiyonlarını rapor etmişlerdir. Yalova hariç diğer araştırma yapılan illerde enfeksiyon varlığını bildirmişlerdir.

Gazel ve ark. (2007) Türkiye'de önemli armut yetiştiriciliğinin yapıldığı Bursa'da armut bahçelerinde yaptıkları sürveylerde Deveci, Santa Maria, Comice and William armut çeşitlerinden alınan 116 örnekten 61 örneğin "*Candidatus* Phytoplasma pyri" ile bulaşık bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Sertkaya ve ark. (2007) "Phyllody" belirtisi gösteren susam ve pervane çiçeğinde, stolbur belirtisi gösteren biberde, yapraklarında küçülme ve sararma belirtisi gösteren patlıcanda ve *Orosius albicinctus* distant (Homoptera: Cicadellidae) yaprak piresinde 16SrVI-A grubu fitoplazma varlığını saptamışlardır. Ayrıca iri tomurcuk belirtisi (big bud) gösteren domateslerde 16SrXII-A grubu fitoplazma enfeksiyonu varlığını rapor etmişlerdir.

Gazel ve ark. (2009) '*Candidatus* Phytoplasma pronorum' ile infekteli kayısıların enfeksiyona karşı pomolojik özelliklerini inceleyen bir çalışma yürütmüşlerdir. Açmak gerekirse, 2004 ve 2007 yılları arasında verim, meyve genişliği, uzunluk, boy ve ağırlık, tohum ağırlığı, tohum/meyve oranı, çözülebilir maddeler ve asitliği içeren parametreleri değerlendirmişlerdir. Dört yıllık araştırma sonucunda enfekteli tüm örneklerin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında verim kayıplarının yaşandığını (bazı durumlarda %77'ye varan kayıplar) bildirmişlerdir. '*Candidatus* Phytoplasma pronorum' enfeksiyonunun Precoce de Tyrinthe kayısı çeşidinde pomolojik özellikleri ve verimi negatif yönde etkilediğini rapor etmişlerdir.

Özdemir ve ark. (2007) Marmara bölgesi domates yetiştirme alanlarında stolbur benzeri hastalık belirtileri gösteren domateslerde fitoplazmaları ve bunların taşınmasından sorumlu vektör ve yabancıotlar ile ilgili çalışmalar yürütmüşlerdir. Buna göre küsküt (*Cuscuta campestris*), canavar otu (*Orobanche ramose*), boru çiçeği (*Datura stramonium*), söğüt otu (*Polygonum persicaria*), yapışkan darı (*Setaria* spp.), kazayağı (*Chenopodium album*), amarantus bitkisi (*Amaranthus albus*) gibi yabancıotların hastalık taşınmasında alternatif konukçu olabileceğini ve testledikleri

22 böcek türünden *Tyhlocyba quercus* Fabricus (Hemiptera: Cicadellidae) türünün potansiyel vektör olabileceğini rapor etmişlerdir.

Çağlar ve ark. (2010) Adana, Kahramanmaraş, Sivas ve Kayseri illerinde fitoplazmalara özgü spesifik hastalık belirtileri gösteren domates ve patateslerde 16SrXII-A grubu fitoplazma enfeksiyonu varlığını rapor etmişlerdir. Ayrıca *Cicadula inornata* (Hemiptera: Cicadellidae) isimli bir hemipter böcekten de aynı fitoplazmanın tespit edilmesi üzerine bunun potansiyel fitoplazma vektörü olabileceğini bildirmişlerdir.

Çağlar ve ark. (2011) Köpek dişi ayrığında (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) buğdaylara (*Triticum* spp.) kök kaynaşması sistemi yoluyla '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' türü fitoplazmanın taşındığını deneysel olarak yürttükleri çalışmada rapor etmişlerdir.

Çağlar ve Elbeaino (2013) Türkiyede cadı süpürgesi, geriye doğru ölüm ve yaprak sararması gibi belirtiler gösteren çit bitkisi olarak yetiştirilen Kurtbağrı'nda(*Ligustrum ovalifolium* Hassk.) dünyada ilk defa keşfedilen bir fitoplazmanın varlığını rapor etmişlerdir.

Çaglayan ve ark. (2013) Türkiye'de Uşak ilinde kiraz ağaçlarında 16SrI-B grubu '*Candidatus* Phytoplasma asteris' fitoplazmasının enfeksiyon varlığını ilk kez rapor etmişlerdir. Ayrıca bahçelerde enfeksiyon oranının %40 seviyelerine çıktığını bildirmişlerdir.

Ikten ve ark. (2014) Türkiye'de susamları enfekte eden fitoplazmaların taksonomisi, etiyolojisini ve simptomatolojisini araştıran bir çalışma yürütmüşlerdir. 16SrIX-C ve 16SrII-D altgruplarına ait fitoplazmaları karakterize etmişler ve bunların susam fillodi hastalığına neden olduğunu bildirerek ve *Orosius orientalis* Matsumara yaprak pirelerinin bu fitoplazmaların taşınmasında önemli bir vektör olarak rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Gazel ve ark. (2016) Türkiye'de Aydın ilinde sararma tipi hastalık belirtileri gösteren nar ağaçlarında 16SrI-B ve 16SrXII-A grubu fitoplazmalarını teşhis etmişler karakterizasyonunu yapmışlardır. Narlarda fitoplazma enfeksiyonları Türkiye'de ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Özdemir ve Cagirgan (2015) Antalya'da susam yetiştirme alanında doğal olarak enfekteli bir mühliye bitkisinde (*Corchorus olitorius* L.) 16SrII-D ribozomal altgruba ait fitoplazma saptamışlardır. Bu çalışma ile Türkiye'de mühliye'de ilk defa '*Candidatus* Phytoplasma australasia' rapor edilmiştir.

Alp ve ark. (2016) Türkiye'de Van'da ilk defa kadife çiçeği (*Tagetes erecta* L.)'nde doğal olarak '*Candidatus* Phytoplasma solani' (16SrXII-A altgurubu) enfeksiyonunun varlığını bildirmişler ve bu bitkinin alternatif konukçu olabileceğini rapor etmişlerdir.

Ikten ve ark. (2016) 109 adet susamda ve 92 adet böcek vektörden Multiplex Real-Time qPCR deneyi ile 16SrII ve 16SrIX grubu fitoplazmaların tanılanmasına yönelik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu qPCR testinin geliştirilmesi, susam genotiplerinin fillodi fitolazma hastalığına karşı direnç seviyelerini tanımlamak için enfeksiyon yüklerinin hızlı bir şekilde ölçülmesi için bir yöntem sağladığını bildirmişlerdir.

Kaya ve ark. (2016) Türkiye'de yumuşak çekirdekli meyve üretim alanlarında pisillid vektör böceklerde fitoplazma enfeksiyonlarını araştırmışlardır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez çeşitli *Cacopsylla* spp. türlerinde '*Ca*. P. mali' enfeksiyonlarının varlığını rapor etmişler ve hastalığı taşıyan potansiyel vektörleri belirlemişlerdir.

(Usta ve ark., 2017) Van'da salatalıklarda '*Candidatus* Phytoplasma solani' ve '*Ca*. P. trifolii' enfeksiyonu saptamışlar ve türkiyede bu bitkide saptanan ilk fitoplazma enfeksiyonu olduğunu rapor etmişlerdir.

Özdemir (2017) Türkiyede susamlarda ve *Orosius orientalis* böceklerinde 16SrII, 16SrVI ve 16SrIX grubu fitoplazmaların enfeksiyon varlığını rapor etmiştir. Bu çalışma ile elde edilen verilere göre 16SrVI-A grubu fitoplazma susamlarda ve adı geçen vektör böceklerde ilk defa rapor edilmiştir.

Ustun ve ark. (2017) Türkiyede susam bitkilerini enfekte eden fitoplazmalara karşı mücadelede kullanılabilecek susam genotiplerini belirleyen bir çalışma yürütmüşlerdir. Tarla, sera ve qPCR deneyleriyle iki genotipin fitoplazmaya karşı dirençli olduğunu ilk kez rapor etmişlerdir.

Özdemir (2018), Türkiyenin güneybatısında susam üretim alanlarından toplanan *Neoaliturus haematoceps* Mulsant & Rey (Hemiptera: Cicadellidae) böceklerde 16SrII-D, 16SrVI-A ve 16SrIX-C grubu fitoplazmaları saptamış ve bu potansiyel vektörün fillodi hastalığı ile ilişkisini araştırmıştır.

Guldur ve ark. (2018) Türkiye'de Şanlıurfa ilinde antepfıstığı ağaçlarında '*Candidatus* Phytoplasma solani' ile ilişkili fitoplazmanın varlığını ilk kez rapor etmişlerdir.

Çağlar ve ark. (2019) Adana ve Kahramanmaraşta mısır üretim alanlarında fitoplazma benzeri hastalık belirtilerini araştırmış ve incelenen mısır örneklerinin *'Candidatus* Phytoplasma cynodontis' ile bulaşık olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca bulaşık bitkilerden elde edilen tohumları sera koşullarında yetiştirmiş ve yeni çıkan bitkiler ve tohumların da aynı fitoplazma ile bulaşık olduğunu bildirmiştir. Bu fitoplazmanın mısırda tohum ile taşındığını ilk kez rapor etmişlerdir.

2.2. Bağ Bitkisi ile İlişkili Fitoplazmalar

Canik ve ark. (2011) bağcılık yapılan önemli üretim bölgelerinde (Ege, İç Anadolu ve Batı Anadolu bölgeleri) yapraklarda içe doğru kıvrılma ve kızarma belirtileri gösteren asmalarda 16SrXII, 16SrIX ve 16SrI-B grubu fitoplazmaların varlığını Türkiye'de ilk kez saptamışlardır.

Ertunc ve ark. (2015) Türkiye'de önemli bağ üretim alanlarında yapmış oldukları sürvey çalışmalarında 16SrXII-A grubu ("bois noir") fitoplazmaların görülme oranını %18,33 olarak saptamışlardır. Ayrıca 16SrV,16SrI-B ve 16SrIX grubu fitoplazmaların da enfeksiyon varlığını rapor etmişlerdir. Fitoplazma enfeksiyonlarının Boğazkere, Sirfani, Tahannebi ve Emir gibi sofralık bağ çeşitleri ile karşılaştırıldığında "Alphonse Lavallée", "Chardonnay", "Shiraz", "Cabernet Sauvignon", "Alicante Bouschet", "Merlot", "Pinot Noir" ve "Sauvignon Blanc" gibi şaraplık bağ çeşitlerinde daha yaygın görüldüğünü bildirmişlerdir.

Ertunc ve ark. (2015a) Türkiye'de yerel çeşitler ile yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan bağ çeşitlerinde "bois noir" fitoplazması ile bulaşık kalemlerin çeşitli anaçlara aşılanması ile oluşturulan kombinasyonların hastalık simptom oluşumuna etkilerini incelemişledir. Yerel çeşitlerden Öküzgözü, Sultani çekirdeksiz, ve Çal karası çeşitlerinin Merlot, A. Bouchet, ve A. Lavallée çeşitleri ile aşı kombinasyonlarının tipik bois noir belirtileri gösterdiğini bildirmişlerdir. Kalecik karası, Boğazkere ve Bornova Misketi çeşitlerinin ise simptom oluşturmadıklarını ve dirençli varyeteler olduklarını bildirmişlerdir.

Bayram ve ark. (2014) Türkiye'de Doğu Anadolu, Marmara, İç Anadolu, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde 2008-2011 yılları arasında bağ üretim alanlarında fitoplazma vektörü olabilecek böcekleri araştırmak üzere sürveyler yapmışlar ve BN fitoplazmasının vektörü *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae), *Euscelis lineolatus* Brullé (Hemiptera: Cicadellidae) ve *Dictyophara europaea* L. gibi böcekler toplanmış fakat FD hastalığının vektörü olan *Scaphoides titanus* Ball. isimli hemipterin bulunmadığını bildirmişlerdir. Ancak böcek örneklerin hiç birisinin bünyesinde fitoplazma varlığına rastlanmadığını rapor etmişlerdir.

Lee ve ark. (2004) asma ve diğer ekonomik öneme sahip meyve ağaçlarında enfeksiyonlara neden olan "*Candidatus* Phytoplasma ulmi" fitoplazmasının takson adını belirlemişler ve bu türü 16SrV-A alt gruba dahil etmişlerdir.

Salehi ve ark. (2016) İran'da ilk defa asmaları enfekte eden 16SrIX-C alt grubuna dahil olan fitoplazmanın varlığını rapor etmişlerdir.

Salehi ve ark. (2014) İran'da bağ yetiştirme alanlarında enfeksiyon yapan "*Ca*. Phytoplasma solani" varlığını ilk defa rapor etmişlerdir. Bulaşık asmalardan pervane çiçeğine küsküt köprüleri kullanarak hastalığı taşımışlar ve pervane çiçeğinden tanılama yapmışlardır.

Quaglino ve ark. (2013) asma gibi kültür bitkileri ve bazı odunsu yabani bitkilerde saptanan fitoplazmanın 16SrXII grubuna dahil olan '*Ca*. Phytoplasma solani' türünü 16S rRNA, tuf, secY and rplV–rpsC gen dizilerinin filogenetik analizlerini incelemişler STOL11 (Genbank erişim kodu: AF248959) adıyla referans strain olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmadan sonra Stolbur hastalığına neden olan fitoplazmanın 16SrXII-A grubu fitoplazma olarak tanınması resmi olarak kabul edilmiştir.

Ježič ve ark. (2013) Hırvatistan'da yerel bir asma çeşidinde 16SrI grubuna dahil olan fitoplazmaların yaygın olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca aynı çeşitte 16SrIII grubuna dahil olan bir fitoplazma enfeksiyon varlığı rapor edilmiştir.

Zambon ve ark. (2018) yakın zamanda İtalya'nın kuzeyinde yürüttükleri üç yıllık bir sürvey çalışmasıyla simptomatik ve simtopmatik olmayan asmalarda ve bazı vektör böceklerde 16SrVII-A ve 16SrVI grubu fitoplazmaların varlığını rapor etmişlerdir.

Fabre ve ark. (2011) Antijenik membran proteinini kodlayan *Stamp* geninin fitoplazma strainlerinin birbirinden ayırt edilmesinde ve böcek vektörler ile ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmayla özellikle BN fitoplazmasının *Stamp* genine dayalı moleküler tiplemesi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Cimerman ve ark. (2009) *Ca*. P. solani'ye özgü olan ve görevi fitoplazma hücre yüzeyindeki transmembran proteinleri kodlamak olan *vmp1* geni ise moleküler tipleme için farklı aday bir gen olabileceği ileri sürülmüştür.

Martini ve ark. (2007) fitoplazmalar için ribozomal protein geni (RP) sistemini keşfetmişler ve bu sistemin fitoplazmaları sınıflandırmada 16s rRNA gen dizi analizleri ile karşılaştırıldığında daha iyi ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar bazı semi-üniversal fitoplazma primerleri ile *rp* genine dayalı grup-spesifik primerler tasarlamışlardır.

Pacifico ve ark. (2009) İtalya ve Fransa'dan aldıkları asmaları, yabancıotlar ve bazı vektör böceklerden elde edilen fitoplazmaların tanılanması ve genetik çeşitliliğini saptamak üzere Stolbur fitoplazmasına spesifik *stol-1H10* genini PCR ile çoğaltmışlar ve üç farklı uzunlukta bant elde etmişlerdir. Daha sonra RFLP işleminde bu bantların 12 farklı profile (V1-V12) ayrıldıklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda VMP1 geninin stolbur fitoplazması epidemiyolojisi hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir.

Weintraub ve Beanland (2006) Avrupa-Akdeniz iklim kuşağındaki bölgeler için bitki floem dokularından beslenen Cixiidae familyasındaki böceklerin Bois noir fitoplazmasının vektörü olduklarını rapor etmişlerdir.

Sforza ve ark. (1998) Fransa'da bağ üretim alanlarında BN hastalığna neden fitoplazmanın *Hyalestes obsoletus*'un neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmadan sonra *Hyalestes obsoletus* BN fitoplazmasının vektörü olarak kayıtlara geçmiş ve birçok çalışma için temel oluşturmuştur.

Dermastia ve ark., (2017) Dünyanın çeşitli bölgelerinde asmalar ve fitoplazmalar ile ilişkili hastalıkların uzun yıllara dayanan temel araştırma ve teşhis yöntemleri ile ilgili raporlarını derleyen bir kitap yazmışlardır. Bu kitapta bağ fitoplazmalarının dünya çapındaki dağılımları, taksonomileri ve konukçu asmalar ile

fitoplazmalar arasındaki etkileşimler incelenmiş ve bağlarda fitoplazma kaynaklı hastalıklar detaylı olarak incelenmiştir.

Weintraub ve Jones (2010) Fitoplazmaları, konukçu bitkilerini ve böcek vektörlerini detaylı olarak inceleyen bir kitap yazmışlardır. Konukçu-patojen-vektör ilişkilerini inceleyen bu kitapta toplam 17 bölümde fitoplazmaların tanılanması, genomik yapıları, bitki direnç durumları, vektörlerin kontrolü, fitoplazma epidemiyolojisi ve konukçuda meydana gelen biyokimyasal değişiklikler gibi önemli konular incelenmiştir.

Dickinson ve Hodgetts (2013) fitoplazmaların tanılanması, vektörlerin toplanması ve konukçu bitkilerin yetiştirilmesi, bitkiden bitkiye aşı ve küsküt ile taşınma protokolleri gibi konuları incelemiş geliştirilen protokollerin derlendiği bir kitap yazmışlardır. Ayrıca mikroskobik tanılama teknikleri ile PCR ve qPCR ile tanılama protokolleri yer almaktadır. Ayrıca toplam 34 bölümden oluşan bu kitap proteomik analizlerde kullanılmak üzere fitoplazmaların sınıflandırılması ve birbirinden ayırt edilmesinde kullanılan markır sistemlerini de içermektedir.

Rao ve ark. (2018) önemli kültür bitkilerindeki fitoplazma hastalıklarının karakterizasyonu ve epidemiyolojisilerini inceleyen bir kitap yazmışlardır. Ayrıca bu kitap kültür bitkilerini enfekte eden fitoplazmalar hakkındaki güncel bilgileri derlemektedir.

Angelini ve ark. (2018) asmaları enfekte eden fitoplazmaları, alternatif konuklularını, epidemiyolojilerini, yaşam döngülerini ve dünyadaki yayılışlarını inceleyen bir kitap bölümü yazmışlardır. Bu bölüm Rao ve ark. (2018) kitabında 5. Bölümde yer almaktadır ve bu konuda yürütülmüş güncel bilgileri derlemektedir.

Musetti ve Pagliari (2019) fitoplazmaların araştırılmasında modern teknikleri inceleyen bir protokol kitabı yazmışlardır. Bu kitapta moleküler analizler, araştırmalarda bitki materyallerinin hazırlanması ve bitki-patojen ilişkilerinin incelenmesinde yeni protokoller detaylı olarak derlenmiştir.

Bertaccini ve ark. (2019) fitoplazmaların epidemiyolojileri, bitkiden bitkiye taşınmaları ve bu patojenden kaynaklanan hastalıkların önlenmesi gibi konularda detaylı bilgiler sunan bir kitap yazmışlardır. Kitap 11 bölümden oluşmaktadır ve şu ana kadar yazılmış en güncel verileri derlemektedir.

2.3. Çoklu Lokus Dizi Analizleri ile İlgili Çalışmalar

Langer ve Maixner (2004) Almanya'da bağ üretim alanlarındaki vektör böcek, yabancıot ve asmalarda saptanan fitoplazmaları *tuf* genine dayalı PCR-RFLP analizlerine tabi tutmuşlar ve üç farklı *tuf* geni profili (*tuf* I-III) olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çeşitlilik aynı fitoplazmanın farklı konukçularda *tuf* geni bakımından farklı dizilime sahip olduğunu göstermiştir. Buna dayalı olarak Stolbur fitoplazmasının doğada üç farklı yaşam döngüsü olduğu ileri sürülmüştür. Çalışma sonucuna göre house-keeping *Tuf* genine dayalı tiplemede *Tuf-a* tipi *Urtica dioca* ile ilgili yaşam döngüsüne girerken, *Tuf-b* tipi ise *Convolvulus arvensis* ile ve *Tuf-c* tipi *Calystegia sepium* ile ilişkili yaşam döngüsünde yer aldığı saptanmıştır.

Bois noir fitoplazmasının epidemiyolojisinin araştırılmasında *tuf* genine dayalı yaklaşım oldukça ilgi görmüş ve benimsenmiştir. Bunun üzerine İtalya'da bağ üretim alanlarında saptanan Bois noir fitoplazmasının tuf I ve tuf II tipleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Baric ve Dalla via, 2007). Yine İtalya bağ üretim alanlarında yaygın bir yabancıot olan *Urtica dioica* bitkisi üzerinden toplanan vektörlerden Tuf I tiplemesi elde edilmiştir (Bressan ve ark., 2007).

Murolo ve ark. (2010) 16SrXII-A alt grubu fitoplazma strainlerinin Tuf ve VMP1 genleri üzerinden çoklu dizi analizi ile incelemişler ve asmalardaki BN fitoplazma profilleri %32'si Tuf-Tip-A, %68'i ise Tuf-Tip-B ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm otsu bitkilerden (tarla sarmaşığı, domates, tütün, biber ve kereviz) elde edilen diziler Tuf-Tip-B ile ilişkili oludğunu saptamışlardır. VMP1 açısından ise asmalardan elde edilen diziler 9 farklı profil'e ayrılırken, otsu bitkilerde 6 tip VMP1 varyantı saptanmıştır.

Aryan ve ark. (2014) Avusturya'da bağ üretim alanlarında yüksek oranda Tuf-TipB BN fitoplazmalarını saptamışlar ancak bunların Tuf geni *HpaII*-RFLP profilleri diğer tufB'lerden farklılık gösterdiğinden, Tuf-TipB2 olarak profillemesini yapmışlardır.

Plavec ve ark. (2015) Hırvatistan'da asma, yabancıot ve böcek vektörlerden elde edilen Bois noir ve Flavescence doreé fitoplazmalarını Çoklu lokus dizilim analizi (MLST) ile çoklu gen karakterizasyonu ile sınıflandırmışlardır. BN strainleri için türe özgü stamp ve vmp1 genleri ile, tuf ve secY housekeeping genlerini, FD strainleri için ise secY, map ve uvrB-degV genlerini değerlendirmişlerdir. MLST analizleri BN ve FD genotipleri için bir genetik çeşitlilik ortaya koymuştur. Bu çalışmada, MLST'nin aynı fitoplazma türüne ait genotiplerin çeşitliliği ve yaygınlığı hakkında bilgi edinmek için yararlı ve bilgilendirici bir araç olduğunu kanıtlanmıştır. Ayrıca, sonuçlar Hırvatistan'daki Asma sarılığı (Grapevine yellows; GY) hastalığı epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve açıklığa kavuşturulmasında olumlu bir katkı sunmaktadır.

Arnaud ve ark. (2007) bazı Avrupa ülkelerinde bağ üretim alanlarındaki FD fitoplazmasının çoklu gen karakterizasyonuna (MLST) göre analiz etmişler ve FD fitoplazmasının genetik çeşitliliği ve hastalığa neden olan alt gruplarının epidemiyolojisi hakkında detaylı bilgiler elde etmişlerdir.

Delić ve ark. (2016) Bosna Hersek'te bağ üretim alanlarındaki '*Ca*. P. Solani' strainlerinin *VMP1* ve *Stamp* genleri üzerine yürüttükleri genetik çeşitliliği belirleme çalışmasında izolatların V17, V14 ve V4 profillerini sergilediklerini bildirmişlerdir. Buna göre hangi vektör ve yabancıotlardan geçerek bağları enfekte ettiği konusunda, patojenin biyolojisi hakkında bilgiler elde etmişlerdir.

Sharon ve ark. (2015) İsrail'de bağ üretim alanlarındaki BN fitoplazmasının vektör-patojen-bitki ekosisteminde *Tuf* genine dayalı olarak incelemişlerdir. *Vitex agnus-castus* yabancıotlarının asmaları enfekte eden BN fitoplazmasıyla alakasız bir konukçu olduğunu bildirmişlerdir. Bulaşık bağların etrafında hiçbir yabancıot

bulunmadığında bile vektör *H.obsoletus*'un fitoplazmayı direk asmalardan aldığını ve yine asmalara taşıyabildiğini rapor etmişlerdir.

Kosovac ve ark. (2016) Karadağ bölgesi bağ üretim alanlarında bulunan çeşitli yabancıotlardan elde ettikleri BN fitoplazmalarını *VMP1, Stamp* ve *Tuf* genlerine dayalı olarak çoklu gen karakterizasyonuna tabi tutmuşlardır. Ayrıca Sharon ve ark. (2015)'in aksine, *Vitex agnus-castus* yabancıotlarının deneysel olarak BN fitoplazmasına konukçuluk edebileceğini yürüttükleri labotatuvar çalışmasında ıspatlamışlardır. Yani yürttükleri çalışmada, BN fitoplazmasının epidemiyolojik döngüsü için *V.agnus-castus'*un önemli bir rezervuar konukçu bitki olarak tanımlanmıştır.

Cvrković ve ark. (2014) *Reptalus panzeri* ve *Reptalus quinquecostatus* yaprak pirelerinin BN fitoplazmasının vektörü olup olmayacağına dair taşıma çalışmaları yürütmüşlerdir. BN infekteli asmalardan ve Mısırlarda kırmızı yaprak hastalığı ile enfekteli bitkilerden toplanan bu yaprak pirelerini VMP1/Tuf/SecY/Stamp genlerine dayalı olarak moleküler karakterizasyonunu yapmışlar ve BN fitoplazmasının aynı profillerini elde etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *R.panzeri*'nin BN fitoplazmasının vektörü olduğunu bildirmişlerdir.

Kostadinovska ve ark. (2014) Makedonya bağ üretim alanlarında saptadıkları 18 BN fitoplazmasını *16SrRNA, Tuf, VMP1* ve *Stamp* genleri üzerinden çoklu gen analizleri ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda bir 16Sr profili (16SrXII-A), iki Tuf (tuf-a ve tuf-b), beş VMP1 (V2-TA, V3, V4, V14, V18) ve üç farklı Stamp profili (S1, S2 ve S3) elde etmişlerdir. Bu çalışma ile Makedonya bağ üretim alanlarındaki BN fitoplazmalarının farklı ekolojik döngüleri içerdiklerini rapor etmişlerdir.

Atanasova ve ark. (2015) Makedonya bağ üretim alanlarında saptanan 91 BN fitoplazması izolatının moleküler epidemiyolojisi (Patojen-konukçu-vektör) ve genetik çeşitliliğini araştırmaya yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. *VMP1, Stamp* ve *Tuf* genlerine dayalı olarak yürüttükleri bu çalışmada üç farklı *Tuf*, beş *VMP1* ve 11

Stamp profili tanılamışlardır. En yüksek genetik çeşitliliğin *U.dioica* ile ilişkili *H.obsoletus* bireylerinden elde etmişlerdir.

Quaglino ve ark. (2016) Gürcistan'da bağ üretim alanlarından elde ettikleri Bois Noir fitoplazma strainleri ile tüm dünyadaki farklı BN strain'inlerinin *VMP1* ve *Stamp* gen dizilerini birleştirerek VMP1/Stamp profiline göre beş farklı gruba ayrıldığını saptamışlardır. Yalnızca VMP1/Stamp-4 kümesi ısırgan otu (*Urtica dioica*) ile ilişkili ilişkili yaşam döngüsünde yer aldığını ortaya koymuşlardır. Bu gruptaki strainler aynı zamanda Tuf-tip A profili sergilediği ortaya konulmuştur. Diğer dört VMP1/Stamp kümesi ise Tuf-tip B'de yer almakta ve tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) ile ilişkili yaşam döngüsünde yer aldığını rapor etmişlerdir.

2.4. Fitoplazma-Konukçu Etkileşimleri Üzerine Yürütülmüş Çalışmalar

Bilindiği üzere patojenler ile enfekte ettikleri konukçu bitkiler arasında birtakım etkileşimler gerçekleşmektedir (Spoel ve Dong, 2012). Bitkiler çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıklarında yerlerini değiştiremedikleri veya aktif tepki veremedikleri için bazı metabolik faaliyetlerini değiştirerek bu stres faktörlerine karşı koymaktadırlar. Sadece bitkiler değil, tüm organizmalarda normal metabolik olayların işleyişi sırasında veya çeşitli stres faktörlerinin (Patojen, kuraklık, sıcaklık, tuz stresi, ağır metal stresi vb.) etkisiyle hücrelerde serbest radikaller meydana gelmektedir (Dikilitas ve ark., 2019). Ayrıca bitkiler stres faktörlerince oluşacak potansiyel zararları tolere edebilmek adına metabolik faaliyetlerini değiştirebilmektedirler.

Bitkilerde fitoplazma enfeksiyonlarından sonra hastalık belirtilerinin ortaya çıkması, floem dokularındaki kalburlu borular ve plasmadesmatada oluşan kalloz birikimi, kloroplastlarda nişasta birikimi ve floem dokularındaki nekrozların oluşumu gibi hücresel modifikasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Musetti ve ark., 2010). Fitoplazma kaynaklı hastalıların araştırılmasında birçok bitki türü üzerinde yapılan histolojik çalışmalar, saptanabilir ilk anatomik değişikliğin, kalbur borularının plakaları üzerinde anormal bir kalloz birikimi olduğunu, ardından bu elementlerin ve eşlik eden hücre ölümlerinin olduğunu göstermiştir. Konukçunun duyarlılık durumuna

göre floem dokusunun küçük veya büyük bir bölümünda nekrozlar oluşmaktadır. Dokulardaki kalloz birikimi bitki dokusunun patojene veya bir yaraya karşı verdiği spesifik olmayan bir tepki olarak bilinmektedir (Musetti ve ark., 2010). Elmalarda elma çoklu sürgün fitoplazmasının konukçu floem dokusunda kalsiyum miktarının azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Musetti ve ark., 2013).

Lepka ve ark. (1999) *Nicotiana tabacum* (tütün) ve *Catharanthus roseus* L. (pervane çiçeği) örneklerinde fitoplazma enfeksiyonu sonucu karbonhidrat konrantrasyonu ve taşınması ile ilişkisini araştırmışlardır. Buna göre, *C. roseus* ve *N. tabacum*'un fotosentez yapan yapraklarında enfeksiyon, çoğunlukla çözünür karbonhidratlarda ve nişastada belirgin bir artışa yol açmıştır. *C. roseus*'un depo yapraklarında fitoplazmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar, şekerde belirgin bir azalmaya yol açarken, nişasta düzeyleri ya çok az etkilenmiş ya da hiç etkilenmemiştir. Tütün depo yapraklarında şekerler büyük ölçüde değişmeden kalırken, AP fitoplazması ile enfeksiyondan sonra nişasta artmıştır.

Maust ve ark. (2003) Meksika'da hindistan cevizi ağaçlarında Lethal yellowing fitoplazmasının metabolik etkilerini araştırmışlardır. Buna göre yapraklarda fotosentetik pigmentlerin azalması ve köklerdeki karbonhidrat miktarlarının azalmasına rağmen yapraklardaki karbonhidrat birikiminin artması floem dokusundaki stres ile ilişkili şeker taşınmasının engellenmesiyle açıklanmıştır.

Junqueira ve ark. (2004) mısırlarda "Maize bushy stunt" fitoplazmasının biyokimyasal etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada fitoplazmaya dayanıklı ve duyarlı mısır çeşitlerindeki fitoplazma enfeksiyonunun protein içerikleri, fenolik bileşikler, klorofil pigmentlerindeki değişiklikler ve şeker içerikleri karşılaştırılmıştır. Enfekteli bitkilerde protein, şeker ve fenolik bileşiklerin miktarının artması ile fitoplazma enfeksiyonunun konukçu metabolizmasına etki ettiği bildirilmiş ve klorofil pigmentlerindeki azalmanın ise fitoplazmanın fotosenteze etki ederek bitkinin erken yaşlanmasına neden olduğu rapor edilmiştir.

Jagoueix-Eveillard ve ark. (2001) *Catharanthus roseus*'larda enfeksiyon oluşturan farklı fitoplazma türlerinin bitkide şeker taşınmasında görev yapan *transketolase* geninin aşağı regülasyonuna neden olduğunu saptamışlardır. Bu genin sentezinin baskılanması fotosentezi de etkilediği ve dolayısıyla konukçuda sararma tipi belirtilerin bundan kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Machenaud ve ark. (2007) stolbur fitoplazmasıyla enfekteli domates ve *Catharanthus roseus*'larda şekerin parçalanmasında görev yapan enzim aktivitelerinin gen ekspresyonundan daha öncelikli olduğunu araştırmışlar ve neutral invertase'ın fitoplazma gelişimine katkı sağladığı hipotezini ortaya atmışlardır.

Bertamini ve ark. (2002) BN fitoplazmasının asmalarda fotosentetik pigmentlere etkisini, çözünür proteinleri ve fotosentetik aktivitelere olan etkilerini araştırmışlardır. Buna göre enfekteli bitkilerde toplam klorofil ve karetenoid seviyelerinde ciddi azalmaların olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer azalmaların protein içeriklerinde ve bazı enzimatik aktivitelerde de olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, klorofil içeriklerindeki azalmaların bitki yapraklarındaki sararma simptomlarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Rusjan ve ark. (2012a) BN fitoplazmasına duyarlı olan bir asma çeşidinde fitoplazmanın klorofil ve karetenoid içeriklerine, fenolik bileşiklerin seviyesine ve ilişkili enzim aktivitelerine etkilerini araştırmışlardır. Fitoplazma enfeksiyonu sırasında yapraklarda klorofil ve karetenoid seviyelerindeki düşüşün oksidatif stresi tetiklediği ve duyarlılığı arttırdığını belirlemişlerdir. Bu çalışmayla fitoplazma ile enfekteli asma'da biyokimyasal ve fotosentetik pigmentlerin durumunun konukçu metabolizmasına olan etkileri arştırılmıştır.

Rusjan ve ark. (2012b) BN fitoplazmasının asmalarda fenolik ve flavonoid içeriklerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre BN hastalğının meyve gelişimi ve bitki büyümesine olan etkileri ile bitkide meydana gelen bazı biyokimyasal reaksiyonlara etkileri araştırılmıştır.

Rusjan ve Mikulic-Petkovsek (2015) asmalarda fitoplazma enfeksiyonunun fenolik bileşiklere olan etkileri ve lignifikasyona olan etkileri araştırılmıştır. Buna göre enfeksiyon esnasında sürgünlerdeki lignifikasyonun tamamlanamaması sonucu hastalık belirtisi oluşumu ile ilişkiler araştırılmıştır.

Prezelj ve ark. (2016) asmalarda FD fitoplazmasının doğal koşullarda neden olduğu enfeksiyonun bitkide neden olduğu metabolik faaliyetleri araştırmışlardır. Ayrıca FD enfeksiyonunun bitkide floem taşınma sistemini olumsuz etkileyerek dokulardaki karbonhidrat dağılımının başararılı bir şekilde gerçekleştiremediğini rapor etmişlerdir.

Romanazzi ve ark. (2013) BN fitoplazması ile enfekteli asmalara beş farklı elicitor'ün bitkide direnç uyarıcı etkilerini ve meyve kalitesine olan etkilerini araştırmışladır. Yürüttükleri deneyde fitoplazmaya duyarlı olan asma çeşidinin duyarlılığının arttığını ve bitkide simptom iyileşmesine gittiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma dört aşamadan oluşmuştur. Çalışmanın aşamaları aşağıdaki şekilde sıralanmıştır;

I) Örneklerin toplanması (asma, antepfıstığı, yabancıotlar ve böcekler),

II) Toplanan örneklerde fitoplazma varlığının üniversal olarak tespit edilmesi,

III) Üniversal olarak tespit edilen fitoplazmaların tür teşhisleri ve genetik karakterizasyonları,

IV) Patojenin en yaygın olan türünün tespiti ile asma çeşidi bakımından tarla koşullarında en çok enfekteli bulunan çeşitlerdeki savunma tepkilerinin araştırılması.

İlk aşama bağ üretim alanlarında fitoplazma kaynaklı hastalık belirtileri gösteren örneklerin toplanması şeklinde gerçekleşmiştir. Bağların yanı sıra, herhangi bir fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanan bitkilerin bulunduğu bahçelerden patojenin yayılmasında rol oynayan yabancıot/böceklerin araştırılması/tespit edilmesi amacıyla fitoplazma ile hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen asmalardan çeşitlere göre yeniden örnekler toplanmış ve tarla içinde/kenarında bulunan yabancıotlar ile böcekler toplanmıştır.

İkinci aşamada toplanan örneklerde fitoplazma varlığı *16SrRNA* korunmuş gen bölgesine dayalı olarak üniversal Nested-PCR primerleri ile saptanmıştır. Ayrıca Nested-PCR'da negatif sonuç veren örnekler M1/M2 iç primerleri ile ikinci defa Nested-PCR'a tabi tutulmuş veya Real Time PCR ile yeniden testlemeler yapılmıştır.

Üçüncü aşamada üniversal olarak saptanan fitoplazmaların genetik karakterizasyonu yapılarak ait oldukları 16Sr gruplar belirlenmiş ve yaygın olan BN fitoplazmasının çoklu lokus dizilim analizleri ile moleküler epidemiyolojileri araştırılmıştır.

Son aşamada ise, Şanlıurfa ilinde yürütülen sürvey çalışmalarında BN fitoplazması ile en fazla enfekteli saptanan asma çeşidi belirlenmiş ve bu çeşidin saptanan fitoplazmaya karşı oluşturduğu biyokimyasal tepkiler araştırılmıştır.

3.1. Materyaller

3.1.1. Araştırmanın Yürütüldüğü Yer ve Bitkisel materyaller

Bu çalışma Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Laboratuvarları, iklimlendirme odası ve bölüm cam serasında yürütülmüştür. Tarlalardan hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen toplamda 214 (185 asma ve antepfıstığı + 29 yabancıot) bitki örneği (Çizelge 3. 1) kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyalin bölgelere göre dağılımı

Örneğin alındığı bölge (Köy, ilçe İl)	**Asma örnek sayısı**	**Antepfıstığı örnek sayısı**	**Yabancıotlar**
Akziyaret, Karaköprü, Şanlıurfa	14	8	*Convolvulus arvensis* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Amaranthus blitoides* L.
Hamurkesen, Karaköprü, Şanlıurfa	9	6	*Convolvulus arvensis* L., *Physalis* spp.
Külaflı, Karaköprü, Şanlıurfa	12	3	*Prosopis farcta* (Banks & Sol.) J.F.Mac. *Portulaca. Oleracea* L.
Karaca, Bozova Şanlıurfa	15	3	*Convolvulus arvensis* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Amaranthus blitoides* L., *Trifolium repens* L.
Boztepe, Bozova, Şanlıurfa	11	2	*Solanum nigrum* L.
Budaklı, Bozova, Şanlıurfa	9	2	-
Ortayol, Halfeti, Şanlıurfa	4	8	*Convolvulus arvensis* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Amaranthus blitoides* L.
Seldek, Halfeti, Şanlıurfa	6	5	*Convolvulus arvensis* L., *Amaranthus blitoides* L. *Sorghum halepense* L.
Ovacık, Halfeti, Şanlıurfa	7	8	*Convolvulus arvensis* L., *Amaranthus blitoides* L.
Bozova, Şanlıurfa	8	3	*Convolvulus arvensis* L., *Amaranthus blitoides* L.
Merkez, Adıyaman	18	-	
Besni, Adıyaman	24	-	
TOPLAM	**137**	**48**	**29**

Araştırmanın bitkisel materyallerini Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde yerli asma çeşitleri ile bağ üretim alanlarında bulunan antepfıstığı ağaçlarından toplanan yaprak ve sürgünler ile, tarla içinde veya yakın çevresinde bulunan yabancıotlar oluşturmuştur.

Bitkisel materyalleri asmaların yaprakları ve yaprak sapları (*Vitis vinifera* L.), antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının yaprakları, tarla sarmaşığı (*Convolvulus* spp.) örneklerinin yaprakları ve gövdesi, Sürünücü horoz ibiğinin (*Amaranthus blitoides* L.) yaprak ve gövdesi, Fenerotu (*Physalis* spp.)'nun yaprak ve gövdesi, Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.)'ın yaprak ve gövdesi, Kanyaş (*Sorghum halepense* L.)'ın yaprak ve gövdesi, Semizotu (*Portulaca. Oleracea* L.)'nun yaprak ve gövdesi, Ak üçgül (*Trifolium repens* L.)'ün yaprak ve gövdesi, Köpek üzümü (*Solanum nigrum* L.)'nün yaprak ve gövdesi, çediotunun (*Prosopis farcta*) yaprakları oluşturmuştur.

Asmaların çeşitlere göre toplanan örnek sayıları ve bazı çeşit özellikleri Çizelge 3. 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2. Asmalardan çeşit bazında alınan örnek sayısı ve bazı çeşit özellikleri

Çeşit adı	**Erkencilik durumu**	**Üzüm çeşit rengi**	**Değerlendirme şekli**	**Toplanan örnek sayısı**
Yediveren (ariş)	Orta-erkenci	Kırmızı-mor	Sofralık	13
Çiloreş (Adıyaman'daki yerel ismi: Kızlar Tahtası)	Geççi	Yeşil-sarı	Sofralık	50
Hönüsü	Geççi	Kırmızı-siyah	Sofralık	71
Tanımlanamayan çeşitler	-	-	-	3
TOPLAM				137

Bitkisel materyallerin üretim alanından Bitki Koruma Bölüm laboratuvarına getirilmesinde ve depolanmasında polietilen plastik torbalar kullanılmıştır.

Fitoplazmaların asma çeliklerinden sağlıklı *Catharanthus roseus* L.'a (1:1:1 oranında Torf:perlit:toprak'ta yetiştirilen) taşınmasında küsküt (*Cuscuta* spp.) kullanılmıştır.

3.1.1.1. DAS-ELISA Testlerinde Kullanılan Materyaller

Serolojik testlemelerde, Bioreba AG firmasının çeşitli antiserumları, pozitif ve negatif kontrolleri, ekstraksiyon tamponları, kaplama tamponları, substrat ve yıkama tamponları ile ELISA pleytlerini içeren GFLV, GLRaV-1+3, GLRaV-2, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 ticari DAS-ELISA tam kitleri kullanılmıştır.

3.1.2. Çelik köklendirme materyalleri

Fitoplazma ile enfekteli olduğu Nested-PCR ile saptanan ve Fanleaf ve Leafroll virüslerine karşı DAS-Elisa testinde negatif sonuç veren yaklaşık 8 yaşındaki bir Hönüsü çeşidi asma çeşidinden sonbahar döneminde 2-3 gözlü çelikler alınmış ve köklendirme çalışmalarının bitkisel materyalini oluşturmuştur. Alınan çeliklerin köklendirilmesinde IBA hormonu, torf, perlit, toprak kullanılmıştır.

3.1.3. Böcek toplanmasında kullanılan materyaller

Böceklerin toplanmasında atrap, emgi şişesi ve japon şemsiyesi kullanılmıştır. Toplanan böceklerin depolanmasında ve taşınmasında 50ml'lik falcon tüpler (İsolab) ve %96'lık etanol (Merck) kullanılmıştır. Böceklerin cinsiyet ayrımı için plastik petri kapları ve binoküler kullanılmıştır. Böceklerin uzun süreli depolanması için -20C°'lik derin dondurucu kullanılmıştır (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1. Fitoplazma ile enfekteli bir asma'dan atrap ile böcek örneklemesi yapılması (solda), atrap içindeki emici böcekleri yakalayan emgi şişesi (sağda)

3.1.4. Toplam Nükleik Asit İzolasyonunda Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar

DNA izolasyonları için kullanılan malzemeler şu şekildedir; Ekstraksiyon poşeti (12x15mm Bioreba®), El tipi homojenizatör (Bioreba®), dijital kuru banyo (Biorad®), soğutmalı santrifüj cihazı (Eppendorf), vorteks cihazı, kapaklı santrifüj tüpleri (1.5-2ml), otomatik pipetler (Brand®), pipet uçları, Cam şişeler, Bitki DNA izolasyon kiti (Qiagen DNAeasy plant mini kit®), derin dondurucu, buz makinası, nitril eldivenlerdir. İzolasyonu yapılan nükleik asitlerin kalitesi ve miktarlarının ölçümleri spektrofotometre (Act-Gene UVS99) ile yapılmıştır. CTAB tampon çözelti pH'sı Hanna edge pH metre ile ölçülmüştür. TNA izolasyonu için bitki dokuları hassas terazi tartılarak analize başlanmıştır. Buffer hazırlanırken ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.5. Nested-PCR ve RFLP Çalışmalarında Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar

Toplam nükleik asit izolasyonu çalışmalarında elde edilen farklı izolatlara ait nükleik asitler çoğaltılması istenilen hedef bölgenin kalıp DNA'sını oluşturmuştur. Direct-PCR ürünlerinin uygun miktarlarda su ile seyretilmiş konsantrasyonları ise Nested-PCR için kalıp DNA'yı oluşturmuştur.

PCR analizleri için çeşitli taq polimerazlar ve tampon çözeltileri (GoTaq Promega, DreamTaq Thermo, Pfu Polymerase Thermo), dNTP setleri (Thermo), primer çiftleri (Sentegen ve IDT firmalarından temin edilmiştir), nükleaz içermeyen PCR suyu (Thermo), 0.2ml'lik santrifüj tüpleri (Thermo), mikropipet seti (Brand), PCR cihazı (Applied Biosystems, Veriti thermal cycler), Stolbur fitoplazma pozitif ve negatif kontroller (Loewe) gibi materyaller kullanılmıştır.

PCR ve Nested PCR analizlerinde kullanılan primerlerin isimleri, baz dizileri, özellikleri alındığı kaynaklar Çizelge 3. 3'te detaylı olarak gösterilmiştir.

PCR ürünlerinin görüntülenmesinde Biorad marka wide-midi jel elektroforez sistemi, agaroz (Sigma), mikrodalga fırın, 1kb, 100bp ve phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Markırlar (Thermo), TAE running buffer (Thermo), Etidyum bromid (Sigma), Masaüstü UV transilluminatör (Daihan) gibi materyaller kullanılmıştır.

In silico RFLP çalışmalarında restrüksiyon endonükleaz enzimleri olarak *Rsa*I, *SspI*, *Taq*I, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Alu*I, *Bam*HI, *Dra*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Sau3*AI (*Mbo*I), *Hpa*II, *Kpn*I, *Mse*I kullanılırken, laboratuvar RFLP işlemlerinde kısıtlı imkanlardan dolayı *Rsa*I, *Taq*I, *Hpa*I, *Eco*RI, *Hae*III enzimleri kullanılabilmiştir.

Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan Primerlerin isimleri, baz dizileri, çoğalttığı gen özellikleri ve baz uzunlukları ve kaynakları

Primer adı	**Grup/ Spesifik**	**Oligo Dizisi 5' -3'**	**Amplikon (yaklaşık)**	**Kaynak**
P1 P7	Universal Direct	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1783 bp	(Deng ve Hiruki, 1991; Schneider ve Seemüller, 1994)
R16F1 R16R0	Universal Direct PCR	AAGACGAGGATAACAGTTGG GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC	1371 bp	(Davis ve Lee, 1993) (Lee ve ark., 1993)
R16F2n R16R2	Universal Nested	GAAACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1244 bp	(Gundersen ve Lee, 1996) (Lee ve ark., 1993)
R16(I)F1 R16(I)R1	16srI, II, XII, XV	TAAAAGACCTAGCAATAGG CAATCCGAACTAAGACTGT	1050 bp	(Lee ve ark., 1995)
R16(V)F1 R16(V)R1	16srV	TTAAAAGACCTTCTTCGG TTCAATCCGTACTGAGACTACC	1102 bp	(Lee ve ark., 1995)
M1 M2	Universal Nested	GTCTTTACTGACGCTGAGGC CTTCAGCTACCCTTTGTAAC	511 bp	(Gibb ve ark., 1995)
H10F1 H10R1	VMP1 (XII-A)	AGGTTGTAAAATCTTTTATGTG GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC	1900 bp	(Cimerman ve ark., 2009)
TYPH10F TYPH10R	VMP1 (XII-A)	AACGTTCATCAACAATCAGTC CACTTCTTTCAGGCAACTTC	1450 bp	(Fialová ve ark., 2009)
Ftuf1 Rtuf1	*Tuf* (XII-A)	CACATTGACCACGGTAAAAC CCACCTTCACGAATAGAGAAC	1038 bp	(Schneider ve ark., 1997)
FtufAY RtufAY	*Tuf* (XII-A)	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA CGTTGTCACCTGGCATTACC	940 bp	(Schneider ve ark., 1997)
PosecF1 PosecR1	*SecY*	TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT ATTAGTAAACTAGTTCC	1052 bp	(Fialová ve ark., 2009)
PosecF3 PosecR3	*SecY*	GGATTGATAGATGCTGCCC GCCCCTATAACGGTGATTTTG	998 bp	(Fialová ve ark., 2009)

3.1.6. Real-Time PCR analizlerinde kullanılan materyaller

Real-Time PCR analizlerinde Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü laboratuvarında bulunan qPCR (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System) cihazı kullanılmıştır. TaqMan Universal PCR Master Mix (Ayrıca kullanılan primerler ve prob bilgisi Çizelge 3. 4'te belirtilmiştir. qPCR işlemi sadece sınırlı sayıda antepfıstığı bitkisi ve asma için kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4. qPCR'da kullanılan primerler ve prob özellikleri

Primer ve Prob	Fitoplazmaya özgü 16Sr DNA için dizi (5'-3')	Kaynak
Forward primer	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	(Christensen ve ark., 2004)
Prob FAM-TAMRA	TGACGGGACTCCGCACAAGCG	
Reverse primer	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA	

3.1.7. Biyoinformatik Analizlerde Kullanılan Program ve Yazılımlar

PCR ürünü olarak elde edilen DNA dizilerini diğer dünya izolatlarıyla karşılaştırmak ve benzerlikleri belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan biyolojik veritabanı NCBI web sitesindeki Blastn programı kullanılmıştır (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Dizilerin hizalanmasında ve forward-reverse dizi okumalarının birleştirilmesinde BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) ve MEGA7 (https://www.megasoftware.net/) programları kullanışmıştır. Ayrıca Consensus dizilerin oluşturulmasında FinchTV (https://digitalworldbiology.com/FinchTV) ve Chromas (Technelysium Pty Ltd; http://www.technelysium.com.http://au/chromas.html). programları kullanılmıştır.

Filogenetik ağaçların oluşturulmasında MEGA7 ve MEGAX programları kullanılmıştır. Ayrıca Virtual Jel görüntüleri için pDRAW32 (https://www.acaclone.com/) ve Genomecompiler (http://www.genomecompiler.com/) programından faydalanılmıştır. *In silico* jel görüntülerinin oluşturulması ve benzerlik co-efficient analizleri için *i*PhyClassfier

programı (https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi) online olarak kullanılmıştır (Zhao ve ark., 2009c).

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

3.2.1.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması

Örnekleme işlemi çalışmanın en önemli aşamasını oluşturmaktadır. Örnekleme stratejisi oldukça iyi planlanmış ve teşhis için en uygun adımlar seçilmiştir. Çalışmanın bitkisel materyalini Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde aşılı veya aşısız yerli asma çeşitleriyle kurulmuş bağ üretim alanlarında bulunan asma, antepfıstığı ve çeşitli yabancıotlar oluşturmuştur. Öncelikli olarak asmaların yaprak, sürgün, gövde ve salkımlarında hastalık benzeri belirtiler aranmıştır. Literatürden ve ön çalışmalardan elde edilen verilere göre en uygun örneklemeler zamanı yaz aylarında hastalık belirtilerinin en belirgin olduğu zamanlarda yapılmıştır (Gibb ve ark., 1999; Prezelj ve ark., 2013). Asma ve antepfıstığı ağaçlarının aynı üretim alanında bulunduğu tarlalardan örnekler ayrıca toplanmıştır. Örneklemeler hastalık belirtilerinin tarla koşullarındaki yaygınlık durumuna bağlı olarak güdümlü (hastalık belirtisi gösteren ve/veya göstermeyen bitkilerden) veya tesadüfi olarak toplanmıştır. Asma ve antepfıstığı yaprak örnekleri alınırken, patojenin bitki floem dokusundaki heterojen dağılımı göz önünde bulundurularak, yaprak örnekleri bitkinin dört bir tarafından ve alt/üst aksamlarından olacak şekilde alınmıştır ve EPPO standartlarına alınan bu yapraklar göre bir bitki için bir örneği temsil etmiştir. Üretim alanlarında Temmuz-Eylül ayları arasında toplanan yaprak ve sürgün örnekleri polietilen plastik torbalar içerisine konularak, örneklerin alındığı bölge, tarih ve varsa hastalık belirtisi yazılarak soğuk ortamda laboratuvara getirilmiştir. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarı'nda derin dondurucu ve buzdolaplarında (+4 °C ve -20 °C) depolanmıştır.

3.2.1.2. BöceklerinToplanması

Bağ üretim alanlarında özellikle fitoplazma ile pozitif olduğu Nested-PCR ile saptanan asmalardan beslenen Hemiptera takımına ait olan böcekler atrap sallama ve emgi şişesi yardımıyla toplanmıştır. %70'lik etanol içeren 50ml'lik falcon tüpler içinde uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve tanılama analizleri yapılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucularda depolanmıştır.

Dişi ve erkek böcekler birbirinden ayrılarak ayrı ayrı alınmış ve %70'lık etanol içerisinde test yapılıncaya kadar derin dondurucularda muhafaza edilmiştir. Böcek tür teşhisinde uzman entomologlardan yardım alınmıştır. Emici böcek türlerinin teşhisinde entomolog Dr. Çetin Mutlu ve diğer uzman entomologlardan yardım alınmıştır.

3.2.1.3. Çeliklerin Toplanması ve Köklendirilmesi

Fitoplazma ile bulaşık veya bulaşık olmayan asmalardan Nested-PCR/RFLP analizleri ile 10 tanesi yaz aylarında işaretlenmiş ve bu bitkilerden sonbahar aylarında iki gözlü çapları eşit kalınlıkta çelikler alınmış ve uyur (dormant) çeliklerin soğuklanma ihtiyaçlarının karşılanması için torf karışımında +4°C 'de 30-40 gün süre ile muhafaza edilmiştir. Çelikler daha sonra sera koşullarında köklendirme ortamına aktarılmıştır. IBA (4000 ppm) ile torf:perlit karışımı içinde uygun koşullarda köklendirme yapılmış ve çelikler bireysel olarak, saksılara alınmıştır (saksılarda Torf:Perlit:Kumlu toprak, 1:1:1 oranlarında kullanılmıştır). Saksılar Bitki Koruma Bölümü cam serasında uygun iklim ve ışıklandırma koşullarında tutulmuştur. 25±1°C sıcaklık ve %65-75 oransal nem koşullarındaki cam serada 16 saat aydınlık :8 saat karanlık fotoperiyodunda büyümeye bırakılmıştır. Deneme boyunca, su ihtiyacı çeşme suyu ile karşılanmış ve gerekli koşullarda tüm bitkilere eşit oranlarda ve tavsiye edilen miktarlarda fungisit uygulaması dışında herhangi bir bakım işlemi yapılmamıştır. Çeliklerin toplanması ve köklendirilmesi ile ilgili detaylar Şekil 3. 2'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2. Çeliklerin toplanması ve köklendirilmesi. A: Doğal enfekteli anaçtan çelik alınması, B: toplanan çeliklerin köklendirme ortamına alınması, C: Köklenen çelikler, D: İlk hastalık belirtilerinin gözlenmesi

3.2.1.4. DAS-ELISA Testleri

DAS-ELISA yöntemi üretici firmanın (Bioreba) talimatları doğrultusunda ve önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre sonuçların değerlendirilmesinde (Clark ve Adams, 1977) yöntemi esas alınmıştır. ELISA plakalarındaki her bir çukura 50 µl 3M NaOH eklenerek reaksiyon durdurulup sonuçlar çıplak gözle kontrol edilmiş ve 405 nm dalga boyunda ELISA Reader kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda negatif kontrol absorbans değerinin iki katı ve üzerine ulaşan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Patojenin Küsküt köprüleri vasıtasıyla *Catharanthus roseus* L. Bitkilerine Taşınması

Doğal olarak enfekteli bitkilerden *Catharanthus roseus*'a (pervane çiçeği) küsküt köprüleri kullanılarak fitoplazma taşınması yapılmıştır. Küsküt bitkisi tam parazit bir bitkidir ve botaniksel özellikleri birbirinden farklı olan otsu ve odunsu bitkiler arasında patojen taşınmasında kullanılmaktadır (Přibylová ve Špak, 2013). Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarından temin edilen sağlıklı küsküt tohumları çimlendirilmiş ve pervane çiçeği üzerine bırakılmış ve parazitlik gerçekleştikten sonra küskütlerden tohumlar alınmış ve taşıma çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3. 3).

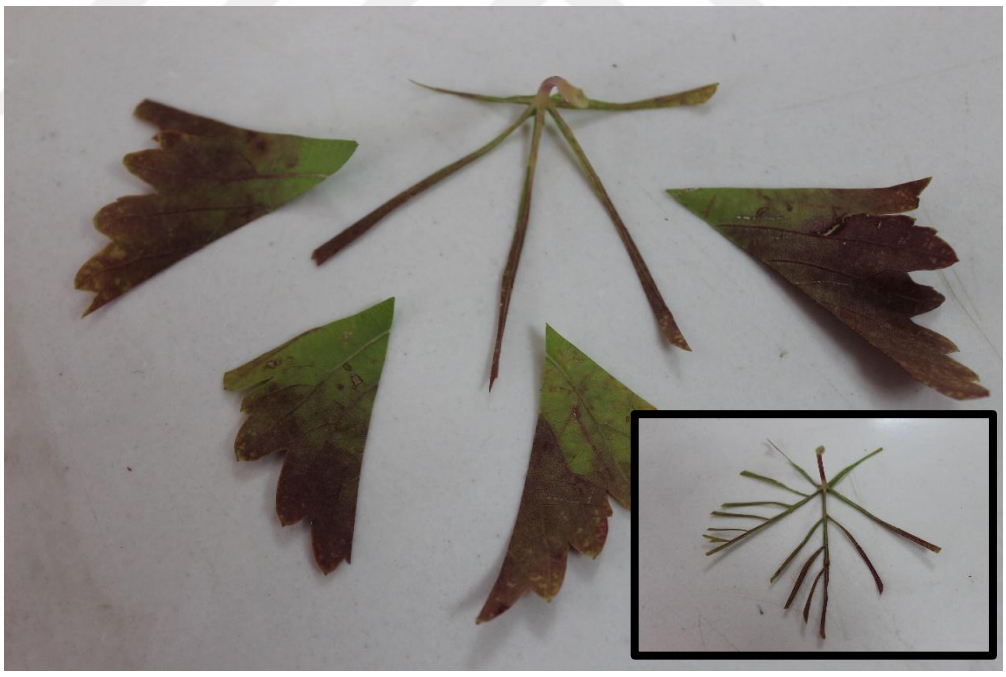


Şekil 3. 3. Küsküt köprüleri ile konukçular arasında fitoplazma taşınması. **A:** Sağlıklı pervane çiçeği fideleri, **B:** pervane çiçeğinin küsküt ile parazitlenmesi, **C:** küsküt tohumlarının çimlenmesi, **D:** Doğal enfekteli asma anacından alınan köklendirilmiş kalem, **E:** Pervane çiçeği ile Asma arasında kurulan küsküt köprüleri.

3.2.3. Total DNA İzolasyonları

Bu çalışmada üretim alanlarından toplanan bitki ve böcek örneklerinden DNA izolasyonu yapmak için birbirine yakın birkaç farklı yöntem kullanılmıştır. Ayrıca kontrollü koşullarda yetiştirilen bitkilerden de bu yöntemlere göre izolasyonlar yapılmıştır. Buna göre Mikoplazma benzeri organizmaların DNA'larından izolasyon yapmaya özel Ahrens ve Seemüller (1992) DNA izolasyon metodu (Yöntem-1) ile ticari DNA izolasyon kiti (Yöntem-2) (DNAeasy plant mini kit- QIAGEN) de bazı küçük modifikasyonlar yapılarak DNA izole edilmiştir.

İzolasyonlarda bağ ve antepfıstığı örneklerinin yaprak orta damarları ile birlikte yaprak sapları, yabancıotlarda duruma göre tüm gövde ve/veya yaprak orta damarları (Şekil 3. 4) ve böceklerin tüm vücutları kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. Yaprak orta damarları steril bistüri ile ayrılan DNA izolasyonuna hazırlanan bir örnek

Yöntem-1:

1. Bitki materyallerinden alınan örnekler yaklaşık 1 g tartılmış ve 4 ml CTAB buffer (pH:8) ile bitki ekstraksiyon poşetleri (Bioreba, 12x15cm) içersine alınmış ve el tipi bilyalı homojenizer (Bioreba) yardımı ile ezilmiştir.
2. Bu ekstraksiyondan 600 µl alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuş ve tüpler 30 dakika 65°C de dijital kuru blok ısıtıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
3. Daha sonra tüpler içerisine 600 µl chloroform/isoamylalcohol (24:1) karışımı ilave edilerek 1 dakika süreyle vorteks tüp karıştırıcı yardımı ile iyice karıştırılmıştır.
4. Tüpler 12.000 rpm devirde 10 dakika santrifüje bırakılmıştır.
5. Santrifüj sonrası iki fazlı süspansiyonun supernatant kısmından 400 µl alınarak yeni santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerine 2/3 oranında soğuk isopropanol ilave edilerek -20°C'de 1 saat bekletilmiştir.
6. -20°C'den alınan tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Pellet %70' lik etanol ile yıkanarak oda sıcaklığı koşullarında kurutulmuştur. Daha sonra pellet 50-100 µl ddH_2O veya TE buffer (pH:8) içinde çözülmüş ve elde edilen DNA'lar diğer analizlerde kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir.

Yöntem-2:

Bu yöntemde DNA izolasyonu asma sürgün ve yaprak orta damarlarından Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca Green ve ark. (1999) fitoplazma izolasyonu için yaptığı değişiklikleri içeren protokol uygulanmıştır. Buna göre şu işlemler sırasıyla uygulanmıştır;

1. Yaprak orta damarından alınan yaklaşık 1 g ağırlığındaki bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla ezilmiş ve bundan 0,1 g alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır.
2. Üzerine 400 µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A ilave edilmiştir. 65°C 'de 10 dk kuru blok ısıtıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
3. Tüplere 130 µl AP2 buffer ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dk buzda inkübe edilmiştir.
4. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

5. 2 ml'lik collection tüpüne pembe kolonlar (QIAshredder spin colon) yeleştirilmiştir. Karışım kolona aktarılmış ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. Tüp dibinde eğer pellet varsa dağıtmadan sıvıyı yeni bir tüpün içerisine aktarılmıştır. 1.5 volum AP3/E bufferdan ilave edilmiş ve pellet pipetaj ile iyice eritilmiştir.
7. Yeni collection tüpüne beyaz kolon (DNeasy Mini spin colon) yerleştirilmiştir. Kolona yaklaşık 650 µl olan sıvıyı transfer edilmiş ve 10-15 dk oda ısısında bekletildikten sonra 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
8. Beyaz kolona (DNeasy Mini spin colon) temiz bir collection tüpüne yerleştirilmiş ve Üzerine 500 µl AW buffer'dan ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Collection tüpünde toplanan sıvıyı uzaklaştırılmış ve 500 µl AW bufferdan ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Yeni bir santrifüj tüpüne (1,5-2 ml'lik) kolonu yerleştirilmiştir.
11. 100 µl AE bufferden ilave edilerek 10-15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek kolon atılmış ve ependorf içinde toplanan 100 µl DNA solüsyonu, testler yapılıncaya kadar -20 veya-80°C'de muhafaza edilmiştir.

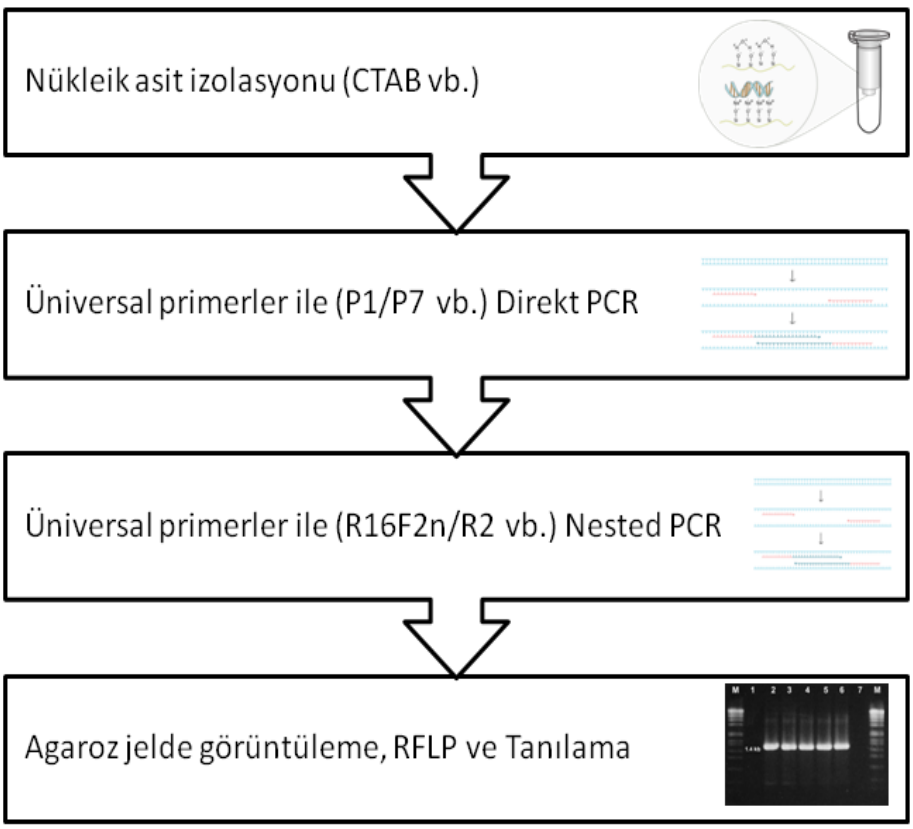
Ticari kit ile DNA izolasyonu masraflı bir yöntem olduğu için sadece daha önce pozitif olduğu bilinen örneklerde ve böcek örneklerinde kullanılmıştır.

3.3.3. PCR/Nested PCR analizlerinde kullanılan metodlar ve PCR koşulları

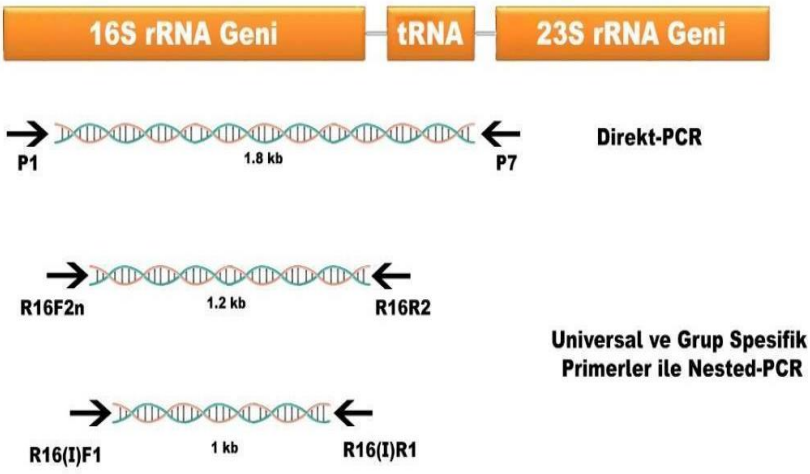
PCR analizlerinde, toplanan örneklerden elde edilen DNA'lar, pozitif kontroller ve negatif kontroller kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PCR işlemleri Direct-PCR ve Nested-PCR işlemleri olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle tüm fitoplazma türlerini tanılayan, fitoplazmaların korunmuş *16SrRNA* genleri üzerinde bulunan korunmuş bölgeleri çoğaltılmıştır. Dokulardan elde edilen fitoplazma DNA'larının konsatrasyonları düşük olduğu için Direct-PCR işleminden

sonra Agaroz jelde istenilen bantlar gözlenemediğinden, Nested-PCR işlemine ihtiyaç duyulmuştur. Direct-PCR ürünlerinden elde edilen amplikonlar duruma göre 1/50 ve 1/100 oranlarında sulandırmalar yapılarak Nested-PCR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Şekil 3. 5).

Tarlalardan toplanan örneklerin rutin tanılama işlemlerinde ve fitoplazma varlığının saptanmasında Nested-PCR analizleri Duduk ve ark. (2013) tarafından önerilen yöntemlere göre yürütülmüştür (yöntemde gerekli görüldüğü durumlarda küçük modifikasyonlar uygulanmıştır). Üniversal tanılama işlemi Şekil 3. 6'da şematize edilmiştir.



Şekil 3. 5. Rutin tanılama işlemlerinde kullanılan Nested PCR iş akış diyagramı



Şekil 3. 6. 16S-23S rDNA operonunun şematik gösterimi, fitoplazmaların PCR ile teşhisi için kullanılan üniversal primerlerin bazılarının pozisyonunu göstermektedir.

3.3.3.1. PCR bileşenlerinin optimum konsantrasyonlarının ayarlanması

PCR işlemleri 0.2 ml'lik PCR tüplerinde yürütülmüştür. Raksiyon hacmi Direct-PCR işlemleri için 25µl olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3. 5). Eğer PCR ürünü dizileme veya RFLP analizlerinde kullanılacaksa son hacim 50µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Direct-PCR analizlerinde kalıp DNA olarak kullanılan total DNA'lar nükleik asit izolasyonu sonucunda elde edilen konsantrasyonlar dikkate alınarak toplam nükleik asit miktarı 20-40ng/µl konsantrasyonlarında sulandırılmıştır. Özellikle yabancıot konukçularından elde edilen total nükleik asit miktarları yüksek olduğundan bu örneklerin neredeyse tamamında PCR işlemi için sulandırmalar yapılmıştır.

PCR analizlerinde kullanılan dNTP setinde (ThermoFischer marka) bulunan her baz için 100mM olarak temin edilen ürünlerden (dTTP, dATP, dGTP, dCTP) son hacim 10mM olacak şekilde 200µl stoklar oluşturulmuş ve PCR tüpü içerisinde son konsatrasyon 0.2 mM olacak şekilde kullanılmıştır.

PCR ile Tanılama ve karakterizasyon analizlerinde için farklı genlerin hedef bölgelerinin çoğaltılması amacıyla ticari olarak sentezlenen primerler farklı pmol/µl konsantrasyonlarında saflaştırıldıklarından dolayı her primer için 100µM olacak

şekilde ana stoklar oluşturulmuş, daha sonra PCR analizlerinde kullanılmak üzere bu stoklardan seyreltmeler yapılarak 10 µM konsantrasyonunda kullanıma hazır alt stoklar kullanılmıştır.

Çalışmada farklı markalarda Taq polimeraz enzimleri kullanıldığından çalışma etkinliği için kullanılan PCR buffer karışımının içeriği markadan markaya göre değişkenlik göstermektedir ve farklı marka ürünlerde konsantrasyonlar üretici firmanın talimatlarına göre yürütülmüştür. Bazı markalarda $MgCl_2$ buffer içinde eklendiğinden bu duruma da dikkat edilmiştir.

Çizelge 3. 5. PCR reaksiyon bileşenleri, miktar ve konsatrasyonları

Bileşen	**Konsantrasyon**	**Bir örnek (µl)**
ddH_2O	-	16.35
Primer 1	20 µM	0.5
Primer 2	20 µM	0.5
PCR buffer	10x	2.5
$MgCl_2$	25 mM	1.5
dNTP mix	10 mM	2.5
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.15
Kalıp DNA	20 ng/µl	1
TOPLAM		25 µl

3.3.3.2. PCR analizleri için materyallerin oluşturulması ve hedef bölgelerin çoğaltılması

Çalışmada toplanan örneklerden total DNA izolasyonları yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asitler direct-PCR için kalıp DNA materyalini oluşturmuştur. Çoğaltılmak istenilen gen bölgesinin dizisine göre farklı primerler ticari olarak temin edilmiş ve kullanılmıştır. Tüm fitoplazmalarda korunmuş gen olarak bulunan 16SrDNA geni ile üniversal tanılama yapılmıştır. Çalışmada ayrıca asmaları enfekte eden BN ve FD hastalıklarına neden olan fitoplazmaları 16Sr grup düzeyinde tanılayan grup spesifik primerler de kullanılmıştır (Çizelge 3. 3). Özellikle BN hastalığına neden olan 16SrXII grubu fitoplazmaların karakterizasyonunda *VMP1, Tuf, SecY* housekeeping gen bölgelerini çoğaltan primerler moleküler karakterizasyon çalışmalarında MLST analizleri için kullanılmıştır. Bu genlerin karakterizasyonda

kullanılan bölgelerini çoğaltan primerler ve PCR koşulları ile ilgili yöntemler Foissac ve ark. (2013) metodu esas alınarak yürütülmüştür.

16SrDNA geninin çoğaltılmasında tüm fitoplazma türlerinde korunmuş olarak bulunan gen parçasını çoğaltan Üniversal primerler kullanılmıştır. Buna göre, Diretkt PCR işleminde yaklaşık 1800 bç uzunluğunda bir parçayı çoğaltan P1/P7 (Deng ve Hiruki, 1991; Smart ve ark., 1996) ve yaklaşık 1400 bç uzunluğunda bir parçayı çoğaltan R16F1/R16R0 (Davis ve Lee, 1993; Lee ve ark., 1993) primerleri kullanılmıştır. Nested PCR analizinde ise Direct-PCR'da çoğaltılan ürünler 1/50 oranında sulandırılmış ve yaklaşık 1250 bç ürün çoğaltan R16F2n/R16R2 primerleri (Gundersen ve Lee, 1996; Lee ve ark., 1993), yaklaşık 500 bç uzunluğunda ürün çoğaltan M1/M2 (Gibb ve ark., 1995) primerleri kullanılmıştır.

Grup spesifik PCR analizlerinde ise P1/P7 primerleri ile çoğaltılan Direkt PCR ürünleri 1/30 oranında sulandırılarak Nested PCR analizlerinde kullanılmıştır. Bağları enfekte eden BN fitoplazmasının da içinde bulunduğu 16srI, II, XII, XV ribozomal gruplarına ait olan fitoplazmalara özgü parçaları çoğaltan ve yaklaşık 1050 bç uzunluğunda ürün veren R16(I)F1/R16(I)R1 (Lee ve ark., 1995) grup spesifik primerleri kullanılmıştır. Ayrıca FD hastalığına neden olan ve Avrupa'da karantina önlemleri ile mücadele edilen fitoplazmaların içinde bulunduğu 16SrV ribozomal grubuna spesifik ve yaklaşık 1100 bç uzunluğunda parça çoğaltan R16(V)F1/R1 (Lee ve ark., 1995) grup spesifik primerleri kullanılmıştır.

Tuf geninin çoğaltılmasında (Schneider ve ark., 1997) tarafından tasarlanan ve 16SrXII grup fitoplazmaların *Tuf* geni üzerinde yaklaşık 1050 bç uzunluğunda bir parçayı çoğaltan Ftuf1/Rtuf1 primerleri ile belirtilen yönteme göre Direkt PCR analizi yürütülmüştür. Nested PCR analizinde ise Direkt PCR'da çoğaltılan ürünler 1/50 oranında sulandırılmış ve yaklaşık 940 bç ürün çoğaltan FtufAY/RtufAY primerleri ve yaklaşık 850 bç uzunluğunda ürün çoğaltan fTufu/rTufu primerleri kullanılmıştır. Çoğaltılan bu ürünler daha sonra Langer ve Maixner (2004) yöntemine göre moleküler karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

SecY geninin çoğaltılmasında Fialová ve ark. (2009) tarafından tasarlanan ve 16SrXII grup fitoplazmaların *SecY* geni üzerinde bir parçayı çoğaltan PosecF1/R1 primerleri ile belirtilen yönteme göre Direkt PCR analizi yürütülmüştür. Nested PCR analizinde ise Direkt PCR'da çoğaltılan ürünler 1/50 oranında sulandırılmış ve yaklaşık 998 bç uzunluğunda ürün çoğaltan PosecF3/R3 primerleri kullanılmıştır.

VMP1 geninin çoğaltılmasında Cimerman ve ark. (2009) tarafından tasarlanan ve 16SrXII grup fitoplazmaların *VMP1* geni üzerinde yaklaşık 1900 bç uzunluğunda bir parçayı çoğaltan H10F1/H10R1 primerleri ile belirtilen yönteme göre Direkt PCR analizleri yürütülmüştür. Nested PCR analizinde ise Direkt PCR'da çoğaltılan ürünler 1/50 oranında sulandırılmış ve Fialová ve ark. (2009) tarafından tasarlanan yaklaşık 1450 bç ürün çoğaltan TYPH10F1/TYPH10R1 primerleri kullanılmıştır.

3.3.4. RFLP analizlerinde kullanılan metodlar

Sürveyler sonucu toplanan örneklerin ilgili genleri üzerinden elde edilen fragmentlerin RFLP analizleri fitoplazma türlerinin DNA'larındaki polimorfizmleri belirlemek amacıyla Duduk ve ark. (2013) tarafından önerilen protokollere göre yürütülmüştür. Çoğaltılan PCR ürünlerinden 10-15 µl miktarlarda alınarak seçilen restrüksiyon endonükleaz enzim karışımları üretici firmanın talimatları doğrultusunda kesimler gerçekleştirilmiştir. Farklı genler için seçici olan RFLP enzimleri kullanılmıştır. RFLP işleminden elde edilen kesim profilleri %2.5-3'lük agaroz jel üzerinde 1xTAE ortamında 1 saat jel uzunluğu dikkate alınarak akım yönünde cm'ye 5V akım ile elektroforez işlemine tabi tutulmuş ve jel EtBr ile boyanarak UV transilluminatör ile görüntülenmiş ve birbirinden ayırt edilmiştir.

Laboratuvar koşullarında yürütülen bu RFLP işlemi ıslak RFLP olarak adlandırılmıştır. Islak RFLP sonucu bazı temsilci izolatlar çift yönlü DNA dizilemesine tabi tutulmuş ve dizilerden elde edilen veriler daha çok enzim ile analiz yapma imkanı sağlayan *in silico* RFLP işleminde kullanılmıştır. Dizi bilgileri elde edildikten sonra *in silico* RFLP işlemleri için *iPhyclassifier* ve *pdraw32* programları kullanılmıştır. Zhao ve ark. (2009b) tarafından geliştirilen *i*Phyclassifier ile

fitoplazmaların 16Sr grup/altgrup düzeyinde sınıflandırılması, tür teşhisi ve 16SrDNA geninin sınıflandırmada kullanılan 17 enzim ile kesim profillerinin sanal jel görüntüleri oluşturulmuştur. 16SrDNA geni harici diğer genlerin RFLP işleminden elde edilen sanal jel görüntüler için ise pdraw32 programından faydalanılmıştır.

16SrDNA geni için üniversal primerler (F2n/R2) ile çoğaltılan ürünler fitoplazmaların türlerini ve/veya gruplarını belirleyebilmek amacıyla RFLP analizlerine tabi tutulmuşlardır. Yani toplanan örneklerin birbirinden ayırt edilebilmesi için ilk aşamada tüm örnekler için bu protokol kullanılmıştır. Bu işlemlerden sonra '*Ca*.P.solani' türleri tespit edilmiş ve bunlar sonraki RFLP işlemlerinde kalıp DNA materyali olarak kullanılmıştır.

Tuf geni için çoğaltılan ürünlerindeki (FtufAY/RtufAY ürünleri) polimorfizmleri belirleyebilmek amacıyla *HpaII* enzimi kullanılmıştır. *VMP1* geni için çoğaltılan ürünlerindeki (TYPH10F1/TYPH10R1 ürünleri) polimorfizmleri belirleyebilmek amacıyla *RsaI* enzimi kullanılmıştır.

3.3.5. DNA Dizileme ve Filogenetik Analizlerde Kullanılan Metodlar

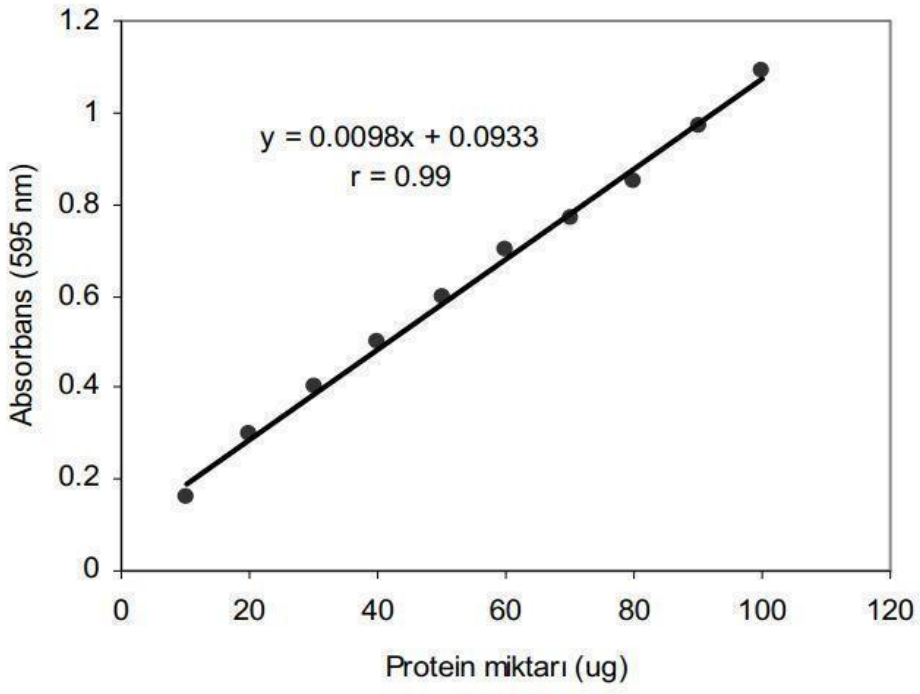
Asma, antepfıstığı, yabancıotlar ve böceklerden elde edilen fitoplazmaların Nested-PCR'da çoğaltılan ürünleri Sanger dizileme metoduna göre çift yönlü olarak dizilenmiştir (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer). Çift yönlü diziler Mega7 programı (Kumar ve ark., 2016) ile birleştirilmiş ve resmi olarak tanımlanmış 43 '*Ca*. Fitoplazma' türünün (Bertaccini ve Lee, 2018) nükleotid dizileri kullanılarak filogenetik analizler yürütülmüştür.

3.3.6. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Metodlar

'*Ca*. Phytoplasma solani' ile enfekteli olan ve olmayan bitkilerden elde edilen çelikler uygun ortamlarda köklendirilmiş ve bu bitkilerden yeniden DNA izolasyonu yapılarak enfeksiyon varlığı saptanmıştır. Daha sonra bu bitkiler bitki savunma tepkilerinin ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.3.6.1. Yapraklardaki toplam protein miktarlarının belirlenmesi

Yapraklardaki çözülebilir protein miktarı Bradford (1976)'a göre, 565 nm'de 1 ml'lik polistren küvetlerde ölçülmüştür. 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 50 ml % 95'lik ethanol içinde karıştırılarak çözülmüş ve % 85' lik 100 ml fosforik asit karıştırılarak 1 litreye tamamlanmıştır. Yaklaşık 10-100 µg protein içeren 100 µl hacimindeki bitki ekstraktları, 5 ml Coomassie blue ile karıştırılıp, örnek içermeyen Coomassie blue'e karşı 595 nm okuma yapılmıştır. Protein standardı olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Bovine Serum Albumin Fraksiyon V (Sigma) kullanılmış, protein değerleri 10-100 µg arasında linear olarak bulunmuştur (Şekil 3. 7). Örneklerdeki protein miktarları, standartlar kullanılarak (Karakaş, 2013) hazırlanan kalibrasyon eğrisindeki değerler kullanılarak mg protein^{-1} olarak belirlenmiştir. Protein miktarları enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3. 7. Protein miktarının tayini için Coomassie blue yöntemi ile (Bradford, 1976) protein kalibrasyon standardı

3.3.6.2. Antioksidan enzim analizleri

Bitkilerde katalaz analizi (CAT, E.C.1.11.1.6);

Bitki yapraklarından yapılan katalaz enzim aktiviteleri Milosevic ve Slusarenko (1996) tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. Bu analizde yapraklardaki katalaz aktivitesi H_2O_2 parçalanmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Buna göre; 50 µl bitki ekstraktı (0.5 g yaprak örneği, 10 ml sodyum fosfat çözeltisinde ezilerek elde edilen ekstrakt), 2.95 ml (50 mM K-fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0), 10 mM H_2O_2 ve 4 mM Na_2EDTA) reaksiyon çözeltisine eklenmiş, 30 sn süre ile 240 nm'de 25°C'de ölçümler yapılmıştır. Absorbanstaki azalış, 180 sn boyunca takip edilmiştir ve enzim aktivitesi dakikada parçalanan µmol H_2O_2 saptanmıştır. Enzim aktivitesinin değeri, enzim ünitesi mg protein^{-1} g olarak belirtilmiştir.

Bitkilerde peroksidaz analizi (POX, E.C.1.11.1.7);

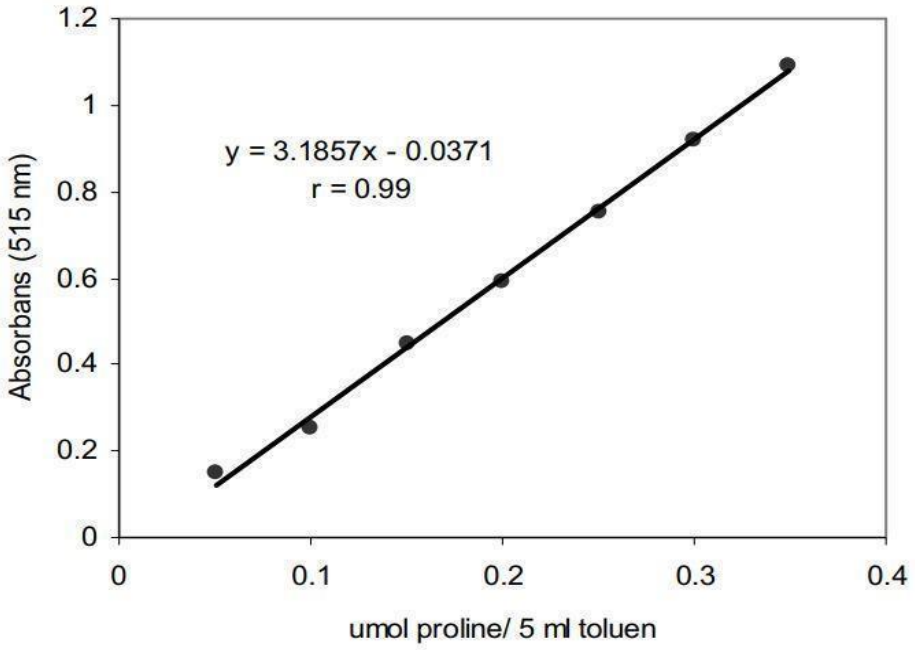
Bitki yapraklarından POX analizleri Cvikrova ve ark. (1994)'ün metodu esas alınarak Karakaş (2013)'e göre yürütülmüştür. Bu analizde yaklaşık 0.5 g yaprak örnekleri 50 mM Na-fosfat tampon (10 mL) içinde homojenizasyona maruz bırakılmıştır. 100 µl ekstrakt 3 mL reaksiyon karışımı içine (13 mM guaiacol, 5 mM H_2O_2 ve 50 mM Na-fosfat (pH 6.5) ilave edilmiştir. H_2O_2 eklenmesi ile reaksiyon başlatılmış ardından 470 nm'de 25 °C de bir dakika ara ile üç defa okuma yapılmıştır. Peroksidaz aktivitesinin bir ünitesi ΔA_{470} nm'de 0.1 absorbans dakika^{-1} olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ünite mg protein^{-1} olarak belirtilmiştir.

3.3.6.3. Yapraklardaki prolin miktarlarının belirlenmesi

Yapraklardaki serbest prolin içeriğinin belirlenmesi Bates ve ark. (1973) metoduna göre yürütülmüştür. Konusuna ait her tekerrürde 0.5 g yaprak örneği, % 3'lük (w/v) sülfosalisilik asitle homojenize edilmiş ve homojenat filtreden geçirilmiştir. Renk maddesi olarak Acid-ninhydrin karışımı kullanılmıştır. 1.25 g ninhydrin, 30 ml glasial asetikasit ve 20 ml fosforik asit (6 M) içerisinde çözülerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (karışım 4°C'de 24 saat stabil kalabilmektedir).

Filtre kağıdından süzülen ekstrakt üzerine asit ninhidrin ve asetikasit eklenmiş daha sonra sıcak su banyosunda100°C'de 1 saat kaynamaya bırakılmıştır. Sıcak su banyosundan sonra reaksiyon buz banyosu kullanılarak durdurulmuştur ve karışıma toluen (5 ml) ilavesi sonrası vortekslenerek karıştırılmıştır. Karışımın sıvı fazından aspire edilen toluen içeriğinin 520 nm'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuş ve aynı işlemlerle hazırlanan prolin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi hazırlanarak (farklı konsantrasyonlarında L-prolin ile kıyaslanarak kalibre edilmiştir, Şekil 3. 8).

Elde edilen sonuçlar µmol g^{-1} taze ağırlık düzeyinde gösterilmiş ve bu amaçla aşağıdaki formül kullanılmıştır (Karakaş, 2013);



Şekil 3. 8. L- prolin kalibrasyon standardı

3.3.6.4. Klorofil içeriklerinin belirlenmesi

Yapraklardaki klorofil analizleri Arnon (1949)'a metoduna göre göre yürütülmüştür. 0.5 g yaprak 5 ml aseton/su (% 80 v/v) karışımında homojenize edilmiş daha sonra kağıt filtreden geçirilerek ışık geçirmeyen tüplere konulmuş, klorofil a için 663.5 nm, klorofil b için 645 nm de % 80 aseton kontrolüne karşı okumalar yapılmıştır.

Sonuçlar aşağıdaki formüle göre mg/l taze ağırlık olarak hesaplanmış ve daha sonra mg klorofil g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Toplam klorofil (mg/l) = $20.2*A_{645} + 8.02*A_{663.5}$

Klorofil a (mg/l) = $12.7*A_{663.5} - 2.69*A645$

Klorofil b (mg/l) = $22.9*A_{645} - 4.68*A_{663.5}$

3.3.6.5. Lipid Peroksidasyon Analizleri (MDA)

Örneklerdeki lipid peroksidasyon düzeyi malondialdehit (MDA) içeriği olarak gösterilmektedir. Lipid peroksidasyonunun ölçümünde Sairam ve Saxena (2000) tarafından düzenlenen yöntem kullanılmıştır. Bunun için taze yaprak örneği (0.5 g) 10 ml triklorasetik asit (% 0.1 w/v, TCA) ile homojenize edilmiş ve 10.000 g'de santrifüj edilmiştir (5 dakika). Santrifüjden alınan 1 ml ekstrakt üzerine 4 ml TCA (% 20) içinde karıştırılmış ve tiobarbiturik asit (TBA, % 0.5) eklenmiştir. Bu karışım 95 °C'de inkübe edildikten sonra buz banyosu yapılarak soğutulmuştur. 10.000 g'de santrifüj (10 dakika) edildikten sonra sıvı kısım alınmıştır. Spekro cihazında 532 ve 600 nm'de absorbans değerleri elde edilmiş ve bu değerlerdeki MDA miktarları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{MDA (nmol g}^{-1}\text{ taze ag.)} = \frac{\text{Ekstrakt hacmi (ml) x } \left[(A_{532} - A_{600})/(155\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1})\right]}{\text{Örnek miktarı (g)}} \text{x} 10^3$$

3.3.6.6. H_2O_2 analizleri

Yapraklardaki hidrojen peroksit miktarının saptanması ve kantifikasyonu Velikova ve ark. (2000) yöntemi esas alınarak yürütülmüştür. Buna göre 0.5 g bitki dokuları 5 ml 0.1% (w:v) trichloroacetic acid (TCA) içeren buz içerisinde homojenize edilmiştir. Oluşan karışım 12,000 g'de santrifüj edilmiş (15 dakika) ve süpernatant kısmından 0.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml 10 mM potasyum fosfat buffer (pH:7) ve 1 ml 1 M KI eklenmiştir. Süpernatantın 390 nm'de absorbans okuması yapılmıştır.

Örneklerden elde edilen absorbans değerleri, H_2O_2 standartları ile oluşturulan grafikteki değerlerle karşılaştırılarak örneklerdeki H_2O_2 miktarları belirlenmiştir.

3.3.6.7. Toplam Fenolik Analizleri

Toplam fenolik bileşik analizleri Shetty ve ark. (1995) metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak yürütülmüştür. Buna göre; yaprak örnekleri (0.5 g) 5 ml methanol (%80, v/v) içerisinde homojenize edilmiş (95 ºC), elde edilen ekstrakt 10.000g'de (10 dk) santrifüj edilmiştir. Daha sonra toplam fenol miktarını belirlemek amacıyla 300 µl seyreltik ekstrakt 1.5 ml Folin-Ciocalteau (1:10 oranında seyreltilmiş) ile reaksiyona sokulmuş, 5 dk sonra 1.2 ml Na_2CO_3 (%20, v/v) ilave edilmiş ve 30 dk ışıksız ortamda (40 ºC) bekletilmiştir. UV-spektrofotometrede 760 nm'de kontrol grubuna karşı renk değişimi yapılan okuma farklar belirlenmiştir. Yapraklardaki fenolik madde içerikleri gallik asit standardının farklı konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar GAE g^{-1} olarak belirtilmiştir.

3.3.6.8. Lignin ve Kalloz Birikiminin Belirlenmesi

Asmaların yaprakları üzerinden analizler yürütülmüştür. Dokulardaki klorofil ve diğer hücresel organeller, % 1'lik phloroglucinol eklenmiş methanol içerisinde, 10 dk kaynatılma ile uzaklaştırılmıştır. Dokuları renksizleşen örnekler, kloralhidrat (2.5 g ml^{-1} saf su) içinde bırakılmış (24 saat), şeffaf hale geldikleri zaman yıkanarak arındırılmıştır. Klorofiller metanol ile uzaklaştırılmış, daha sonra kloralhidrat yardımıyla dokular temizlenmiş ve steril bir petri içine alınmış, üzerine konsantre HCl eklenmiş ve 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra bu dokuların üzerine birkaç damla gliserin (%50) çözeltisi damlatılarak elde edilen dokular incelenmiştir. Yaprak dokularının üzerine HCl eklendikten yaklaşık 10 dk sonra, ligninlenmiş yapılar beyaz beze benzeri şekiller oluşturduğu görülmüştür. Boyalı dokuların kısa süre içerisinde renklerini kaybettiğinden, preparatlar kısa sürede mikroskop kullanılarak incelenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir (Vallet ve ark., 1996).

3.3.7. İstatistiksel Analizler

Bu araştırma boyunca yapılan tüm analizlerin güvenilirliğini arttırmak ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde etmek amacıyla birbirinden tamamen bağımsız 2 ayrı deneme kurulmuştur. Çalışma antioksidan enzim, prolin, H_2O_2, klorofil analizleri için iki seriden toplam 6 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Analizler sonucu elde edilen veriler, SPSS (V16.0) istatistik paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur ve gruplar arasındaki önemli farklar Duncan testi ile belirlenmiştir. Grafiklerdeki hata çubukları ortalama ± hatayı (S.H)'yı göstermektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları ve Simptomatolojik Bulgular

Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde bağ üretim alanlarında bağ, antepfıstığı, yabancıotlar ve potansiyel vektör böceklerdeki fitoplazmaların araştırılması amacıyla yürütülen sürvey çalışmalarında bağ üretiminin yoğun yapıldığı bahçelerden fitoplazma kaynaklı hastalık simptomu gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Sürvey çalışmalarında farklı asma çeşitlerinin bulunduğu üretim alanlarından örnekler toplanmış ve özellikle yerli çeşitlerin bulunduğu üretim alanlarından örnekler alınmıştır.

Ayrıca örnek alınan tüm bahçelerden hastalık belirtisi gösteren/göstermeyen çeşitli yabancıotlardan da örnekler alınmış ve bazı örneklerin fitoplazma pozitif sonuç verdiği saptanmıştır.

Çoğu asma bahçesinde iki bitki arasına antepfıstığı fidanı dikildiği gözlenmiş (Şekil 4. 1), ayrıca fitoplazma enfekteli asma bahçelerindeki hastalık belirtisi gösteren antepfıstığı ağaçlarından da pozitifi sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4. 1. Antepfıstığı ile asmaların iç içe tesis edildiği bir bahçe (Bozova)

4.1.1. Asmalarda Simptomatolojik Bulgular

Yapılan sürveylerde genel olarak, beyaz asma çeşitlerinin yapraklarında düzensiz sararmalar, kırmızı asma çeşitlerinde düzensiz yaprak kızarmaları (Şekil 4. 2), sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme (Şekil 4. 3), enfeksiyonlu sürgünlerde yaprakların üst üste binmesi (Şekil 4. 4), yaprak damarınlarda sararma ile yapraklarda renk açılması (Şekil 4. 5), yaprak ayasında kırmızıya dönük koyu renk gelişimi, yaprakların arkaya doğru kıvrılması, yaprak ayasında yer yer kırmızılaşma, yaprak uçlarında nekrotikleşme, sürgün boğum aralarında kısalmalar, genç sürgünlerde lignifikasyon eksiklikleri sonucu yeşil-odunsu bölgelerin oluşumu (Şekil 4. 6), ölü sürgünlerin gözlenmesi (Şekil 4. 7), ve büzüşük meyve oluşumu ve salkımların erkenden kuruması şeklinde fitoplazmaların neden olduğu hastalık simptomları görülmüştür.



Şekil 4. 2. Hönüsü asma çeşidinde düzensiz yaprak kızarmaları



Şekil 4. 3. Fitoplazma enfeksiyonu sonucu sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme



Şekil 4. 4. Fitoplazma enfeksiyonu sonucu sürgünlerde üst üste binmiş yapraklar



Şekil 4. 5. Yapraklarda fitoplazma enfeksiyonu nedeni ile sararma ve renk açılması belirtisi



Şekil 4. 6. Genç sürgünlerde lignifikasyon eksikliği nedeni ile odunlaşamayan dokular

Yerel asma çeşitlerinden özellikle Yediveren (genellikle evlerin bahçelerinde yetiştirilmektedir ve yerel olarak "ariş" diye adlandırılmaktadır), Çiloreş (Adıyaman'daki yerel ismi: Kızlar Tahtası) ve Hönüsü ve bazı tanımlanamayan

çeşitlerden örnekler alınmış ve PCR testleri ile fitoplazmalara karşı testlemeler yapılmıştır. Gözlemlere dayalı olarak Hönüsü ve Çiloreş çeşitlerinde hastalık belirtilerinin nispeten diğerlerine oranla daha şiddetli ve karşılaşma sıklığının daha fazla olduğu saptanmıştır. İllere ve çeşitlere göre alınan örnek sayıları Çizelge 4. 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. Sürvey yapılan bağ alanlarında tanılanan fitoplazmaların dağılımı

Bölge ve Çeşit		Toplanan örnek sayısı	Pozitif çıkan örnek sayısı	Toplam enfeksiyon oranı (%)
Şanlıurfa	Hönüsü	53	9	16.98
	Çiloreş	30	10	33.3
	Diğerleri	12	2	16.6
Adıyaman	Hönüsü	18	-	-
	Çiloreş	20	4	20
	Diğerleri	4	-	-



Şekil 4. 7. Fitoplazma kaynaklı ölü sürgün oluşumunun gözlenmesi belirtileri

Bois Noir hastalık belirtileri tipik olarak en iyi Hönüsü çeşitlerinde gözlenmiştir. Şiddetli yaprak kızarması ve özellikle Hönüsü asma çeşitlerinde düzensiz yaprak kızarmaları (Şekil 4. 2), sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme, yaprakların arkaya doğru kıvrılması, enfeksiyonlu sürgünlerde yaprakların üst üste binmesi,

sürgün boğum aralarında kısalmalar, ölü sürgünler, genç sürgünlerde lignifikasyon eksiklikleri sonucu yeşil-odunsu bölgeler, büzüşük meyve oluşumu ve salkımların erkenden kuruması belirtileri yapılan sürvey çalışmalarında tek tek gözlenmiştir.

Çalışmada bahsedilen hastalık belirtileri daha önce Constable ve Bertaccini (2017)'ye göre asmalarda tipik fitoplazma hastalık belirtileri olarak rapor edilen veriler ile tutarlılık gösterdiği saptanmıştır. Sürveylerde de buna benzer hastalık belirtileri gösteren bahçeler yoğun olarak incelenmiştir.

BN ve diğer fitoplazma hastalıkları bahçelerde epidemi şeklinde değil de oldukça seyrek olarak görülmüştür. Bir asma bahçesinde en fazla birkaç tane bitkide hastalık belirtisi gösteren ve fitoplazma ile enfekteli asma bitkisi saptanmıştır. Güdümlü örneklemeler sonucu ilginç olarak benzer hastalık belirtisini gösteren bitkilerin bazıları fitoplazma pozitif olarak bulunurken bazıları ise negatif bulunmuştur. Bu durum, asmalarda viral hastalık etmenlerinin de bulunabileceği ihtimalini düşündürmektedir, ayrıca Dermastia ve ark. (2017a) bu gibi durumların hastalık tanısını zorlaştırdığını rapor etmişlerdir.

4.1.2. Antepfıstığı Ağaçlarındaki Simptomatolojik Bulgular

Çalışmanın yürütüldüğü bölgelerde herhangi bir fitoplazma ile enfekteli bulunan asma bahçelerinden hastalık belirtisi gösteren antepfıstığı ağaçlarından da yaprak örnekleri alınmış ve bunlar üniversal fitoplazma primerleri kullanılarak Nested-PCR ile fitoplazma varlığına karşı test edilmiştir. Hastalık belirtisi gösteren örneklerin bir kısmı fitoplazma pozitif sonuç vermiş, toplamda 48 bitkiden 6 tanesi pozitif sonuç vermiştir. Hastalık belirtisi gösteren ancak fitoplazma-negatif sonuç veren bitkilerin fitoplazma konsantrasyonu açısından tanılama yapmak için yetersiz miktarda fitoplazma içerdikleri düşünülmektedir. Odunsu bitkilerde fitoplazma enfeksiyonunun Nested-PCR ile bile tespit edilememesi durumu daha önce birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Caglayan ve ark., 2019; Constable ve Bertaccini, 2017; Prezelj ve ark., 2013).

Pozitif sonuç veren bu örnekler detaylı karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Antepfıstığı örnekleri sadece Şanlıurfa ili ve ilçelerinden toplanmıştır. Fitoplazma-pozitif sonuç veren hastalıklı bitkiler asma bahçeleri ile antep fıstığı ağaçlarının iç içe tesis edildiği bahçelerden tespit edilmiştir. Pozitif sonuç veren bir antepfıstığı ağacındaki hastalık belirtileri Şekil 4. 8'de gösterilmiştir. Belirtilerin birbirine çok benzediği tespit edilmiştir. Ancak Şekil 4. 9'da cadı süpürgesi hastalık belirtisi şeklinde bir adet antepfıstığı ağacı fitoplazma pozitif bulunmuş ve bu diğer belirtilerden farklılık göstermesine rağmen aynı patojen ile enfekte olduğu saptanmıştır. Benzer durum İran'da antepfıstığı ağaçlarında cadı süpürgesi hastalığı belirtisi ile rapor edilmiş ve yeni bir fitoplazma olarak rapor edilmiştir (Zamharir ve Mirabolfathi, 2011).

Antepfıstığı ağaçları ve asma bitkisi arasında fitoplazma taşıyabilecek herhangi bir böcek vektör varlığına karşı özellikle bu bahçelerden atrap yardımı ile yaprak emici böcekler toplanmış ve testlemelere dahil edilmiştir (daha sonraki başlıklarda sonuçlar verilmiştir). Ayrıca bu bahçelerde hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen çeşitli yabancıotlardan da örneklemeler yapılmış ve bir sonraki başlıkta açıklandığı üzere pozitif bulgulara rastlanmıştır.

Aynı coğrafi bölgede daha önce Guldur ve ark. (2018) tarafından yürütülen ve antepfıstığı ağaçlarında fitoplazma varlığını rapor eden çalışmadaki hastalık belirtileri ile bu çalışmada asma bahçelerindeki antepfıstığından saptanan belirtiler uyumluluk göstermiştir.



Şekil 4. 8. Antepfıstığı ağacında yaprak yanıklık belirtisi şeklinde gözlenen fitoplazma belirtileri



Şekil 4. 9. Yeni aşılanmış bir fitoplazma-pozitif antepfıstığında Cadı süpürgesi belirtisi oluşumu

4.1.3. Çeşitli Yabancıotlarda Simptomatolojik Bulgular

Toplanan yabancıotlardan sekiz tarla sarmaşığı, üç sürünücü horoz ibiği ve iki çediotu bitkisi fitoplazma ile pozitif olarak bulunmuş karakterizasyonları yapılmıştır.

Toplanan ve pozitif bulunan Tarla sarmaşığı (*Convolvulus* spp.)'nda genel olarak yapraklarda kızarma, morarma ve gelişme bozuklukları gözlenmiştir (Şekil 4. 10). Bağlarda yoğun olarak bulunan Tarla sarmaşığından toplamda sekiz adet '*Ca*.P.solani' ile enfekteli olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 10. Tipik fitoplazma hastalık belirtisi (yaprakların bir kısmında kızarma ve gelişme bozukluğu) gösteren bir tarla sarmaşığı

Sürünücü horoz ibiği (*Amaranthus blitoides*) yine asma üretimi yapılan neredeyse her tarlada varlığı gözlenmiş ancak, yapraklarında sararma ve gelişme bozuklukları (Şekil 4. 11) ile kızarma şeklinde hastalık belirtileri (Şekil 4. 12) gözlenen bitkilerin tamamının fitoplazma ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Üç adet pozitif bitki örneğinin ikisi 16SrI grubu fitoplazma ile enfekteli bulunurken, bir tanesi 16SrXII grubu fitoplazma ile enfekteli bulunduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 11. *Amaranthus blitoides'*de sararma ve küçük yaprak oluşumu belirtileri



Şekil 4. 12. Fitoplazma-pozitif bir *Amaranthus blitoides'*de küçük yaprak oluşumu ve kızarıklık belirtileri

Türkiye'de *Amaranthus* spp. örneklerinden daha önce 16SrVI-A grubu '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' tespit edilmiştir (Oksal 2020). Dünyada ise *Amaranthus* spp.'den daha önce farklı fitoplazma türleri de tespit edilmiştir (Yang ve ark. 2011; Omar ve ark. 2020). Bu çalışmada ise ilk kez asma bahçelerinden toplanan

bir *Amaranthus blitoides'*ten 16SrXII-A grubu fitoplazma tespit edilmiş ve protein kodlayan diğer genleri bakımından asma ve antepfıstığından elde edilen Fitoplazma dizi homolojisi gösterdiği saptanmıştır. *Amaranthus* spp. özellikle Şanlıurfa ilinde birçok bağ üretim alanlarında bulunmaktadır ve hastalığı taşıyıcı uygun bir vektör varlığında geniş epidemilere neden olabilir.

Şiddetli sararma belirtisi (Şekil 4. 13) gösteren iki adet *Prosopis farcta* 16SrXII-A grubu fitoplazma ile enfekteli bulunmuştur.



Şekil 4. 13. *Prosopis farcta'*da şiddetli yaprak sararması gösteren bir örnek (fitoplazma pozitif)

Prosopis farcta'da daha önce Esmailzadeh Hosseini ve ark. (2011) tarafından fitoplazma enfeksiyonu rapor edilmiştir ancak çalışmada fitoplazma tür tanımı yapılmamıştır. Bu çalışmada ise şiddetli sararma belirtisi gösteren iki adet *P. farcta'*da 16SrXII-A grubu fitoplazma tespiti ilk kez saptanmıştır.

Hastalık belirtisi gösteren ancak fitoplazma-negatif bulunan diğer yabancıotlardan meyan (*Glycyrrhiza glabra*)(Şekil 4. 14), yabani üçgül (*Trifolium* spp.), kanyaş (*Sorghum halepense*)(Şekil 4. 15), fenerotu (*Physalis* spp.), sütleğen (*Euphorbia* spp.) gibi otlar M1/M2 primerleri ile de testlenmesine rağmen herhangi bir fitoplazmaya rastlanmamıştır. Bu bitkilerdeki hastalık belirtilerine fizyolojik nedenler veya çeşitli virüsler neden olmuş olabilir.



Şekil 4. 14. *Glycyrrhiza glabra'*da genç yapraklarda sararma ile başlayan ve nekrotik lezyon oluşumuna varan belirtiler

Yabancıotlar özellikle fitoplazma-pozitif bulunan bahçelerden temin edilmiştir. Patojen teşhisi sadece hastalık gösteren yabancıotlardan yapılabilmiştir. Pozitif çıkan asmaların altlarından bile bazı yabancıotlar toplanmış ve bunlar testlemelerde negatif sonuç vermişlerdir. Bu durum hastalık taşınmasında rol oynayan aktif bir vektör böcegin olmadığı tezini desteklemektedir. Ancak yine de böceklerin fitoplazma-pozitif olan asmalardan beslenirken, yabancıotlarda beslenmeyi tercih etmemesi ile de yorumlanabilir. Böcekler ile ilgili bulgular bir sonraki alt başlıkta yorumlanmıştır.



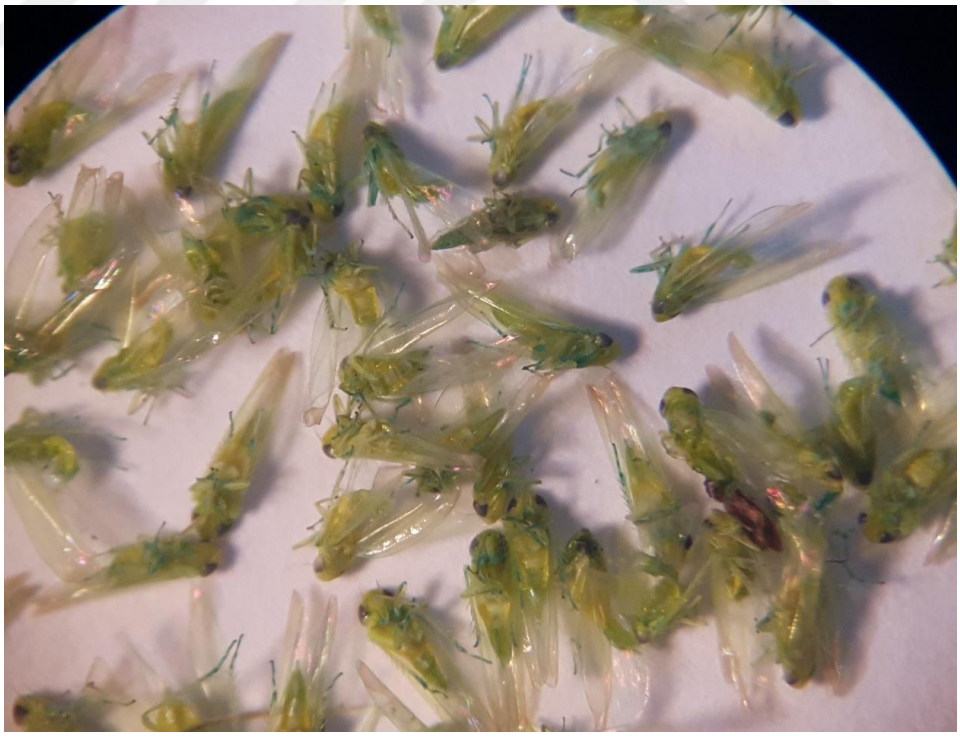
Şekil 4. 15. Yapraklarda kısmi olarak kızarma ve antosiyanin birikimi belirtisi gösteren bir kanyaş bitkisi

4.1.3. Toplanan Böcekler ile ilgili Bulgular

Fitoplazma ile bulaşık olduğu saptanan bitkilerin bulunduğu tarlalardan ağustos-eylül-ekim ayları arasında böceklerin aktif olduğu dönemlerde atrap-emgi şişesi yöntemi ile böcekler yakalanmış ancak tek tek veya çoklu böcek örneklerinden elde edilen total DNA'lardan hiç birisinde fitoplazma varlığı saptanmamıştır. Elde edilen bulgular Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde toplanan hemipterlerin, hiçbirinin fitoplazma hastalıklarının olası vektörleri olmadığı belirlenmiş ve bu hastalıkların yayılması ve epidemi oluşturması için tehdit oluşturmadığı görülmüştür ve bundan dolayı böceklerin hastalık taşımasında etkin rol oynamadığı sonucuna varılmıştır. Atrap yardımıyla toplanan böceklere ait görseller Şekil 4. 16, Şekil 4. 17, Şekil 4. 18 ve Şekil 4. 19'da gösterilmiştir. Bu türlerden *Zyginidia* spp. sohrab Zachvatkin (Hemiptera: Cicadellidae) ve *Dictyophara europaea* L. (Hemiptera: Dictyopharidae) gibi vektörlerin potansiyel Bois Noir hastalığı taşıyıcısı olabileceği daha önce rapor edildiğinden (Cvrković ve ark., 2011), bunların popülasyon takiplerin dikkatli bir şekilde yapılması ve gerektiğinde mücadele edilmesi gerekmektedir.



Şekil 4. 16. *Zyginidia* spp.'ye ait bir böcek (fitoplazma negatif)



Şekil 4. 17. *Empoasca* spp ve *Asymetresca* spp.'nin karışık bir görüntüsü



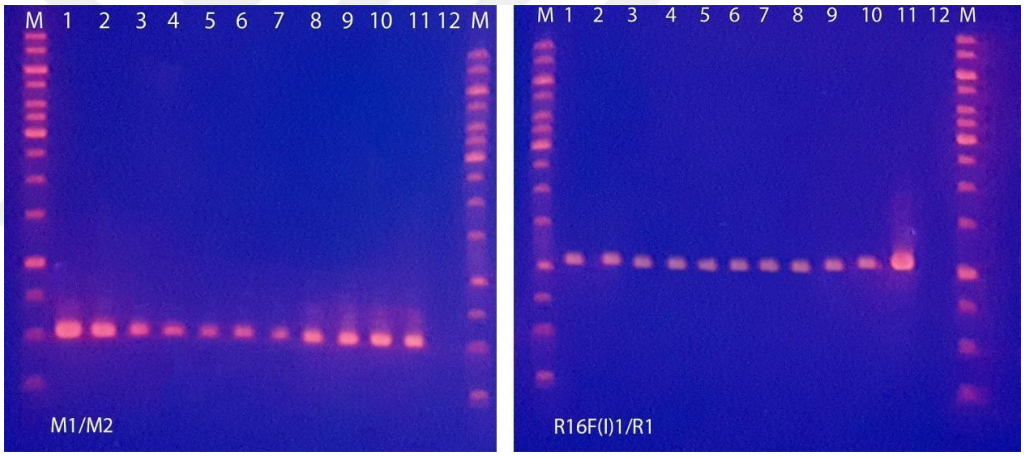
Şekil 4. 18. *Dictyophara europaea* L. türünün tersten çekilmiş bir görüntüsü



Şekil 4. 19. *Sogatella vibix* (Haupt, 1927) emici böceği

4.2. Fitoplazmaların tespiti ve Tanılanması ile İlgili Bulgular

Moleküler tanılamanın ilk adımı olarak Klasik ve Nested-PCR yöntemleri kullanılmış ve fitoplazmaların 16S rRNA geninin bir kısmını çoğaltan P1/P7 veya R16F1/R0 primer çiftleri ile R1F2n/R2 primerlerinin çoğalttığı örnekler fitoplazma pozitif olarak kaydedilmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ancak R16F2n/R2 primerleri ile Nested-PCR'da negatif sonuç veren örneklerde ise PCR ürünleri 1/200 oranına kadar sulandırılarak M1 ($16R_{758F}$)/M2 ($16R_{1232R}$) üniversal primer çiftleri ile yeniden testlenmiştir. Bu şekilde üç adet asma bitkisi örneğinden pozitif sonuç alınmıştır. M1/M2 ve R16F(I)1/R1 primerlerinin çoğalttığı fitoplazmaya özgü 16SrDNA gen parçalarının agaroz jel üzerindeki görüntüleri Şekil 4. 20'de gösterilmiştir.



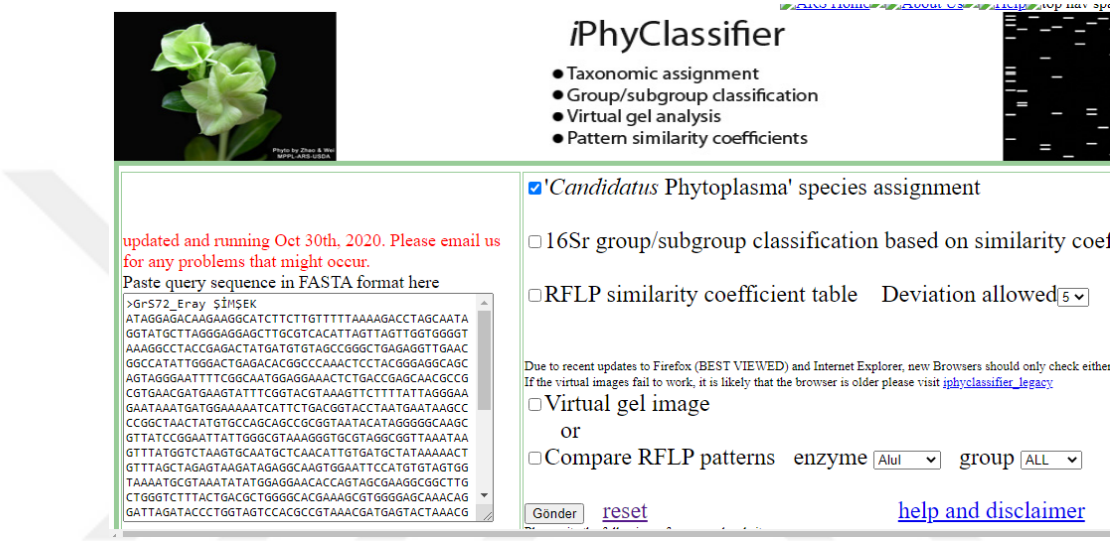
Şekil 4. 20. M1/M2 primerlerinin çoğalttığı yaklaşık 0.5 kb uzunluğundaki fragmentler ile R16F(I)1/R1 primerlerinin çoğalttığı fitoplazmaya özgü 16SrDNA gen fragmentlerinin görüntüsü.

Fitoplazmaların sınıflandırılması biyolojik, fitopatolojik ve genomik özellikler ile farklı türlerin birbirine %97.5'lik bir eşikte benzerlik gösterdiği 16S rRNA geninin genetik çeşitliliğine dayandırılarak yapılmaktadır (Firrao ve ark., 2004).

Bu çalışmada tüm örnekler test edildiğinde 16Sr sınıflandırmasına göre 16SrI ve 16SrXII grubu fitoplazmaların varlığı tespit edilmiştir.

Şekil 4. 20'de sadece 16srI, II, XII, XV ribozomal grupları çoğaltan grup spesifik primerlerin ürünleri görülmektedir.

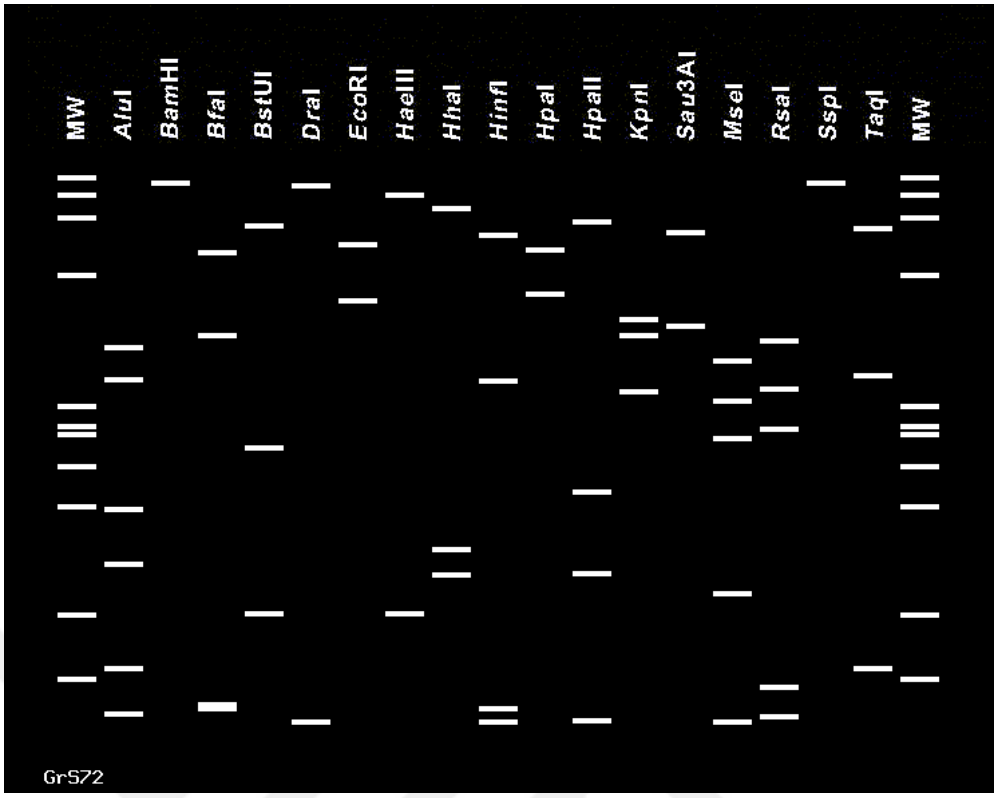
F2n/R2 ürünlerinin DNA dizilemesinden sonra elde edilen veriler ile daha detaylı analizler yapılmıştır. *i*PhyClassifier programında öncelikle tür teşhisi yapılmış (Şekil 4. 21), daha sonra DNA dizileri in silico enzim kesimleri için kullanılmıştır.



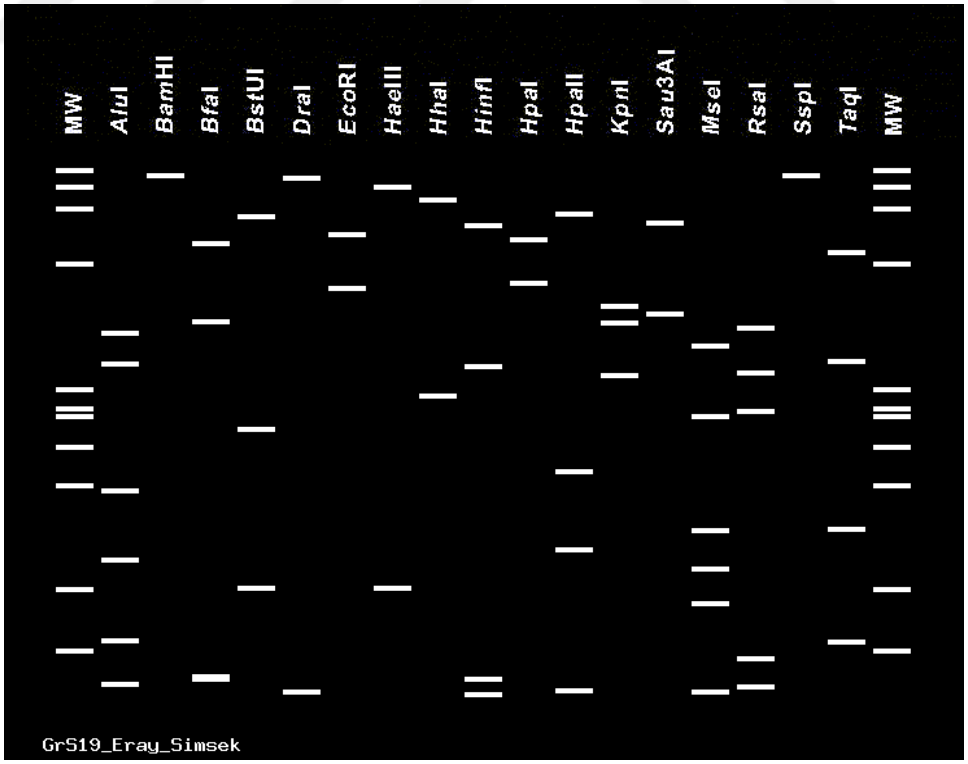
Şekil 4. 21.*i*PhyClassifier online sınıflandırma programının kullanımına dair bir görsel

RFLP enzimlerinden fitoplazma tür teşhisinde en yaygın kullanılan 17 adet enzim ile Grs19 ve GrS72 kodlu izolatların 16SrDNA gen bölgesinin F2n/R2 ürünlerinin kesimi sonuçları 16Sr ribozomal gruplandırmayı mümkün kılmıştır. Bunun sonucunda elde edilen izolatların hangi ribozomal grupta olduğu teşhis edilmiştir.

Bu izolatların *in silico* jel görüntüleri Şekil 4. 22 ve Şekil 4. 23'de gösterilmiştir. *i*PhyClassifier programı ile birçok güncel çalışma fitoplazmaları tanılamakta ve tutarlı *in silico* kesim profilleri elde etmektedir (Alsaheli ve ark., 2020; Porotikova ve ark., 2020). Nitekim bu çalışmada da fitoplazmaların 16Sr ribozumal grup tanılaması, DNA dizilerini elde ettikten sonra başarı ile yürütülmüştür. Aynı grup içerisinde olan tüm dizilerin birbirleri ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4. 22. GrS72 izolatının 17 RFLP enzimi ile in silico kesim görüntüleri

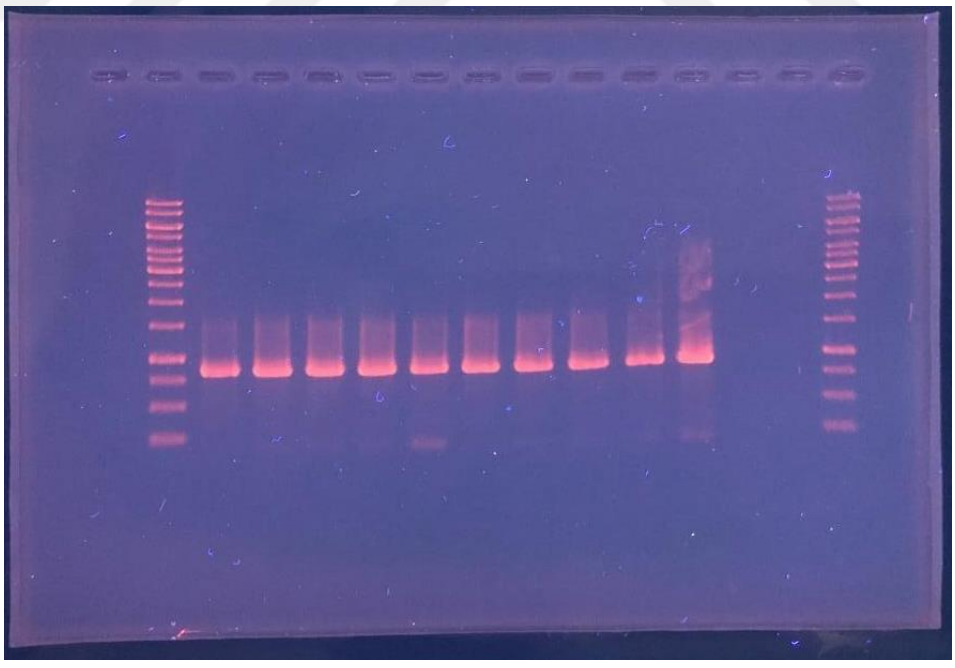


Şekil 4. 23. GrS19 izolatının 17 RFLP enzimi ile in silico kesim görüntüleri

4.3. '*Ca*.P. solani' nin *Tuf, VMP*1 ve *SecY* Gen karakterizasyonu ile ilgili Bulgular

Nested-PCR'da F2n/R2 üniversal primer çifti ürünlerinden pozitif sonuç alınan izolatların total DNA'ları kalıp olarak kullanılmış ve *VMP*1, *Tuf, SecY* ve *Stamp* genlerinin uygun primerler ile belirli kısımlarının amplifikasyonu başarı ile yapılmıştır.

Langer ve Maixner (2004) asma üretim alanlarındaki vektör böcek, yabancıot ve asmalardan saptanan fitoplazmaları *tuf* genine dayalı PCR-RFLP analizleri sonucu üç farklı *tuf* geni profili (*tuf* I-III) olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da asmalardan ve *Convolvulus arvensis'*ten elde edilen *'Ca*.P. solani' etmenlerinin DNA'larından Tuf genine dayalı olarak Ftuf1/Rtuf1 primerlerinin PCR ürünleri 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra FtufAY/RtufAY primerleri ile Nested-PCR yapılmıştır. Bu işlem sonucunda yaklaşık 0,9 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir (Şekil 4. 24).

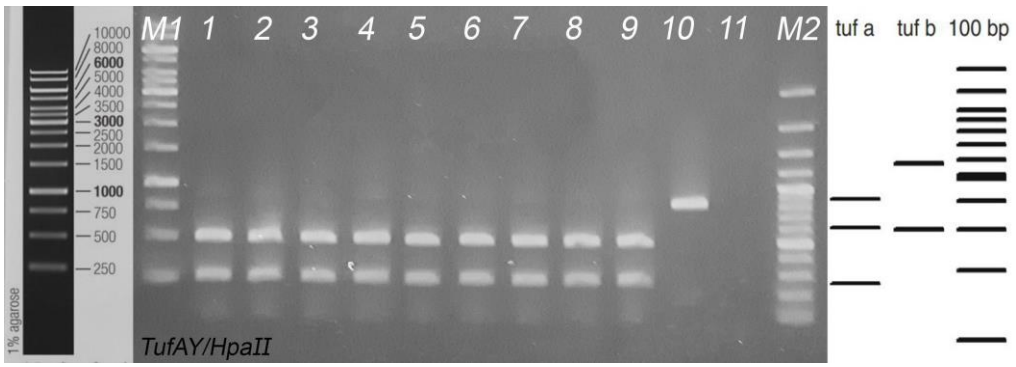


Şekil 4. 24. FtufAY/RtufAY primerlerinin çoğalttığı Tuf geni fragmentleri

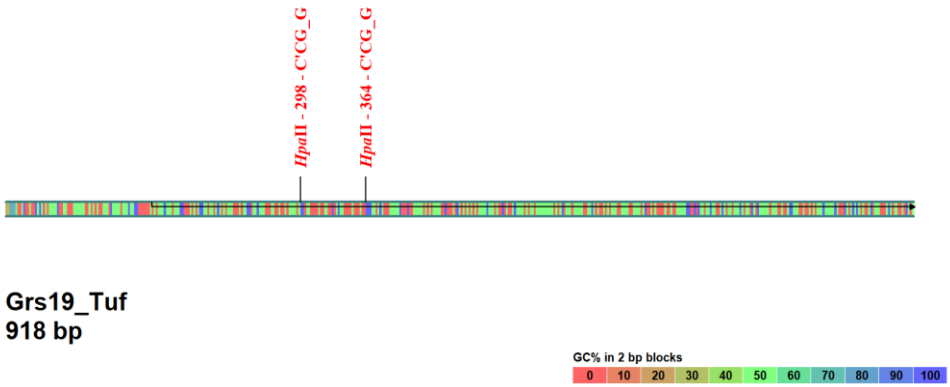
FtufAY/RtufAY primerlerinin çoğalttığı PCR ürünleri daha sonra Tuf alt tipinin belirlenmesi için *Hpa*II RFLP endonükleaz enzimi ile kesim işlemine alınmış ve izolatların tamamının Tuf-Tip-b olduğu saptanmıştır.

Langer ve Maixner (2004) Tuf tiplemesine dayalı olarak Stolbur fitoplazmasının doğada üç farklı yaşam döngüsü olduğu ileri sürülmüştür. Çalışma sonucuna göre house-keeping *Tuf* genine dayalı tiplemede *Tuf-a* tipi *Urtica dioca* ile ilgili yaşam döngüsüne girerken, *Tuf-b* tipi ise *Convolvulus arvensis* ile ve *Tuf-c* tipi *Calystegia sepium* ile ilişkili yaşam döngüsünde yer aldığı saptanmıştır.

Tuf geni patojenin protein taşıma-uzama faktörü EF-Tu proteinini kodlamaktadır. EF-Tu aktifleştiğinde protein taşınma sürecinde enerji sağlamaktadır. *Tuf* ekolojik epidemiyolojik ve taksonomik çalışmalarda belirteç olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Fitoplazma kaynaklı tuf genotipleri ile konukçu bitkiler ve böcek vektör ekolojileri arasında özel bir ilişki bulunmakta olduğu daha önceki çalışmalarda da çokça rapor edilmiştir. Şekil 4. 25'te Tuf geni için kesim profilleri gösterilmiştir. Şeklin sağ tarafına Tuf-a ve -b kesim profilleri yerleştirilmiş ve görüldüğü üzere tüm örneklerin tuf-b tipinde olduğu saptanmıştır. Blast analiz sonuçları da bu analizi doğrulamıştır. Şekil 4. 26'da DNA dizisinin kesim profilinde de benzer sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4. 25. FtufAY/RtufAY primerlerinin HpaII kesim profilleri. 1-4 Asmalardan elde edilen fitoplazma, 5-6 antepfıstığı, 7-9 *Convolvulus arvensis'*ten elde edilen fitoplazma DNA'sı. 10 numarada kesilmemiş bir örnek bırakılmış ve 11 numara negatif kontrolü göstermektedir. Soldaki marker 1 kb'lik DNA ladder iken sağtaki ise 100bk'lik DNA'ladder dizisidir. en sağdaki Tuf-a ve Tuf-b'nin in silico kesimi izolat ayrımını netleştirmek için eklenmiştir.

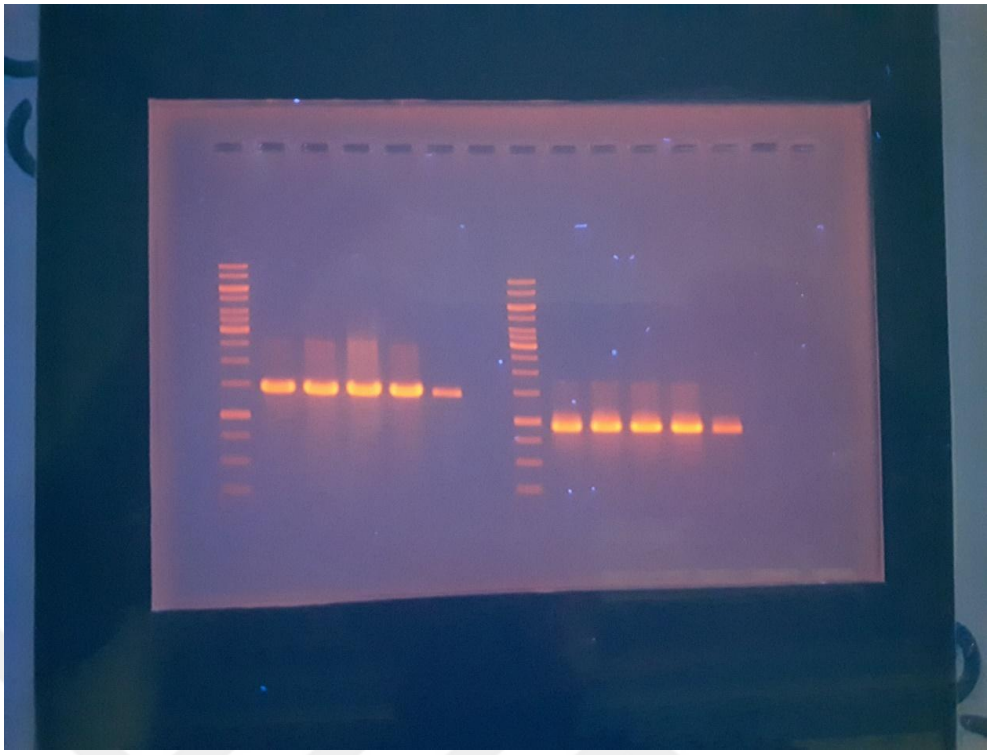


Şekil 4. 26. Grs19 izolatının Tuf geni fragmentinin *Hpa*II kesim profili

Bu çalışmada da asmalardan elde edilen fitoplazmaların *Convolvulus arvensis* ile ilişkili Tuf-b tipi olduğu saptanmıştır. Temsilci izolatlar seçilerek bu örneklerin çift yönlü DNA dizilenmesi yapılmıştır. Adıyaman ve Şanlıurfa illerindeki '*Ca.*P. solani' etmenleri açısından ilgili genler bakımından %100 sekans homolojisi gözlenmiştir.

*VMP*1 geni için Cimerman ve ark. (2009) tarafından önerilen STOLH10F1/R1 primer çiftleri kullanılarak Direkt PCR işlemi yapılmış ve örneklerin 1/150 oranında sulandırılması ile elde edilen kalıp DNA'lar Fialová ve ark. (2009) tarafından önerilen TYPH10F/R primer çiftleri ile Nested-PCR işlemi sonucunda yaklaşık olarak 1.4 kb uzunluğunda amplikonlar başarılı bir şekilde elde edilmiştir. *Sec*Y geni için ise Fialová ve ark. (2009) tarafından önerilen PosecF1/R1 primerlerinin çoğalttığı ürünler 1/150 oranında sulandırılmış ve PosecF3/R3 primerleri ile Nested-PCR yapılmış ve yaklaşık 0.99 kb uzunluğunda amplikonlar başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 4. 27).

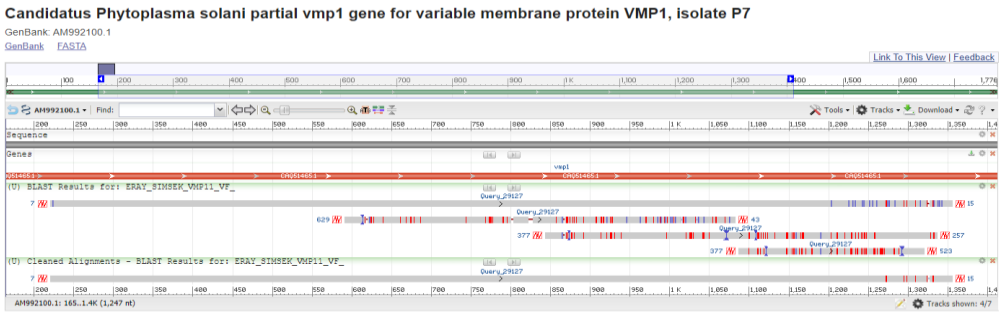
16SrDNA geninin aksine, VMP1, SecY ve Tuf genleri fitoplazmalarda çeşitli proteinleri kodlamaktadır. Bundan dolayı konukçu değiştiğinde bu protein kodlayan genlerdeki dizilerin de değişmesi beklenir. Ancak bu çalışmada elde edilen tüm örnekler birbirleri ile tüm genler bakımından %100 homoloji göstermiştir.



Şekil 4. 27. VMP1 geni üzerinden TYPH10F/R primerlerinin çoğalttığı 1.4kb uzunlığundaki bantlar (solda) ve SecY geni üzerinden PosecF3/R3 primerlerinin çoğalttığı yaklaşık 0.99 kb uzunluğundaki bantlar (sağda)

TYPH10F/R ürünlerinin VMP1 geni için genetik varyasyon gösterip göstermediğini belirlemek için *Rsa*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP işleminde tabi tutulmuş ve GenBankasında kayıtlı diğer izolatlar ile karşılaştırılmıştır. GrS19 izolatı VMP1 genine dayalı olarak BLAST analizi sonucuna göre AM992100.1 GenBank erişim numaralı P7 izolatı ile %97.45 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. P7 izolatı Lübnan'da bir *Catharanthus roseus'*dan izole edildiği Murolo ve ark. (2010) tarafından dapor edilmiştir. P7 izolatı ile ilgili olarak yapılan detaylı BLAST analizleri sonucu oluşturulan görsel Şekil 4. 28'de gösterilmiştir.

BLAST ve diğer analizlerin yanı sıra VMP1 geni için RFLP tabanlı tipleme yöntemi, izolatlarımızın ekolojisini ve coğrafi epidemiyolojisini araştırmak için yararlı bir araç olarak kullanılmıştır.



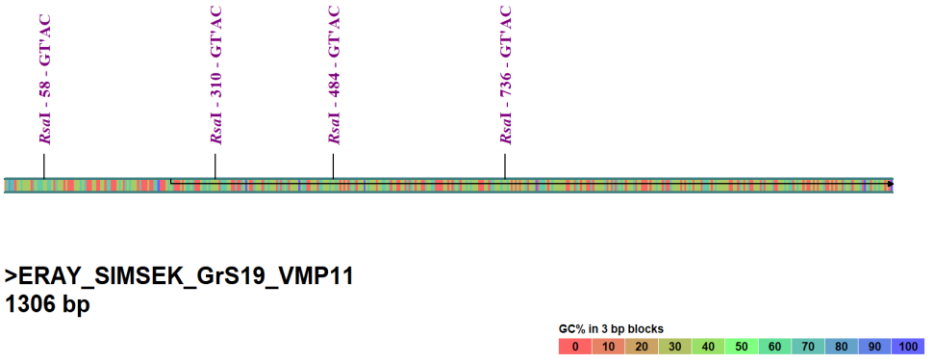
Şekil 4. 28. GenBankasından çekilen P7 izolatı ve GrS19 izolatının detaylı BLAST analizi sonucu

'*Ca*.P. solani' için Quaglino ve ark. (2016) tarafından sınıflandırılan 21 adet VMP1 alt tiplerinin elde edildiği bölge ve gen bankası için erişim numaraları Çizelge 4. 2'de verilmiştir. Ayrıca dünyadaki diğer VMP varyantları da karşılaştırmalarda kullanılmıştır (EK1).

Çizelge 4. 2. VMP1 genine dayalı filogenetik ilişkilerin belirlnmesinde kullanılan izolatlar (Quaglino ve ark. (2016)'dan ve SEE-ERANET isimlendirme (X. Foissac, France) modifiye edilmiştir.

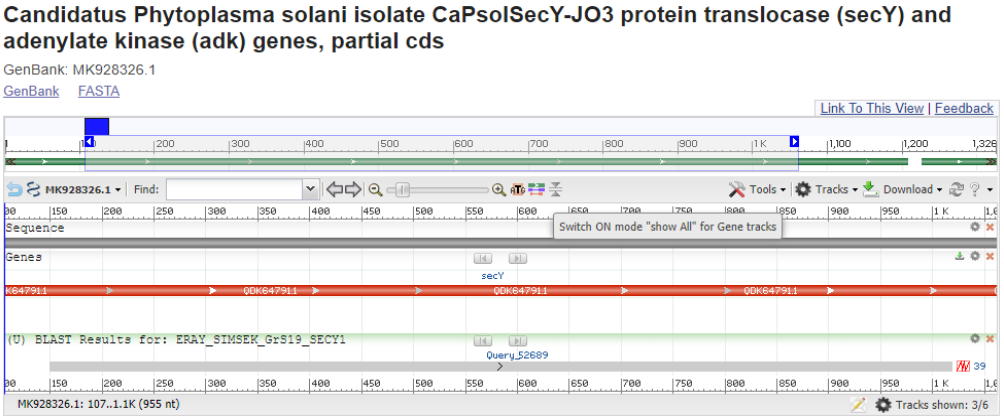
VMP1 Profili	Strain adı	Sekans varyantı	Konukçu	Bölge	GenBank Erişim no
V1	S13	VM1	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008616
V2	GGY	VM12	*Vitis vinifera*	Almanya	AM992102
V2-TA	Vv12 Kn6	VM14	*Vitis vinifera*	Avusturya	KJ469734
V3	Aa25	VM15	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008614
V4	Aa16	VM27	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008602
V5	19-25	VM34	*Vitis vinifera*	Almanya	AM992101
V7	SFRT1	VM37	*Vitis vinifera*	İtalya	KJ129606
V8	LG	VM38	*S.lycopersicum*	Fransa	AM992097
V9	MP49	VM40	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008607
V11	B2035	VM41	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008611
V12	Mvercer2	VM44	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008612
V14	B49	VM47	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008604
V15	C6	VM51	*Vitis vinifera*	İtalya	HM008618
V16	T2_92	VM55	*S.lycopersicum*	İtalya	AM992106
V17	36861_SLO_C	VM56	*C.arvensis*	Slovenya	JQ977741
V18	MK94	VM59	*Vitis vinifera*	Makedonya	KF957606
V23	Vv12_274	VM61	*Vitis vinifera*	Avusturya	KJ469726
V-Unr	Vv12_Ill6	VM63	*Vitis vinifera*	Avusturya	KJ469733
Und1	Carv2	VM65	*C.arvensis*	Gürcistan	KT184868
Und2	Kisi38	VM70	*Vitis vinifera*	Gürcistan	KT184873
Und3	Amla77	VM73	*Vitis vinifera*	Gürcistan	KT184876

Şekil 4. 29Şekil 4. 29'da GrS19 izolatının VMP1 geni fragmentlerinin RsaI enzimi ile *in silico* kesim profili görülmektedir.



Şekil 4. 29. GrS19 izolatının VMP1 genine dayalı TYPH10F/R primer ürünlerinin *Rsa*I kesim profili

*Sec*Y genine dayalı tanılamada, herhangi bir tiplendirme bulunmadığından, bu izolatın sadece DNA dizisi ile Blast ve *in silico* enzim kesimleri yapılmıştır. GrS19 izolatı GenBankasına Ürdün'den yüklenen CaPsolSecY-JO3 isimli (GenBank erişim no: MK928326.1) izolat ile %100 benzerlik göstermiştir (Şekil 4. 30).



Şekil 4. 30. GenBankasından çekilen CaPsolSecY-JO3 izolatı ve GrS19 izolatının detaylı BLAST analizi sonucu

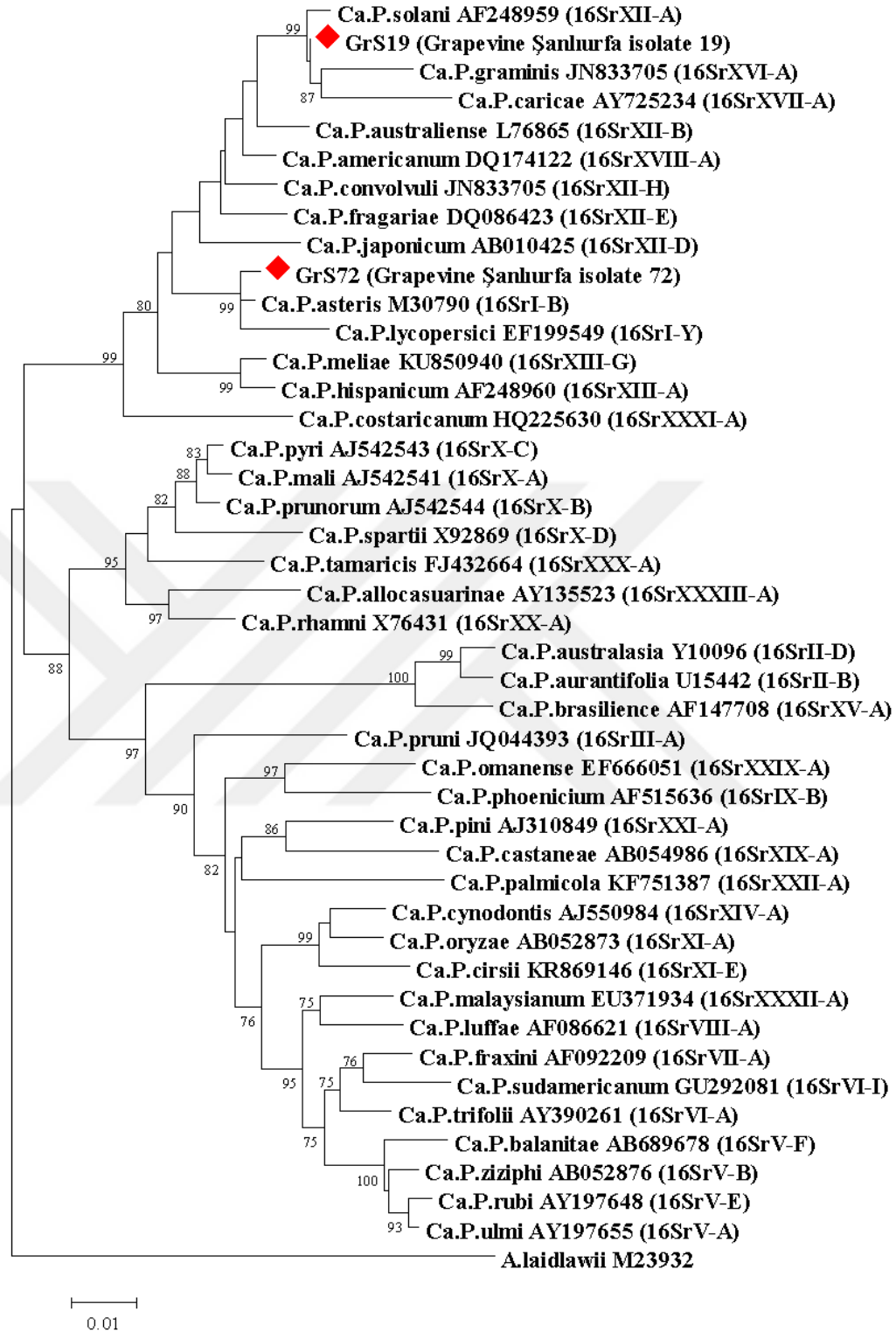
Bu çalışmadan elde edilen temsilci izolatların DNA dizileri EK2'de bölümünde FASTA formatında verilmiştir.

4.4. Fitoplazma İzolatlarının Filogenetik Analizleri

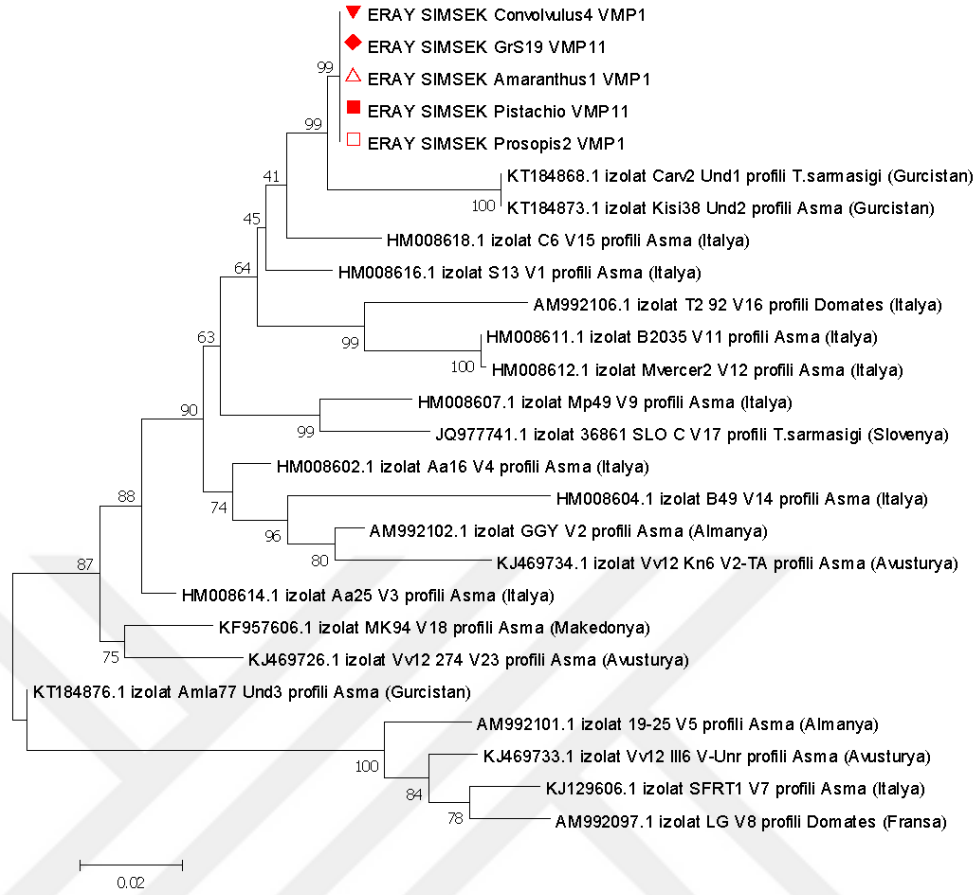
Fitoplazma tanı ve coğrafik tiplendirme çalışmalarında PCR'den elde edilen ürünlerin RFLP analizleri epidemiyolojik çalışmalarda fitoplazmaların tanılanmasında önem arzetmektedir. RFLP analizi DNA'nın bir restrüksiyon endonükleaz enzimi kullanarak kesilmesi (ıslak RFLP) veya dizi bilgisi ile bilgisayar destekli kesilmesi (*in silico* RFLP) esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada da DNA dizisi belirlenen fitoplazmaların in silico RFLP kesim profilleri incelenmiş ancak bu DNA dizilerinin filogenetik analizlerde kullanılması sonucu elimizdeki izolatların dünyadaki diğer teşhis edilmiş izolatlar ile evrimsel yakınlık-uzaklık analizleri yapılmıştır.

Tüm izolatların birbirleri ile 16SrDNA geni bakımından %100 benzer profil sergiledikleri tespit edilmiştir. Elde edilen izolatlar içinden temsilci iki adet izolat seçilerek bununla ilgili 16SrDNA genine dayalı bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4. 31).

16SrXII grubu fitoplazmalar için Cimerman ve ark. (2009) 16SrDNA geni ve VMP1 genine dayalı olarak çok fazla sayıda çeşitlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışmada tüm örnekler tek bir profil göstermiştir ve bu profil Şekil 4. 32'de gösterilen filogenetik ağaçtan da elde edilen verilere göre, GrS19 izolatı VMP1 geni bakımından Und1 ve Und2 tipli Gürcistan'dan GenBankasına yüklenen sekanslar ile aynı klad içerisinde yer almıştır. Türkiyenin sınır komşusu Gürcistan'daki *Convolvulus* spp. ve *Vitis* spp. örneklerinden elde edilen 16SrXII-A grubu fitoplazmanın VMP1 geni bizim elde ettiğimiz izolatlar ile yüksek düzeyli homoloji göstermiştir. Bu durum, yakın coğrafi bölgeler arasındaki üretim materyallerinin hareketliliği ile hastalığın taşınabileceği ihtimalini düşündürmüştür. Hastalık uygun bir vektör bulunmaması sonucu (herhangi bir epidemi göremediğimiz için) sadece enfekteli üretim materyali ile bölgeye yayılmış olabilir. Bu yayılma başlangıçta yavaş gibi görünse de, uygun bir vektör böcek varlığında bölgedeki yerel asma üretim alanlarında gelecekte ciddi ekonomik kayıplara neden olabilir.



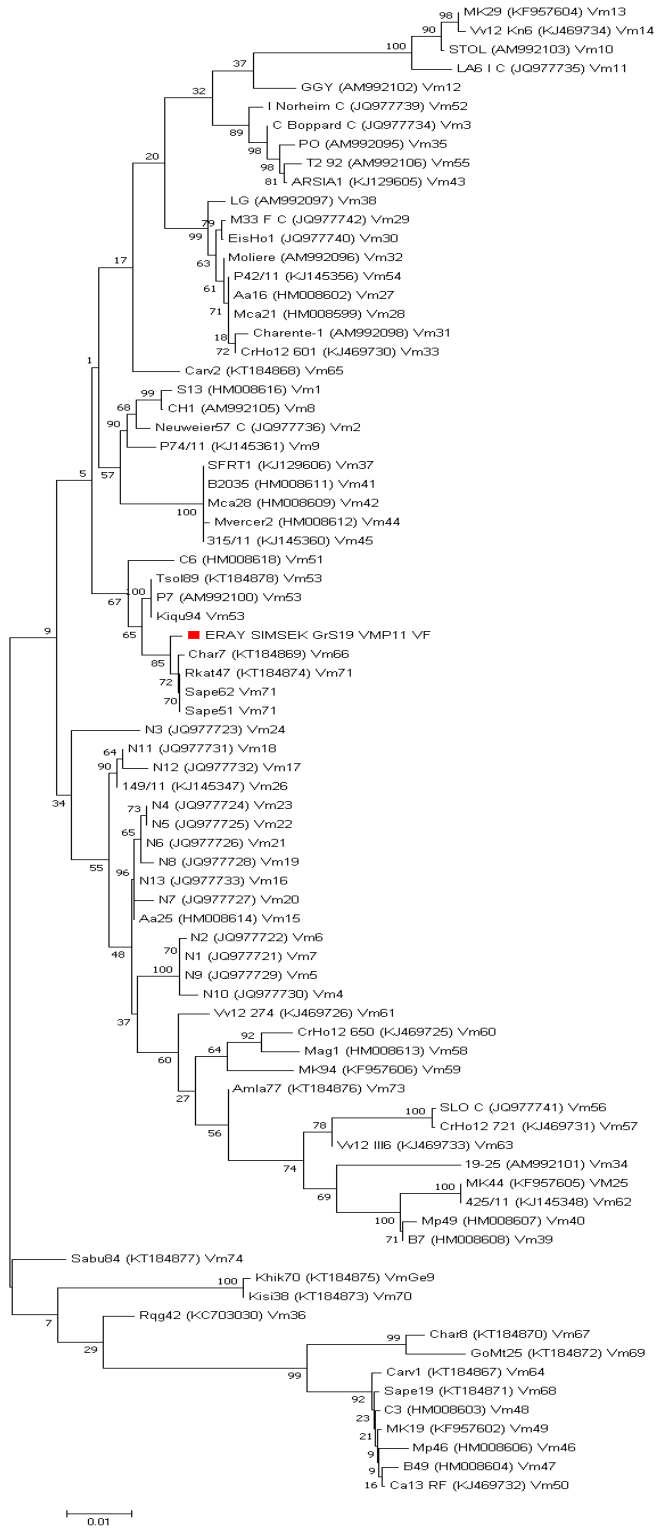
Şekil 4. 31. GrS19 ve GrS72 kodlu izolatların diğer bilinen fitoplazmalar ile akrabalık ilişkilerini gösteren, Neighbour-Joining metodunu esas alan bir filogenetik ağaç (Bootstrap örnekleme değeri 1000 olarak ayarlanmıştır).



Şekil 4. 32. VMP1 genine dayalı 21 adet tiplendirmenin temsilci izolatlar ile filogenetik ilişkisini gösteren dendogram.

Gen Bankasından elde edilen verilere dayalı olarak 78 adet VMP1 tiplemesi ile oluşturulan daha detaylı bir filogenetik ağaç ise Şekil 4. 33'te gösterilmiştir. Bizim izolatlarımız 1000 bootstrap değerindeki tekrarlamaya göre, VM66 ve VM71 varyant izolatları ile aynı klad içerisinde yer almıştır. Bunlar içerisinde Char7 ve Rkat47 izolatları yine Gürcistan kaynaklı *Vitis vinifera* ve *Convolvulus* spp. örneklerinden elde edilen fitoplazmaların VMP1 geni varyantlarıdır. Bu filogenetik ağacı oluşturan ve diğer çalışmalarda yaygın olarak kullanılan VMP1 varyantları ve Stamp geni varyantları EK2'de GenBankası erişim numaraları ile birlikte verilmiştir.

VMP1 geni bu çalışmada kullanılan diğer gen tiplemelerine göre daha detaylı bir şekilde coğrafi yayılışını da içeren bir kümelemeyi mümkün kılmıştır. VMP1 geni güncel çalışmalarda yaygın olarak moleküler markör olarak kullanılmaktadır (Conigliaro ve ark., 2020; Passera ve ark., 2020).



Şekil 4. 33.GenBankasındaki tüm'Ca.P.solani' VMP1 tiplerinin GrS19 izolatı ile filogenetik ilişkisi

4.5. Fitoplazmaların Küsküt ile Taşınması ile ilgili Bulgular

Küsküt (*Cuscuta* spp.) kökleri ve yaprakları bulunmayan tam parazit bir bitkidir. Enfekte ettiği bitkinin öz suyu ile beslenmekte ve yaşamını sürdürmektedir. Beslenme esnasında bitki floem dokularında ve öz suyunda bulunan virüsleri ile fitoplazmaları de bünyesine almaktadır. Bitkiden bitkiye küsküt köprüsü kurulduğunda, parazit beslenirken fitoplazmayı da bu şekilde bulaştırmaktadır. Bu özelliği kullanılarak küsküt vasıtasıyla hastalıklı bitkiden sağlıklı bitkiye fitoplazma taşınması gerçekleştirilmiştir. Küsküt tarladan toplandıktan sonra fitoplazma varlığına karşı testlenmiş ve negatif sonuç veren küsküt sürgünleri taşıma çalışmalarında kullanılmıştır. Tarlalardan toplanan küskütlerin hiçbirisinde fitoplazma etmeni bulunmadığı saptanmıştır. Přibylová ve Špak (2013) protokolünde önerilen adımlar takip edilmiş ve tarladan toplanan bazı bulaşık asmalardaki fitoplazmalar *Catharanthus* spp. küsküt köprüsü yöntemi kullanılarak aktarılmıştır (Şekil 4. 34).



Şekil 4. 34. Emeçleri ile Catharanthus sp. bitkisine tutunmuş ve hastalık taşımaya hazır bir küsküt

Asma yaprak döktüğünde de elimizde bulaşık bitki bulunması açısından ve karakterizasyon çalışmalarında fitoplazma konsantrasyonunun bitkide arttırılması kısmi olarak gerçekleştirilmiştir. Küsküt emeçleri iki bitkiye de yapıştıktan sonra

yaklaşık olarak 60 gün sonra testlenmiş negatif olan bir bitkinin fitoplazma ile enfektelendiği tespit edilmiştir.

Catharanthus spp.'de stoklanan fitoplazmalar daha sonra sağlıklı olan asma kalemlerine küsküt ile 60 gün bulaştırmalar yapılmış ve bunun sonucunda bitki tepkilerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Fitoplazmaların bitkilerde konsantrasyonlarının ayarlanamaması ve bitki moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik tepkilerinin ölçülmesindeki zorlukları kısmi olarak azaltan bu yöntem yeni bir metod olarak kullanılabilir. 16SrI ribozomal grubunun küsküt ile *Catharanthus* sp. bitkisine verildikten sonra bitkide oluşan virescence ve phyllody şeklindeki tipik fitoplazma belirtileri Şekil 4. 35 ve Şekil 4. 36'da gösterilmiştir. Şekil 4. 37'de ise hastalık taşıma çalışmalarında kullanacak bitkisel materyalin bir kısmı gösterilmiştir.



Şekil 4. 35.*Catharanthus roseus*'dan küsküt ile fitoplazma taşındıktan sonra ortaya çıkan virescence ve phyllody belirtileri.



Şekil 4. 36. *Catharanthus roseus*'da çiçeklerde yaprak benzeri yapıların oluşması belirtisi (Phyllody)

Birçok fitoplazma türüne uygun konukçuluk ettiği bilinmesinden dolayı deneysel çalışmalarda taze dokuya ihtiyaç duyulduğunda *Catharanthus roseus* L. kullanılmıştır (Marcone ve ark., 1997). Deneysel konukçu olarak pervane çiçeği hem fitoplazmalara uygun konukçuluk etmesi, hem de uygun koşullarda yaprak dökmeden her mevsim yapraklı kalmasından dolayı tercih edilmiştir. Ayrıca pervane çiçeği fitoplazma ile enfektelendiğinde hastalık belirtilerini kısa sürede göstermektedir (Hodgetts ve ark., 2013). Fitoplazmalar odunsu bitkilerde düşük konsantrasyonlarda bulunması ve bitkide homojen olmayan bir dağılım sergilemesi bazı durumlarda tanılamayı zorlaştırmıştır. Ancak pervane çiçeği bunun tam tersi bir profil sergilemekte ve fitoplazmaları bünyesinde yüksek konsantrasyonda barındırabilmektedir.

Küsküt konukçusuyla fiziksel bağlantılar oluşturarak konukçusundan su ve besin maddelerini almaktadır (Jeschke ve ark., 1994). Besin maddesi alışverişi esnasında bulaşık bitkinin floem dokularında bulunan fitoplazmaları hücreleri de küskütün kendi bünyesine alınmaktadır. Bu küsküt yeni bir konukçuya inokule edildiğinde ise bünyesindeki fitoplazmaları sağlıklı konukçuya aktarabilmektedir.

Patojen taşınmasının başarısı küskût'ün cinsine ve patojenin türüne bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada küskütler hastalıklı konukçu ile sağlıklı bitkiye aynı anda inokule edildiğinde konukçular arasında fitoplazmaları kolaylıkla taşıdığı saptanmış ve tarlalardan toplanan enfekteli bitkilerin bazıları için karakterizasyon çalışmalarında bu yöntem kullanılmıştır .

Küsküt emeçleri ile konukçu bitkiler arasında köprü kurduktan sonra 10 gün süre ile beklenilmiş ve konukçular üzerinden temizlenmiştir. Küsküt köprüsüne iki ay maruz kalan bitkilerden yaprak örnekleri alınmış ve bunlar çeşitli analizlerde kullanılmıştır.



Şekil 4. 37. Hastalık taşıma çalışmalarına bitkisel materyal hazırlığından bir görsel

4.6. Asmada Bitki Savunma Tepkileri ile ilgili Bulgular

Sağlıklı ve '*Ca*.P.solani' ile enfekte edilmiş asma bitkilerinin yapraklarından bir takım analizler ile fitoplazmanın bitkideki oluşturduğu biyokimyasal ve fizyolojik etkileri araştırılmıştır. Kalemlerin içinde bulunduğu gelişme dönemi, inokülasyonda kullanılan fitoplazma enfekteli ana bitki, inokülasyonda kullanılan fitoplazma

konsantrasyonu ve kullanılan küsküt ile inokülasyon metodu asma kalemlerinde dayanıklılık profillerinin belirlenmesinde etkili sonuçlar vermiştir. Hönüsü çeşidine ait köklendirilen kalemde hastalık belirtisinin erken evrelerde ortaya çıkması Şekil 4. 39'da gösterilmiştir. Analizler için örnek olarak kulanılan fitoplazma pozitif ve negatif bitkilere ait görseller Şekil 4. 38'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 38. Analizlerde kullanılan sağlıklı (solda) ve '*Ca*.P. solani' ile bulaşık kalemler.



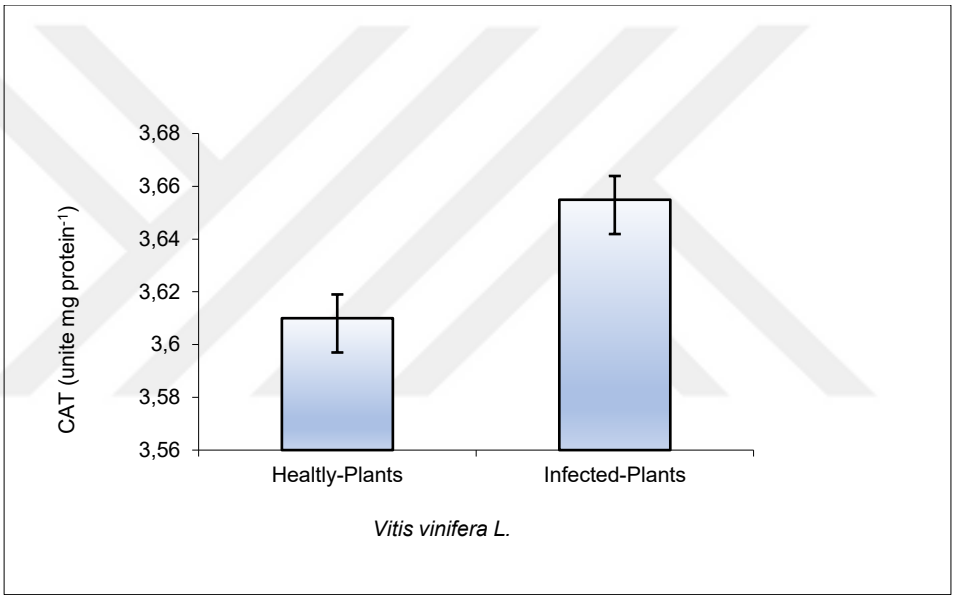
Şekil 4. 39. Köklenmeden sonra çıkan ilk yapraklardaki sararma hastalık belirtileri

4.6.1. Asmada '*Ca*.P. solani' ve Oksidatif Stres ilişkisi

Fitoplazma enfeksiyonunun yapraklarda katalaz aktivitesine etkileri;

Yetiştirilen bitki yapraklarından katalaz enzim aktiviteleri Milosevic ve Slusarenko (1996) tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. Bu analizde yapraklardaki katalaz aktivitesi H_2O_2 parçalanmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayalı olarak ölçülmüştür.

Kloroplast ve mitokondri gibi organellerde H_2O_2 indirgeyen askorbat peroksidaz ve glutayon redüktaz, H_2O_2'nin etkili olarak katalizleyen katalaz ve süperoksit radikallerini detoksifiye eden süperoksit dismutaz'ı bünyesine aldığı bilinmektedir (Scandalios ve ark., 1997). Biyotik veya abioyotik stres kaynaklı bitki hücrelerinde meydana gelen süperoksit radikalleri, SOD enziminin müdahalesi ile hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüştürülür. SOD tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucunda oluşan ve güçlü bir oksidant olan H_2O_2'nin hücrelerde birikmesi, askorbat- glutatyon veya katalaz siklusu ile önlendiği bilinmektedir.



Şekil 4. 40. Sağlıklı ve '*Ca*.P.solani' bulaşık asmaların yapraklarında ölçülen CAT değerleri

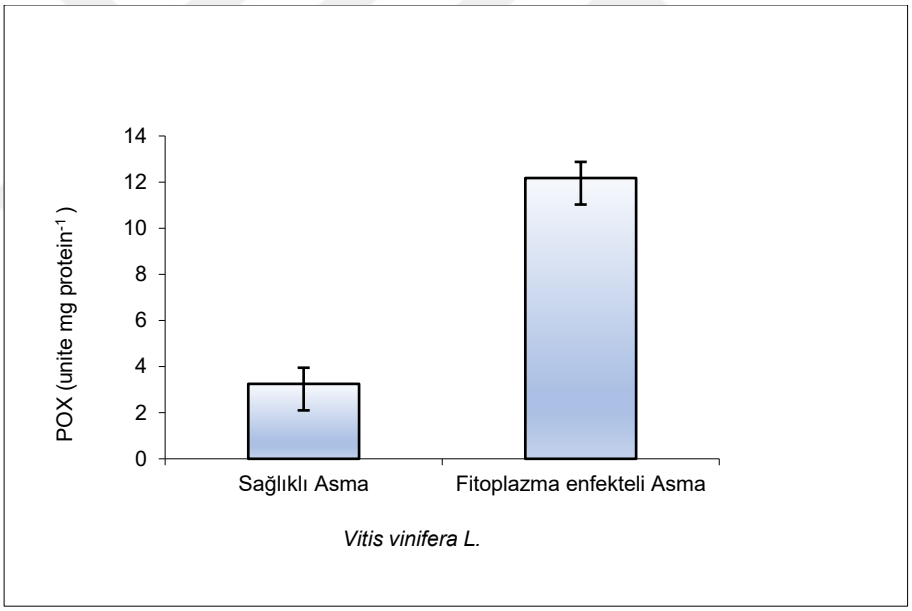
Aslında katalaz enzim aktivitesi birçok abiyotik stres koşullarına tepki olarak iyi bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Poli ve ark., 2018). Ancak Hameed ve ark. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada *Vigna radiata'*da (maş fasülyesi) fitoplazma enfeksiyonu altında katalaz aktivitesinin önemli düzeyde azaldığını rapor etmişlerdir.

Fitoplazma enfeksiyonunun asmalarda katalaz enzimine etkisini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Musetti ve ark. (2007) Asma bitkisi için FD fitoplazma enfeksiyonundan iyileşme sonucu etkisi sonucu katalaz enzim aktivitesinin düştüğünü rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise asmalarda fitoplazma enfeksiyonu katalaz enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir (Şekil 4. 40). Bu çalışmada elde

edilen verilere göre asmalarda katalaz enzim aktivitesi farklı bir savunma mekanizmasında rol oynuyor olabileceğine işaret etmektedir. Doğal olarak enfeksiyon sonucu hücrelerde serbest oksijen radikallerinin arttığı bilinmekte ve bu radikallerin hücre sağlığı açısından indirgenmesi ve seviyelerinin düşürülmesi gerekmektedir. Bu çalışmada enzim aktivitesinin artış göstermesi, patojenin hücre içi metabolizmada önemli hasarlara yol açtığını ve bunun düşürülmesi için enzim faaliyetlerinin arttığı görülmüştür.

Fitoplazma enfeksiyonunun yapraklarda peroksidaz aktivitesine etkileri;

Bitki yapraklarından POX analizleri Cvikrova ve ark. (1994)'ün metoduna göre yürütülmüştür.



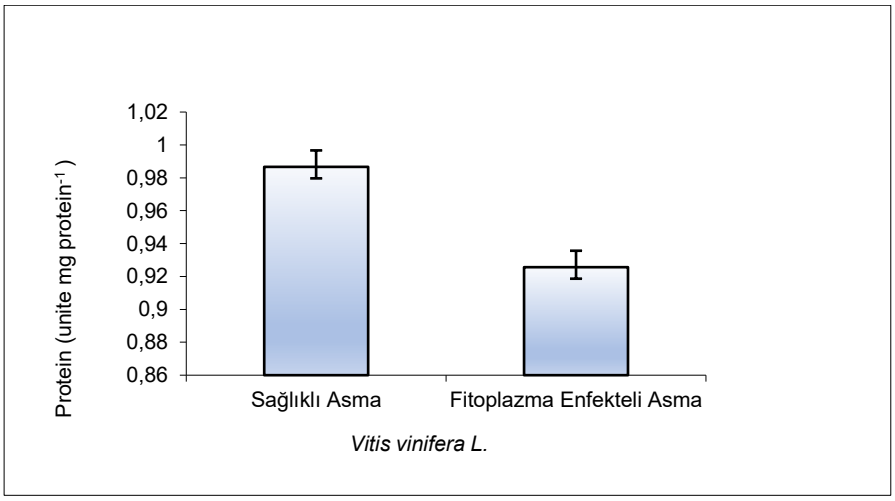
Şekil 4. 41. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki POX enzim aktivitesi

Bu çalışmada '*Ca*.P.solani' fitoplazma enfeksiyonuna sahip bitki yapraklarındaki peroksidaz aktivitesinin sağlıklı bitkilere nazaran yaklaşık dört kat arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Junqueira ve ark. (2011) mısırlarda fitoplazma enfeksiyonunun peroksidaz enzim aktivitesini 2.5 kat arttırdığını rapor etmiştir. Benzer şekilde elmalarda da fitoplazma enfeksiyonunun peroksidaz enzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Patui ve ark., 2013). Enzim aktivitesindeki bu

gibi artışlar çeşitler arasında karşılaştırılarak dayanıklı veya tolerant çeşitler elde edilebilir olduğu zaten bilinen bir olgudur (Ryals ve ark., 1996). Bu çalışmada sadece Hönüsü çeşidindeki fitoplazma kaynaklı peroksidaz artışlarının kontol ve uygulama bitkilerindeki farkları belirgin bir şekilde ortaya konulmuştur (Şekil 4. 41).

4.6.2. '*Ca*.P. solani' enfeksiyonunun asma yapraklarındaki total protein miktarına etkisi

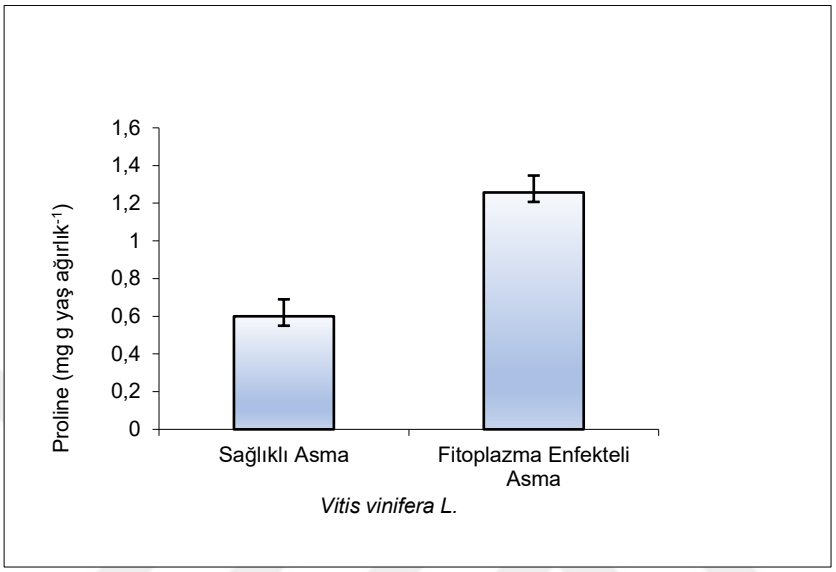
Yapraklardaki çözülebilir protein içeriği ele alındığında, fitoplazma enfeksiyonunun bitki yapraklarındaki toplam protein içeriğini önemli düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4. 42). Benzer bulgular Zafari ve ark. (2012) tarafından da *Citrus aurantifolia'*dan (misket limonu, laym) elde edilmiştir. Toplam çözünür protein içeriğinin azalması, fitoplazma enfeksiyonlarının bitkide hormonal dengeyi değiştirdiğinden kaynaklı protein içeriğine etmesinden kaynaklı olduğu kabul edilmektedir (Dermastia, 2019). Ayrıca, aminoasit (prolin) sentezi ve protein konsantrasyonunun ve içeriğinin yıkıma uğraması da protein miktarının düşmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (rapor edilmemiş bilgi, Dr. Murat Dikilitaş ile kişisel görüşme).



Şekil 4. 42. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki toplam protein düzeyleri

4.6.3. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraklardaki prolin miktarına etkileri

Yapraklardaki serbest prolin içeriğinin belirlenmesi Bates ve ark. (1973) metoduna göre yürütülmüştür.



Şekil 4. 43. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki prolin düzeyleri

Bu çalışmada elde edilen bulgular fitoplazma ile bulaşık asma yapraklarındaki prolin miktarının sağlıklı olanlara nazaran yaklaşık iki kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 43). Benzer bulgular *Citrus aurantifolia'*da da elde edilmiş ve fitoplazma enfeksiyonunun yapraktaki prolin miktarına etki ettiği raporlanmıştır (Abdollahi ve ark., 2012).

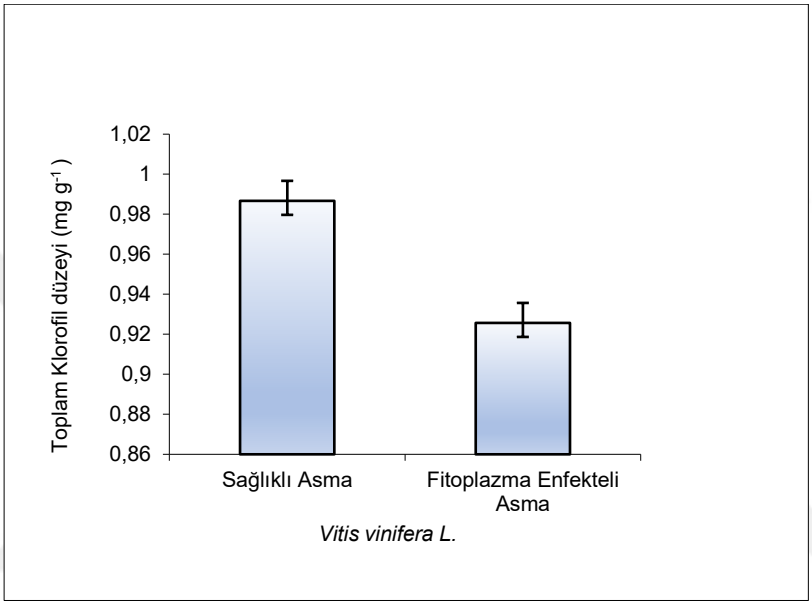
Prolin metabolizması, hücre sinyalizasyonu, stres toleransı ve enerji üretimi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçlerde karmaşık rollere sahiptir. Prolin ayrıca bazı hastalığa neden olan organizmaların patogenezini etkilemektedir (Christgen ve Becker, 2019).

Patojenlerin prolini nasıl kullandığına ilişkin mekanizmaları anlamak, bulaşıcı hastalıklara karşı yeni stratejiler geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmada elde edilen verilere dayalı olarak prolin miktarının belirlenmesi, fitoplazma enfeksiyonunun

etkilerini ölçmede kullanılabilecek iyi bir markır olduğu saptanmıştır (Dikilitas ve ark., 2020).

4.6.4. Fitoplazmanın yaprak klorofil içeriklerine etkisi

Yapraklardaki klorofil analizleri Arnon (1949)'a metoduna göre yürütülmüştür.

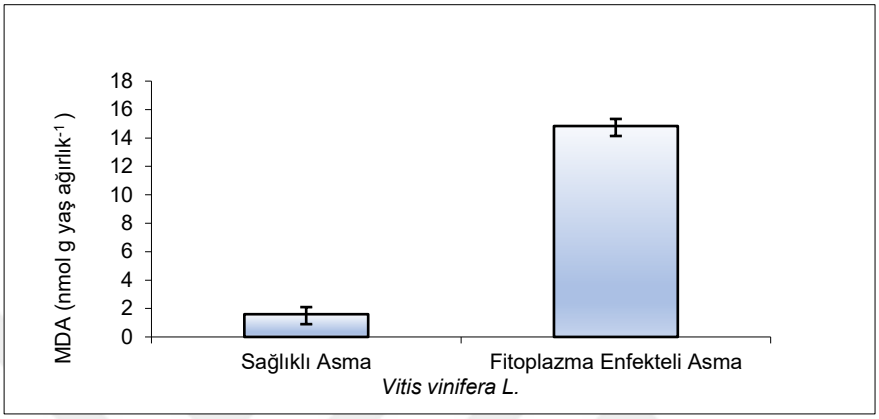


Şekil 4. 44. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki toplam klorofil düzeyleri

Çalışmada enfekteli bitkiler ile sağlıklı bitkiler arasında klorofil miktarının önemli düzeyde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 44). Fitoplazma enfeksiyonunun elmalarda da photosystem 2 (PS2) aktivitesini düşürdüğünden dolayı hem fotosentez aktivitesini hem de yapraklardaki toplam klorofil içeriğini düşürdükleri daha önceden de rapor edilmiştir (Bertamini ve ark., 2002). Fotosentez, bitki bünyesindeki karbohidratların orijinal kaynağı olduğundan, farklı dirence sahip asma çeşitleri arasında fitoplazma enfeksiyonundan sonra fotosentezde açık bir kıyaslama yapılabilir. Fitoplazma enfeksiyonlarının bitkilerdeki fotosentetik aktiviteleri ne düzeyde etkiledikler veya klorofil içeriklerine ne düzeyde zarar verdikleri güncel olarak yürütülen araştırma konuları arasında yer almaktadır (Liu ve ark., 2016; Pagliarani ve ark., 2020; Xue ve ark., 2018).

4.6.5. Fitoplazma enfeksiyonunun malondialdehit (MDA) üzerine etkileri

Bitkilerde lipid peroksidasyon (MDA) içeriği olarak ifade edilmektedir. Lipid peroksidasyonunun ölçümünde Sairam ve Saxena (2000) tarafından düzenlenen yöntem kullanılmıştır.

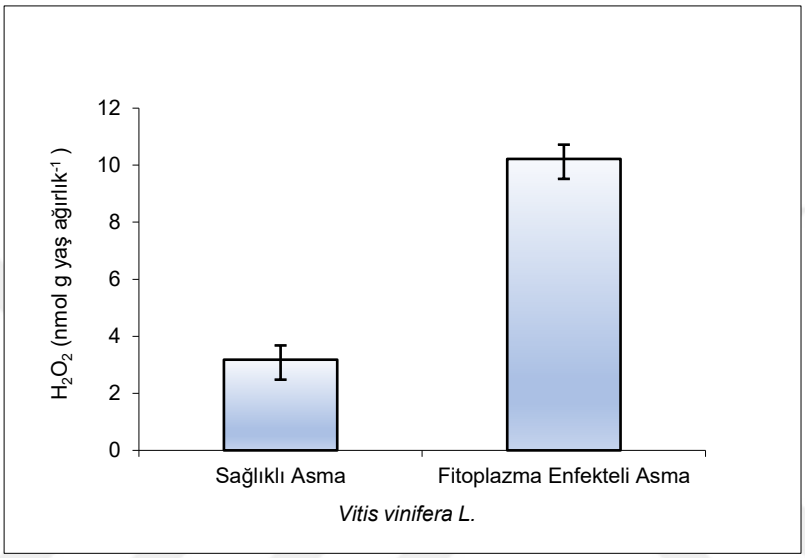


Şekil 4. 45. Sağlıklı ve fitoplazma bulaşık asma yapraklarındaki MDA düzeyleri

İncelenen diğer parametreler ile karşılaştırıldığında, fitoplazma enfeksiyonunun en çarpıcı etkisi MDA içeriğinden elde edilmiştir (Şekil 4. 45). MDA üretimi çoğunlukla hidroksil radikalleri tarafından tetiklenmektedir, ancak peroksidasyona diğer reaktif oksijen türleri de neden olabilir. MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri, membranların reaktif oksijen türleri (ROS) saldırısına duyarlılığından dolayı oksidatif hasarın yararlı ve güvenilir göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Hodges ve ark., 1999). Bu çalışmada fitoplazma enfekteli yapraklardaki MDA içeriğinde artış saptanırken, *Citrus sinenses* L.'de MDA düzeyinin fitoplazma enfeksiyonu ile azaldığı rapor edilmiştir (Rasool ve ark., 2020). Ancak '*Candidatus* Phytoplasma solani' enfeksiyonunun *Oenothera biennis* örneklerinin yapraklardaki MDA içeriğini arttırdığı da bildirilmiştir (Kiprovski ve ark., 2018). MDA içeriğinin bitkiden bitkiye veya fitoplazma türüne bağlı olarak bitkide oluşturduğu tepki farklılıklar olduğu görülmektedir. Aynı fitoplazmanın farklı çeşitler arasındaki MDA içeriklerinin karşılaştırılması dayanıklı veya tolerant çeşit seçimlerinde gelecekteki çalışmalarda kullanılabilir bir markır olarak umut vaadeden bir yaklaşım olacaktır.

4.6.6. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraktaki H_2O_2 içeriğine etkisi

Yapraklardaki hidrojen peroksit miktarının saptanması ve kantifikasyonu Velikova ve ark. (2000) metoduna göre yürütülmüştür. Örneklerden elde edilen absorbans değerleri, H_2O_2 standartları ile oluşturulan grafikteki değerlerle karşılaştırılarak örneklerdeki H_2O_2 miktarları belirlenmiştir.



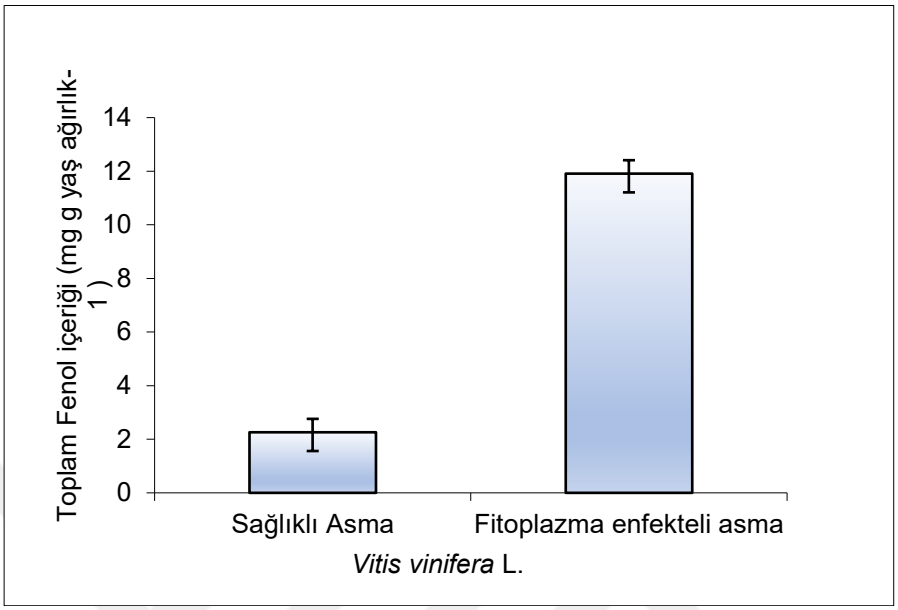
Şekil 4. 46. Sağlılı ve fitoplazma ile bulaşık asma bitkisinin yapraklarındaki H_2O_2 (nmol g^{-1}) düzeyleri

Fitoplazma bulaşık asma bitkisi sağlıklı bitki ile karşılaştırıldığında yapraklardaki H_2O_2 (nmol g yaş ağırlık^{-1}) içeriğinde yaklaşık üç kat bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4. 46). Çalışmada elde edilen bulgular, '*Ca*.P.solani' enfeksiyonunun yapraklardkai H_2O_2 miktarını önemli düzeyde arttırdığını göstermiştir ve bu sonuçlar benzer diğer çalışmalar ile tutarlılık göstermiştir (Asudi ve ark., 2020; Gambino ve ark., 2013). Farklı çeşitler arasında aynı veya farklı fitoplazmalara karşı bitkide oluşan H_2O_2 tepkilerinin kıyaslanması, dayanıklılık ve ıslah çalışmaları için yararlı bir markır olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

4.6.7. Fitoplazma enfeksiyonunun yapraktaki toplam fenolik maddelere etkisi

Toplam fenolik bileşik analizleri Shetty ve ark. (1995) metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak yürütülmüştür. Yapraklardaki fenolik madde içerikleri

gallik asit standardının farklı konsantrasyonlarda hazırlanan stokları kullanarak belirlenmiş olup, sonuçlar GAE g^{-1} olarak ifade edilmiştir.

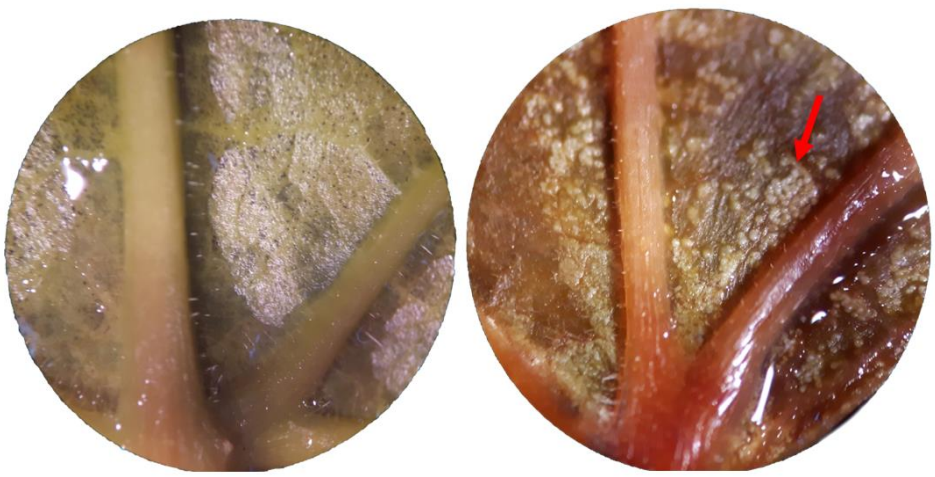


Şekil 4. 47. Sağlılı ve fitoplazma ile bulaşık asma bitkisinin yapraklarındaki toplam fenolik madde düzeyleri

Fitoplazma enfeksiyonu asma yapraklarında toplam fenolik madde içeriğini yaklaşık altı kat arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 47). Bitki-patojen etkileşimlerindeki fenoliklerin ve flavonoidlerin rolleri, stresin neden olduğu bileşiklerin (savunma tepkilerinin sinyalizasyonu, UV hasarına karşı koruma vb.) nasıl rol oynadığını açıklayan çok sayıda çalışmaya konu olmuştur (Nasir ve ark., 2017; Negro ve ark., 2020). Bois Noir ile bulaşık asma bitkisinin yapraklarındaki fenolik madde miktarının artışı yakın zaman önce yayınlanan çalışmalarda da doğrulanmıştır (Negro ve ark., 2020). Sadece Bois Noir hastalığının değil, diğer fitoplazmaların da asma bitkisi üzerindeki primer ve sekonder metabolit üretimine etkisinin araştırılması dayanıklı veya tolerant çeşit seçiminde kullanılabilecek önemli bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

4.6.8. Fitoplazma enfeksiyonunun yaprakta lignin ve kalloz birikimine etkisi

Bitkilerin patojen enfeksiyonlarını algılaması ve bunlara karşı verecekleri hızlı tepkiler hayatta kalmalarını doğrudan etkilemektedir (Huot ve ark., 2014). Patojen kaynaklı bağışıklık sisteminin veya strese tepki mekanizmasının aktifleştirilmesinde patojenin enfeksiyon yaptığı yerlere yakın hücre duvarlarında kalloz birikimi ve depolanmasına rastlanılmaktadır (Boller ve Felix, 2009). Bu çalışmada da *'Ca*.Phytoplasma solani' etmenine karşı bitki yaprak damarlarının etrafında kalloz birikimleri morfolojik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4. 48).



Sağlıklı Asma Yaprağı '*Ca*.P.solani' enfekteli Asma yaprağı

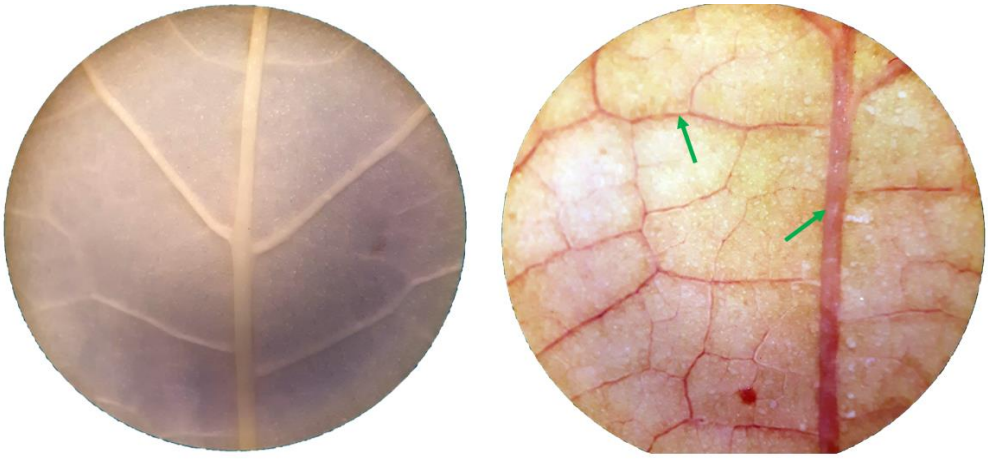
Şekil 4. 48. Yapraklardaki lignin birikimini gösteren belirtiler

Bitkiler patojen saldırılarına karşı flavonoidler, lignin, alkaloidler ve terpenoidler gibi sekonder metabolit sentezini arttırarak, savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Pradit ve ark., 2019).

Bitkilerin fitoplazma enfeksiyonuna karşı hücrelerinde değişiklikler ve polifenoller, suberin, lignin gibi çeşitli bileşiklerin lokalizasyonu daha önceki çalışmalar ile araştırılmıştır.

Bu çalışmada Hönüsü asma çeşidinin yapraklarında fitoplazma enfeksiyonu sonucu önemli düzeyde ligninleşme artışı olduğu saptanmıştır. Lignin oluşumunun

artması bitkilerde patojenlerin yayılmasını kısıtlama amaçlı oluşturulan bir savunma mekanizmasıdır (Lee ve ark., 2019). Bu parametrenin çeşitler arasında değerlendirilmesi ile çeşitler bazında duyarlılıkların karşılaştırılması ve tolerant çeşitlerin ıslah çalışmalarında kullanımı mümkün olabilir.



Sağlıklı Asma Yaprağı ‘*Ca*.P.solani’ enfekteli Asma yaprağı

Şekil 4. 49. Yapraklarda fitoplazma kaynaklı kalloz birimine dair görseller

Bitki dokularında patojen enfeksiyonlarından sonra kalloz birikimi bitki savunma tepkileri ile ilişkilendirilerek patojenlerin penetrasyon ve yayılmalarına karşı bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir (Jacobs ve ark., 2003).

Çalışmada ‘*Ca*.P.solani’ enfeksiyonu sonucu Hönüsü asma çeşidinin yapraklarında kalloz birikimi sağlıklı bitkilere nazaran artışı açıkça ortaya konulmuştur (Şekil 4. 49). Yakın zaman önce aynı fitoplazma türünün asma yaprak damarlarındaki kalloz birikimi yabancı asma çeşitlerinde de benzer sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir (Marco ve ark., 2016).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bağ üretimi Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde oldukça eski tarihlere dayanan ve genel olarak geleneksel yöntemlere göre kurulmuş bahçelerde yürütülmektedir. Üretimi kısıtlayan birçok biyotik ve abiyotik faktör bulunmaktadır. Ancak son yıllarda yürütülen çalışmalar ile fitoplazmaların neden olduğu hastalık belirtileri epidemi riski taşıması nedeniyle bağ üretim alanlarında dikkatle izlenen patojenler arasına girmiştir (Angelini ve ark., 2018; Ertunc ve ark., 2015b; Kostadinovski, 2020; Zambon ve ark., 2018). Bağ sarılığı olarak adlandırılan bu fitoplazmalar genel olarak, beyaz asma çeşitlerinin yapraklarında düzensiz sararmalar, kırmızı asma çeşitlerinde düzensiz yaprak kızarmaları, sararmış yaprak dokusunda yer yer nekrotikleşme, yaprak damarlarında sararma, yapraklarda renk açılması veya yaprak ayasında kırmızıya dönük koyu renk gelişimi, yaprakların arkaya doğru kıvrılması, yaprak ayasında yer yer kırmızılaşma, yaprak uçlarında nekrotikleşme, enfeksiyonlu sürgünlerde yaprakların üst üste binmesi, sürgün boğum aralarında kısalmalar, ölü sürgünler, genç sürgünlerde lignifikasyon eksiklikleri sonucu yeşil-odunsu bölgelerin oluşumu ve büzüşük meyve oluşumu ve salkımların erkenden kuruması şeklinde belirtiler oluşturduğu saptanmıştır. Bu hastalıkların simptomlarına bakılarak patojenleri ayırmak mümkün olamamaktadır. Yürütülen bu çalışma ile Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde bağ üretim alanlarında bu fitoplazmaların mevcut olduğu moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup, yayılmasında aktif rol oynayan herhangi bir böcek ise saptanamamıştır. Özellikle hasat dönemi ve sonrasında emici böcek popülasyonunda önemli düzeyde artış olduğu ve böcek örneklemesinin bu dönemlerde yapılmasına rağmen herhangi bir böcekte fitoplazma etmeninin varlığı saptanmamıştır. Yine de bu durum hastalığı yayan herhangi bir vektör böcek olmadığı anlamına gelmemektedir. Örnekleme sayısındaki kısıtlamalar ve böceklerdeki fitoplazma konsantrasyonlarındaki düşüklük nedeniyle böceklerde fitoplazma saptanmasının zorlukları ve bu konudaki hastalık taşıma deneyleri güncel çalışmalar ile rapor edilmiştir (Quaglino ve ark., 2019). Çalışmadan elde edilen bulgular sonucu, bu hastalıkların yayılmasında vektörlerin henüz önemli düzeyde etkin olmadığı ve fitoplazma hastalıklarının bölgede vegetatif olarak, aşı materyali veya aşılı omca şeklinde taşındığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Üreticilerin aşı kalemi veya aşı gözü

seçiminde hastalık belirtisi göstermeyen bitkileri tercih etmeleri hastalığın yayılmasını kısıtlayacaktır. Sürgünlerin odunlaşamaması sonucu kış döneminde siyahımsı renk almasından dolayı bu hastalığa ‘’Siyah odun’’ anlamına gelen Bois Noir ismi verilmiştir. BN hastalığı belirtisi aynı zamanda Flavescence Doreé hastalığının da belirtileri arasında yer almaktadır. Bundan dolayı bu gibi hastalık belirtilerinin görüldüğü yerlerde mutlaka fitoplazma teşhis çalışmaları yürütülmelidir ve özellikle FD’nin tespit edildiği yerlerde Zirai Karantina önlemlerine başvurulmalıdır.

Pozitif örneklerde 16SrXII ve 16SrI ribozomal grubuna ait fitoplazmalar tespit edilmiş ve bu çalışma bölgede bağlarda fitoplazma tespit eden ilk rapor niteliği taşımaktadır. Ayrıca antepfıstığı, bağ ve tarla sarmaşığında aynı fitoplazma türünün bulunması hastalık epidemiyolojisinin araştırılması konusunda Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Türkiye için önemli veriler tespit edilmiştir. Örneklemelerde Eppo A1 listesinde bulunan karantina etmenlerinden (FD fitoplazması vb.) herhangi birisine rastlanmamışsa da, yine de geniş çaplı sürveyler ile bu patojenlerin kontrollü izlenmesi yapılmalı ve tespit edildiği noktalarda tarımsal karantina önlemlerine başvurulmalıdır.

Yabancıot kontrolünün uygun olarak yapılmadığı ve bu konuda bakımsız olan bahçelerde fitoplazma kaynaklı hastalık riskinin artması tehlikesine karşı üreticilerin bilgilendirilmesi, hastalıkla mücadele ve yayılmanın önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Hönüsü üzüm çeşitlerinde enfeksiyon oranının fazla olması çeşidin bölgede çokça tercih edilmesinden kaynaklandığından dolayı olduğu gibi, çeşidin patojene karşı duyarlılık seviyesinden de kaynaklanıyor olabilir. Diğer çeşitlerin de fitoplazma enfeksiyonuna karşı oluşturdukları direnç seviyeleri belirlenmeli ve fitoplazmaların yaygınlaşmaya başladığı bölgelerde daha dirençli asma çeşitlerinin tercih edilmesi gerekmektedir. Asmaların fitoplazma kaynaklı hastalıklardan kendiliğinden iyileşme durumları patojenin izlenmesini zorlaştırmaktadır. Yani bir dönem pozitif sonuç veren bir bitkinin başka bir dönem negatif sonuç vermesi hastalığın izlenmesi açısından ve mücadele açısından tehlikeli bir durum olarak sayılabilir. Tıpkı insanlardaki Covid19 etmeninin dünyada hızlıca yayılması gibi, bitkilerde de fitoplazma enfekisyonu

durumunda, hastalık etmeni uygun vektör bulduğunda epidemi riskini ortaya çıkarabilir. İleride yapılacak çalışmalar ile çeşitlerin fitoplazmalara karşı verdiği tepkiler daha detaylı incelenebilir ve çeşit/kalem kombinasyonu çalışmaları ile hastalığın verdiği zararlar minimum düzeye indirgenebilir.

Fitoplazma hastalıklarına karşı kimyasal savaşımının olmadığından, hastalık epidemi yaptığında bununla mücadelede zor olacaktır. Bois noir hastalığına karşı test edilen yerli ve yabancı asma çeşitleri arasında ümitvar/tolerant çeşitlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Fitoplazmalar gibi bitki patojenleri ile mücadele, reaktif kontrol stratejileri yerine proaktif önlemlerle mümkün olmaktadır. Bu patojenlere karşı bitki savunmasının iki ana mekanizması direnç (konukçunun patojen çoğalmasını sınırlama yeteneği) ve toleranstır (patojen çoğalmasının düzeyine bakılmaksızın, konukçunun uygunluğu üzerindeki enfeksiyonun etkisini azaltma yeteneği). Bu çalışmada Hönüsü çeşidinde fitoplazma enfeksiyonu koşullarında önemli savunma mekanizmalarının aktif hale geldiği belirlenmiştir ancak hastalığın bu çeşit üzerindeki yaygınlığının fazla olması çeşidin bölgede çokça tercih edildiğinden rastlanma sıklığının fazla olması ile ilişkilendirilmiştir.

Fitoplazmalara karşı dayanıklılık ıslahı çalışmaları arttırılmalı ve ayrıca hastalığın karakterizasyonu çalışmaları da epidemiyolojik bilgiler açısından önem arzetmektedir. Potansiyel hastalık taşıyıcısı vektör uçuşları sürekli olarak izlenmeli ve ülkemize yeni bir bulaşmanın olup olmadığı sürekli olarak takip edilmelidir. Belki de hastalık için uygun vektörlerin bölge faunasında bulunması durumunda gelecekte Bois noir hastalığının epidemi yapma olasılığı artacaktır. Ayrıca, yurt dışından ithal edilen aşılı omcaların veya üretim materyallerinin kesinlikle Zirai Karantina Araştırma Laboratuvarlarında bu hastalıkların varlığı açısından da incelemeye alınmaları gerekmektedir.

Korunmuş gen bölgelerinin taksonomik olarak kullanılmasına ek olarak, çeşitli housekeeping genlerin de coğrafi etiketlemelerde ve barkod çalışmalarında

kullanılması bu hastalığın yayılma kaynaklarını ve izlenmesini kolaylaştıracaktır. Özellikle barkodlama çalışmaları yapılan fitoplazmaların Karantina kontrol programlarına mutlaka çok genli karakterizasyon protokollerinin eklenmesi gerekmektedir.

Hastalık taşıdığı Nested-PCR ile belirlenen bazı asmalardan tekrar örnekleme yapıldığında bazı durumlarda hastalık belirtisini göstermediği ve Nested-PCR ile testlendiğinde de negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu iyileşme durumuna bölgemizde de rastlanılmış ve dünyada yürütülmüş çeşitli çalışmalarda iyileşme belirtisi gösteren asmaların varlığı rapor edilmiştir (Santi ve ark., 2013). Bundan dolayı fitoplazma hastalıklarının asmalarda varlığını rapor eden ve patojeni karakterize eden çalışmaların artması, hastalıkla mücadelenin ilk adımı olan tanı ve teşhis aşamalarını içerdiğinden dolayı oldukça önem verilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

ABDOLLAHI, F., NIKNAM, V., GHANATI, F., MASROOR, F., VE NOORBAKHSH, S. N. 2012. Biological Effects of Weak Electromagnetic Field on Healthy and Infected Lime (*Citrus aurantifolia*) Trees with Phytoplasma. The Scientific World Journal, *2012*(Article ID 716929): 1–6. https://doi.org/10.1100/2012/716929

AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology* (5. baskı). Elsevier Academic Press.

AHRENS, U., VE SEEMÜLLER, 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*(8): 828–832. https://doi.org/10.1094/Phyto-82-828

AL-SAADY, N. A., KHAN, A. J., CALARI, A., AL-SUBHI, A. M., VE BERTACCINI, A. 2008. "*Candidatus* Phytoplasma omanense", associated with witches'-broom of Cassia italica (Mill.) Spreng. in Oman. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(2): 461–466. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65425-0

ALP, Ş., USTA, M., SİPAHİOĞLU, H. M., VE GÜLLER, A. 2016. First report of "Candidatus Phytoplasma solani" on a new host marigold (*Tagetes erecta* L.). *T*urkish Journal of Agriculture and Forestry, 40(3): 311–318. https://doi.org/10.3906/tar-1506-58

ALSAHELI, Z., CONTALDO, N., MEHLE, N., DERMASTIA, M., ELBEAINO, T., VE BERTACCINI, A. 2020. First detection of "*Candidatus* Phytoplasma asteris" - and " *Candidatus* Phytoplasma solani"-related strains in fig trees. Journal of Phytopathology, 16*8*(1): 63–71. https://doi.org/10.1111/jph.12868

ANGELINI, E., CONSTABLE, F., DUDUK, B., FIORE, N., QUAGLINO, F., VE BERTACCINI, A. 2018. Grapevine phytoplasmas. In: G. P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, & L. W. Liefting (Ed.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma - Associated Diseases* (ss. 123–151). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_5

ARNAUD, G., MALEMBIC-MAHER, S., SALAR, P., BONNET, P., MAIXNER, M., MARCONE, C., BOUDON-PADIEU, E., VE FOISSAC, X. 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. Applied and Environmental Microbiology, *73*(12): 4001–4010. https://doi.org/10.1128/AEM.02323-06

ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant physiology*, *24*(1), 1–15.

AROCHA, Y., ANTESANA, O., MONTELLANO, E., FRANCO, P., PLATA, G., VE JONES, P. 2007. "*Candidatus* Phytoplasma lycopersici", a phytoplasma associated with "hoja de perejil" disease in Bolivia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(8): 1704–1710. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64851-0

AROCHA, Y., LÓPEZ, M., PIÑOL, B., FERNÁNDEZ, M., PICORNELL, B., ALMEIDA, R., PALENZUELA, I., WILSON, M. R., VE JONES, P. 2005. "*Candidatus* Phytoplasma graminis" and "*Candidatus* Phytoplasma caricae",

two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(6): 2451–2463. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63797-0

ARYAN, A., BRADER, G., MÖRTEL, J., PASTAR, M., and RİEDLE-BAUER, M. 2014. An abundant "*Candidatus* Phytoplasma solani" tuf b strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. European Journal of Plant Pathology, 140(2): 213–227. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0455-0

ASUDI, G. O., OMENGE, K. M., PAULMANN, M. K., REICHELT, M., GRABE, V., MITHOFER, A., OELMUELLER, R., and FURCH, A. C. U. 2020. The physiological and biochemical effects on Napier grass plants following Napier grass stunt phytoplasma infection. Phytopathology, 1–42. https://doi.org/10.1094/phyto-08-20-0357-r

ATANASOVA, B., JAKOVLJEVIĆ, M., SPASOV, D., JOVIĆ, J., MITROVIĆ, M., TOŠEVSKI, I., and CVRKOVIĆ, T. 2015. The molecular epidemiology of bois noir grapevine yellows caused by '*Candidatus* Phytoplasma solani' in the Republic of Macedonia. European Journal of Plant Pathology, 142(4): 759–770. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0649-0

BARIC, S., VE DALLA VIA, J. 2007. Temporal shifts of Bois Noir phytoplasma types infecting grapevine in South Tyrol (Northern Italy). Vitis, 46(1): 101–102.

BATES, L. S., WALDREN, R. P., VE TEARE, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1): 205–207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

BAYRAM, S., ZEYBEKOGLU, U., SOYLEMEZOGLU, G., CANIK, D., KARAVIN, M., CAKIR, A., and ERTUNC, F. 2014. Presence of putative insect vectors of grapevine yellows phytoplasmas in Turkey. Phytopathogenic Mollicutes, 4(1): 22–26. https://doi.org/10.5958/2249-4677.2014.00578.7

BELLI, G., BIANCO, P. A., and CONTI, M. 2010. Grapevine yellows in Italy: Past, present and future. Journal of Plant Pathology, 92(2): 303–326. https://doi.org/10.4454/jpp.v92i2.172

BELLOMO, C., CARRARO, L., ERMACORA, P., PAVAN, F., OSLER, R., FRAUSIN, C., and GOVERNATORI, G. 2007. Recovery phenomena in grapevines affected by grapevine yellows in Friuli Venezia Giulia. Bulletin of Insectology, *60*(2): 235–236.

BERTACCINI, A. 2017. Phytoplasmas – Dangerous and Intriguing Bacteria (M. Dermastia, A. Bertaccini, F. Constable, & N. Mehle (ed.); ss. 1–15). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50648-7_1

BERTACCINI, A., DUDUK, B., PALTRINIERI, S., VE CONTALDO, N. 2014. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. American Journal of Plant Sciences, *5*: 1763–1788. https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191

BERTACCINI, A., VE LEE, I. M. 2018. Phytoplasmas: An update. In: Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I: Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma - Associated Diseases (ss. 1–29). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_1

BERTACCINI, A., WEINTRAUB, P. G., RAO, G. P., VE MORI, N. 2019. Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II (A. Bertaccini, P. G. Weintraub, G. P. Rao, & N. Mori (ed.)). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9

BERTAMINI, M., NEDUNCHEZHIAN, N., TOMASI, F., and GRANDO, M. S. 2002. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61(6): 357–366. https://doi.org/10.1006/pmpp.2003.0449

BIANCO, P. A., ROMANAZZI, G., MORI, N., MYRIE, W., and BERTACCINI, A. 2019. Integrated management of phytoplasma diseases. In: A. Bertaccini, P. G. Weintraub, G. P. Rao, & N. Mori (Ed.), Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II: Transmission and Management of Phytoplasma - Associated Diseases (ss. 237–258). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11

BOLLER, T., VE FELIX, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. Annual Review of Plant Biology, 60(1): 379–406. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, *72*(1–2): 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

BRESSAN, A., TURATA, R., MAIXNER, M., SPIAZZI, S., BOUDON-PADIEU, E., and GIROLAMI, V. 2007. Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. Annals of Applied Biology, 150(3): 331–339. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00134.x

ÇAĞLAR, B. K., VE ELBEAINO, T. 2013. A novel phytoplasma associated with witches' broom disease of *Ligustrum ovalifolium* in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 137(1): 113–117. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0222-7

ÇAĞLAR, B. K., ELBEAINO, T., KÜSEK, M., PEHLIVAN, D., FIDAN, H., and PORTAKALDALI, M. 2010. Stolbur phytoplasma infections in potato and tomato plants from different locations in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 39(1–3): 1–8.

ÇAĞLAR, B. K., SATAR, S., BERTACCINI, A., VE ELBEAINO, T. 2019. Detection and seed transmission of Bermudagrass phytoplasma in maize in Turkey. Journal of Phytopathology, 167(4): 248–255. https://doi.org/10.1111/jph.12792

ÇAĞLAR, B. K., SATAR, S., VE ELBEAINO, T. 2011. Experimental transmission of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] white leaf phytoplasma to wheat plants by root-bridge modality. Journal of Turkish Phytopathology, 40: 51–56.

ÇAGLAYAN, K., GAZEL, M., KÜÇÜKGÖL, C., PALTRINERI, S., CONTALDO, N., and BERTACCINI, A. 2013. First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris'(group 16SrI-B) infecting sweet cherries in Turkey. Journal of Plant Pathology, 95(4): 77.

CAGLAYAN, K., GAZEL, M., VE ŠKORIĆ, D. 2019. Transmission of phytoplasmas by agronomic practices. Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II: Transmission and Management of Phytoplasma - Associated Diseases, 149–163. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_7

CANIK, D., VE ERTUNC, F. 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. Bulletin of Insectology, 60(2): 335–

336.
CANIK, D., ERTUNC, F., PALTRINIERI, S., CONTALDO, N., VE BERTACCINI, A. 2011. Identification of different phytoplasmas infecting grapevine in Turkey. Bulletin of Insectology, 64: 225–226.
CASATI, P., JERMINI, M., QUAGLINO, F., CORBANI, G., SCHAERER, S., PASSERA, A., BIANCO, P. A., VE RIGAMONTI, I. E. 2017. New insights on Flavescence dorée phytoplasma ecology in the vineyard agro-ecosystem in southern Switzerland. Annals of Applied Biology. 171(1): 37-51. https://doi.org/10.1111/aab.12359
CAUDWELL, A. 1957. Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. Annales de l'Amelioration des Plantes, 4: 359–363.
CAUDWELL, A. 1961. A study of black wood disease of vines: its relationship to flavescence dorée. Annales des Epiphyties, 12(3): 241–262.
CAUDWELL, A. 1990. Epidemiology and characterization of Flavescence dorée (FD) and other grapevine yellows. Agronomie, 10(8): 655–663. https://doi.org/10.1051/agro:19900806
CHRISTENSEN, N. M., NICOLAISEN, M., HANSEN, M., and SCHULZ, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(11): 1175–1184.
CHRISTGEN, S. L., and BECKER, D. F. 2019. Role of Proline in Pathogen and Host Interactions. Antioxidants & Redox Signaling, 30(4): 683–709. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7335
CHUCHE, J., DANET, J.-L., SALAR, P., FOISSAC, X., and THIÉRY, D. 2016. Transmission of '*Candidatus* Phytoplasma solani' by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera : Cixiidae). Annals of Applied Biology, 169(2): 214–223. https://doi.org/10.1111/aab.12291
CIMERMAN, A., PACIFICO, D., SALAR, P., MARZACHI, C., and FOISSAC, X. 2009. Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. Applied and Environmental Microbiology, *75*(9): 2951–2957. https://doi.org/10.1128/AEM.02613-08
CLARK, M. F., and ADAMS, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34(3): 475–483. https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475
CONIGLIARO, G., JAMSHIDI, E., LO VERDE, G., BELLA, P., MONDELLO, V., GIAMBRA, S., D'URSO, V., TSOLAKIS, H., MUROLO, S., BURRUANO, S., and ROMANAZZI, G. 2020. Epidemiological Investigations and Molecular Characterization of '*Candidatus* Phytoplasma solani' in Grapevines, Weeds, Vectors and Putative Vectors in Western Sicily (Southern Italy). Pathogens, 9(11): 918. https://doi.org/10.3390/pathogens9110918
CONSTABLE, F., and BERTACCINI, A. 2017. Worldwide Distribution and Identification of Grapevine Yellows Diseases. In: M. Dermastia, A. Bertaccini, F. Constable, & N. Mehle (Ed.), Grapevine Yellows Diseases and Their Phytoplasma Agents (ss. 17–46). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50648-7_2
CONSTABLE, F. E. 2009. Phytoplasma epidemiology: grapevines as a model. In: P. G. Weintraub & P. Jones (Ed.), Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors (ss. 188–212).

CONTALDO, N., SATTA, E., ZAMBON, Y., PALTRINIERI, S., and BERTACCINI, A. 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. Journal of Microbiological Methods, 127: 105–110. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.031

CVIKROVA, M., HRUBCOVA, M., VAGNER, M., MACHACKOVA, I., and EDER, J. 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. Physiologia Plantarum, 91(2): 226–233. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00423.x

CVRKOVIĆ, T., JOVIĆ, J., MITROVIĆ, M., KRSTIĆ, O., KRNJAJIĆ, S., and TOŠEVSKI, I. 2011. Potential new hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. Bulletin of Insectology, 64(supplement): 129–130.

CVRKOVIĆ, T., JOVIĆ, J., MITROVIĆ, M., KRSTIĆ, O., and TOŠEVSKI, I. 2014. Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. Plant Pathology, 63(1): 42–53. https://doi.org/10.1111/ppa.12080

DANET, J. L., BALAKISHIYEVA, G., CIMERMAN, A., SAUVION, N., MARIE-JEANNE, V., LABONNE, G., LAVIŇA, A., BATLLE, A., KRIŽANAC, I., ŠKORIĆ, D., ERMACORA, P., SERÇE, Ç. U., ÇAĞLAYAN, K., JARAUSCH, W., and FOISSAC, X. 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. Microbiology, 157(2): 438–450. https://doi.org/10.1099/mic.0.043547-0

DAVIS, R. E., DALLY, E. L., GUNDERSEN, D. E., LEE, I. M., and HABILI, N. 1997. "*Candidatus* phytoplasma australiense," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(2): 262–269. https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-262

DAVIS, R. E., HARRISON, N. A., ZHAO, Y., WEI, W., and DALLY, E. L. 2016. '*Candidatus* Phytoplasma hispanicum', a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(9): 3463–3467. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001218

DAVIS, R. E., and LEE, I. M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology, 83(9): 1008–1011.

DAVIS, R. E., ZHAO, Y., DALLY, E. L., JOMANTIENE, R., LEE, I. M., WEI, W., and KITAJIMA, E. W. 2012. "*Candidatus* Phytoplasma sudamericanum", a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(4): 984–989. https://doi.org/10.1099/ijs.0.033423-0

DAVIS, R. E., ZHAO, Y., DALLY, E. L., LEE, I. M., JOMANTIENE, R., VE DOUGLAS, S. M. 2013. "*Candidatus* Phytoplasma pruni", a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, Prunus spp.: Multilocus characterization based on 16S rRNA, secY, and ribosomal protein genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(PART2): 766–776. https://doi.org/10.1099/ijs.0.041202-0

DAVIS, R. E., ZHAO, Y., WEI, W., DALLY, E. L., and LEE, I. M. 2017. '*Candidatus* Phytoplasma luffae', a novel taxon associated with witches' broom disease of

loofah, Luffa aegyptica Mill. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(8): 3127–3133. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001980

DELIĆ, D., BALECH, B., RADULOVIĆ, M., LOLIĆ, B., KARAČIĆ, A., VUKOSAVLJEVIĆ, V., ĐURIĆ, G., and CVETKOVIĆ, T. J. 2016. Vmp1 and stamp genes variability of '*Candidatus* phytoplasma solani' in Bosnian and Herzegovinian grapevine. European Journal of Plant Pathology, 145(1): 221–225. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0828-z

DENG, S., and HIRUKI, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14(1): 53–61. https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D

DERMASTIA, M. 2019. Plant hormones in phytoplasma infected plants. Frontiers in Plant Science, 10, 477. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00477

DERMASTIA, M., BERTACCINI, A., CONSTABLE, F., and MEHLE, N. 2017. *Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents: biology and detection*. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-50648-7

DICKINSON, M., and HODGETTS, J. 2013. Phytoplasma (M. Dickinson & J. Hodgetts (ed.); C. 938). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2

DIKILITAS, M., SIMSEK, E., and KARAKAS, S. 2019. Stress Responsive Signaling Molecules and Genes Under Stressful Environments in Plants. In: M. I. R. Khan, P. S. Reddy, A. Ferrante, & N. A. Khan (Ed.), Plant Signaling Molecules (ss. 19–42). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00002-2

DIKILITAS, M., SIMSEK, E., and ROYCHOUDHURY, A. 2020. Role of Proline and Glycine Betaine in Overcoming Abiotic Stresses. In: A. Roychoudhury & D. K. Tripathi (Ed.), Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress (1. baskı, ss. 1–23). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch1

DOI, Y. O. J. I., TERANAKA, M., YORA, K., and ASUYAMA, H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. Japanese Journal of Phytopathology, 33(4): 259–266.

DUDUK, B., BOTTI, S., IVANOVIC, M., KRSTIC, B., DUKIC, N., and BERTACCINI, A. 2004. Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. Journal of Phytopathology, 152(10): 575–579. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00898.x

DUDUK, B., PALTRINIERI, S., LEE, I.-M., and BERTACCINI, A. 2013. Nested PCR and RFLP Analysis Based on the 16S rRNA Gene. In: M. Dickinson & J. Hodgetts (Ed.), *Phytoplasma Methods and Protocols* (ss. 159–171). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_14

ENDESHAW, S. T., MUROLO, S., ROMANAZZI, G., and NERI, D. 2012. Effects of Bois noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay. Physiologia Plantarum, 145(2): 286–295. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01576.x

EPPO. 2018. *EPPO A1 List*. EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A1_list

ERTUNC, F., CAKIR, A., SÖYLEMEZOGLU, G., CANIK, D., TOPKAYA, S., and BAYRAM, S. 2015a. Reactions of some grapevine cultivars to "bois noir"

phytoplasma. Phytopathogenic Mollicutes, 5(1s): S109. https://doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00046.8

ERTUNC, F., OREL, D. C., BAYRAM, S., PALTRINIERI, S., BERTACCINI, A., TOPKAYA, S., and SOYLEMEZOGLU, G. 2015b. Occurrence and identification of grapevine phytoplasmas in main viticultural regions of Turkey. Phytoparasitica, 43(3): 303–310. https://doi.org/10.1007/s12600-014-0449-7

ESMAILZADEH HOSSEINI, S. A., SALEHI, M., and MIRZAIE, A. 2011. 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.

EVEILLARD, S., JOLLARD, C., LABROUSSAA, F., KHALIL, D., PERRIN, M., DESQUÉ, D., SALAR, P., RAZAN, F., HÉVIN, C., BORDENAVE, L., FOISSAC, X., MASSON, J. E., and MALEMBIC-MAHER, S. 2016. Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild Vitis Species. Frontiers in Plant Science, 7(NOVEMBER2016): 1762. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01762

FABRE, A., DANET, J. L., and FOISSAC, X. 2011. The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. Gene, 472(1–2): 37–41. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.10.012

FERNÁNDEZ, F. D., GALDEANO, E., KORNOWSKI, M. V., ARNEODO, J. D., and CONCI, L. R. 2016. Description of '*Candidatus* Phytoplasma meliae', a phytoplasma associated with Chinaberry (*Melia azedarach* L.) yellowing in South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(12): 5244–5251. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001503

FIALOVÁ, R., VÁLOVÁ, P., BALAKISHIYEVA, G., DANET, J. L., ŠAFÁROVÁ, D., FOISSAC, X., and NAVRÁTIL, M. . 2009. Genetic variability of "stolbur" phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia. Journal of Plant Pathology, 91(2): 411–416.

FIRRAO, G., ANDERSEN, M., BERTACCINI, A., BOUDON, E., BOVÉ, J. M., DAIRE, X., DAVIS, R. E., FLETCHER, J., GARNIER, M., GIBB, K. S., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., HARRISON, N., HIRUKI, C., KIRPATRICK, B. C., JONES, P., KUSKE, C. R., LEE, I. M., LIEFTING, L., MARCONE, C., NAMBA, S., SCHNEIDER, B., SEARS, B. B., SEEMÜLLER, E., SMART, C. D., STRETEN, C., and WANG, K. 2004. "*Candidatus* Phytoplasma", a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1243–1255. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02854-0

FOISSAC, X., DANET, J.-L., MALEMBIC-MAHER, S., SALAR, P., ŠAFÁŘOVÁ, D., VÁLOVÁ, P., and NAVRÁTIL, M. 2013. Tuf and secY PCR Amplification and Genotyping of Phytoplasmas. In: M. Dickinson & J. Hodgetts (Ed.), Phytoplasma: Methods and Protocols (ss. 189–204). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_16

GALETTO, L., MILIORDOS, D., ROGGIA, C., RASHIDI, M., SACCO, D., MARZACHÌ, C., and BOSCO, D. 2014. Acquisition capability of the grapevine Flavescence dorée by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. Journal of Pest Science, 87(4): 671–679. https://doi.org/10.1007/s10340-014-0593-3

GAMBINO, G., BOCCACCI, P., MARGARIA, P., PALMANO, S., and

GRIBAUDO, I. 2013. Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from flavescence dorée disease. Phytopathology, 103(8): 776–784. https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0309-R

GAZEL, M., ÇAĞLAYAN, K., BAŞPINAR, H., MEJIA, J. F., PALTRINIERI, S., BERTACCINI, A., and CONTALDO, N. 2016. Detection and Identification of Phytoplasmas in Pomegranate Trees with Yellows Symptoms. Journal of Phytopathology, 164(2): 136–140. https://doi.org/10.1111/jph.12401

GAZEL, M., CAGLAYAN, K., SERCE, C. U., and SON, L. 2009. Evaluations of apricot trees infected by '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'for horticultural characteristics. Romanian Biotechnological Letters, 14(1): 4123–4129.

GAZEL, M., SERÇE, Ç. U., ÇAĞLAYAN, K., and ÖZTUERK, H. 2007. Detection of '*Candidatus* Phytoplasma pyri'in Turkey. Bulletin of Insectology, 60(2): 125–126.

GIBB, K. S., CONSTABLE, F. E., MORAN, J. R., and PADOVAN, A. C. 1999. Phytoplasmas in Australian grapevines-detection, differentiation and associated diseases. Vitis, 38(3): 107–114.

GIBB, K. S., PADOVAN, A. C., and MOGEN, B. D. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. Phytopathology, 85(2): 169–174.

GRIFFITHS, H. M., SINCLAIR, W. A., SMART, C. D., and DAVIS, R. E. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: *Candidatus* phytoplasma fraxini. International Journal of Systematic Bacteriology, 49(4): 1605–1614. https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1605

GULDUR, M. E., SIMSEK, E., CAGLAR, B. K., DIKILITAS, M., GUMUS, H., and AYVACI, H. 2018. First report of a '*Candidatus* Phytoplasma solani'-related strain (16SrXII-A subgroup) associated with pistachio leaf scorch disease in Turkey. New Disease Reports, 38, 4. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.004

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

HAMEED, S., AKHTAR, K. P., HAMEED, A., GULZAR, T., KIRAN, S., YOUSAF, S., ABBAS, G., ASGHAR, M. J., and SARWAR, N. 2017. Biochemical changes in the leaves of mungbean (*Vigna radiata*) plants infected by phytoplasma. Turkish Journal of Biochemistry, 42(6): 591–599. https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0304

HARRISON, N. A., DAVIS, R. E., OROPEZA, C., HELMICK, E. E., NARVÁEZ, M., EDEN-GREEN, S., DOLLET, M., and DICKINSON, M. 2014. "Candidatus Phytoplasma palmicola", associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(PART 6): 1890–1899. https://doi.org/10.1099/ijs.0.060053-0

HAYAT, S., HAYAT, Q., ALYEMENI, M. N., WANI, A. S., PICHTEL, J., and AHMAD, A. 2012. Role of proline under changing environments: A review. Plant Signaling and Behavior, 7(11): 1456-1466. https://doi.org/10.4161/psb.21949

HIRUKI, C., and WANG, K. 2004. Clover proliferation phytoplasma: "*Candidatus*

Phytoplasma trifolii". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1349–1353. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02842-0
HO, K.-C., TSAI, C.-C., and CHUNG, T.-L. 2001. Organization of Ribosomal RNA Genes from a Loofah Witches' Broom Phytoplasma. DNA and Cell Biology, 20(2): 115–122. https://doi.org/10.1089/104454901750070328
HODGES, D. M., DELONG, J. M., FORNEY, C. F., and PRANGE, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207(4): 604–611. https://doi.org/10.1007/s004250050524
HODGETTS, J., CROSSLEY, D., and DICKINSON, M. 2013. Techniques for the Maintenance and Propagation of Phytoplasmas in Glasshouse Collections of *Catharanthus roseus*. In: M. Dickinson & J. Hodgetts (Ed.), Phytoplasma Methods and Protocols (ss. 15–32). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_2
HUOT, B., YAO, J., MONTGOMERY, B. L., and HE, S. Y. 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8): 1267–1287. https://doi.org/10.1093/mp/ssu049
IKTEN, C., CATAL, M., YOL, E., USTUN, R., FURAT, S., TOKER, C., and UZUN, B. 2014. Molecular identification, characterization and transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 139(1): 217–229. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0384-y
IKTEN, C., USTUN, R., CATAL, M., YOL, E., and UZUN, B. 2016. Multiplex Real-Time qPCR Assay for Simultaneous and Sensitive Detection of Phytoplasmas in Sesame Plants and Insect Vectors. PLOS ONE, 11(5): e0155891. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155891
IZAWA, T. 2015. Deciphering and prediction of plant dynamics under field conditions. Current Opinion in Plant Biology, 24: 87–92. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.003
JACOBS, A. K., LIPKA, V., BURTON, R. A., PANSTRUGA, R., STRIZHOV, N., SCHULZE-LEFERT, P., and FINCHER, G. B. 2003. An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. Plant Cell, 15(11): 2503–2513. https://doi.org/10.1105/tpc.016097
JAGOUEIX-EVEILLARD, S., TARENDEAU, F., GUOLTER, K., DANET, J. L., BOVÉ, J. M., and GARNIER, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(2): 225–233. https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.2.225
JARAUSCH, W., SAILLARD, C., BROQUAIRE, J. M., GARNIER, M., and DOSBA, F. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various Prunus species. Molecular and Cellular Probes, 14(3): 171–179. https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0304
JESCHKE, W. D., BÄUMEL, P., RÄTH, N., CZYGAN, F.-C., and PROKSCH, P. 1994. Modelling of the flows and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. Journal of Experimental Botany, 45(6): 801–812. https://doi.org/10.1093/jxb/45.6.801
JEŽIČ, M., KONTIĆ, J. K., PREINER, D., MALETIĆ, E., and ĆURKOVIĆ-PERICA, M. 2013. Grapevine yellows affecting the Croatian indigenous grapevine cultivar Grk. Acta Botanica Croatica, 72(2): 287–294.

https://doi.org/10.2478/botcro-2013-0007
JUNG, H.-Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., MIYATA, S., OSHIMA, K., UGAKI, M., LEE, J.-T., HIBI, T., and NAMBA, S. 2002. "*Candidatus* Phytoplasma castaneae", a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(5): 1543–1549. https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1543
JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., WEI, W., OSHIMA, K., MIYATA, S. I., UGAKI, M., HIBI, T., and NAMBA, S. 2003a. "*Candidatus* Phytoplasma ziziphi", a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(4): 1037–1041. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02393-0
JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., WONGKAEW, P., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., WEI, W., OSHIMA, K., MIYATA, S. I., UGAKI, M., HIBI, T., and NAMBA, S. 2003b. "*Candidatus* phytoplasma oryzae", a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(6): 1925–1929. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02531-0
JUNQUEIRA, A., BEDENDO, I., and PASCHOLATI, S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and* Molecular Plant Pathology, 65(4): 181–185. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.01.005
JUNQUEIRA, A. C. B., BEDENDO, I. P., and PASCHOLATI, S. F. 2011. Efeito da infecção de fitoplasma sobre a atividade de peroxidase, β-1,3 glucanase e quitinase em plantas de milho. Summa Phytopathologica, 37(4): 194–198. https://doi.org/10.1590/S0100-54052011000400005
KARAKAŞ, S. 2013. Development of tomato growing in soils differing in salt levels and effects of companion plants on some physiological parameters and soil remediation [Harran University], Doktora tezi. http://acikerisim.harran.edu.tr:8080/jspui/handle/11513/175
KAYA, K., SERCE, Ç. U., GAZEL, M., CAGLAYAN, K., and SAUVION, N. 2016. Potential psyllid vectors of Candidatus phytoplasma mali and *Candidatus* phytoplasma pyri in Turkey. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 53(2), 383–392. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.3804
KIPROVSKI, B., ĐALOVIĆ, I., ADAMOVIĆ, D., MITROVIĆ, P., MARJANOVIĆ-JEROMELA, A., MALENČIĆ, Đ., and POPOVIĆ, T. 2018. Biochemical changes in *Oenothera biennis* plants infected by '*Candidatus* Phytoplasma solani'. Journal of Plant Pathology, 100(2): 209–214. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0068-0
KOSOVAC, A., RADONJIĆ, S., HRNČIĆ, S., KRSTIĆ, O., TOŠEVSKI, I., and JOVIĆ, J. 2016. Molecular tracing of the transmission routes of bois noir in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). Plant Pathology, 65(2): 285–298. https://doi.org/10.1111/ppa.12409
KOSTADINOVSKA, E., QUAGLINO, F., MITREV, S., CASATI, P., BULGARI, D., and BIANCO, P. A. 2014. Multiple gene analyses identify distinct "bois noir"

phytoplasma genotypes in the Republic of Macedonia. Phytopathologia Mediterranea, 53(3): 491–501.

KOSTADINOVSKI, V. 2020. Observation of grapevine phytoplasmas status (*Candidatus* phytoplasma solani) in the republic of north macedonia. Journal of Agriculture and Plant Sciences, 1(1): 31–39. https://doi.org/10.46763/japs2010031k

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., and TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

KUMAR, S., STECHER, G., and TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

KUNKEL, L. O. 1926. Studies on Aster Yellows. American Journal of Botany, 13(10): 646–705. https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1926.tb05904.x

LANGER, M., and MAIXNER, M. 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. Vitis, 43(4): 191–199.

LEE, I. M., BERTACCINI, A., VIBIO, M., and GUNDERSEN, D. E. 1995. Detection of Multiple Phytoplasmas in Perennial Fruit Trees with Decline Symptoms in Italy. Phytopathology, 85(6): 728–735. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-728

LEE, I. M., BOTTNER-PARKER, K. D., ZHAO, Y., VILLALOBOS, W., and MOREIRA, L. 2011. "*Candidatus* Phytoplasma costaricanum" a novel phytoplasma associated with an emerging disease in soybean (*Glycine max*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(12): 2822–2826. https://doi.org/10.1099/ijs.0.029041-0

LEE, I. M., BOTTNER, K. D., SECOR, G., and RIVERA-VARAS, V. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(7): 1593–1597. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64251-0

LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., DAVIS, R. E., and BARTOSZYK, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 48(4): 1153–1169. https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153

LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., DAVIS, R. E., BOTTNER, K. D., MARCONE, C., and SEEMÜLLER, E. 2004a. '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1037–1048. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02843-0

LEE, I. M., HAMMOND, R. W., DAVIS, R. E., and GUNDERSEN, D. E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology, 83(8): 834–842.

LEE, I. M., MARTINI, M., MARCONE, C., and ZHU, S. F. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of

"*Candidatus* Phytoplasma ulmi" for the phytoplasma associated with elm yellows. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(2): 337–347. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02697-0

LEE, I. M., ZHAO, Y., and DAVIS, R. E. 2009. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In: P. G. Weintraub & P. Jones (Ed.), Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors (ss. 51–63). CABI Publishing. https://doi.org/10.1079/9781845935306.0000

LEE, M., JEON, H. S., KIM, S. H., CHUNG, J. H., ROPPOLO, D., LEE, H., CHO, H. J., TOBIMATSU, Y., RALPH, J., and PARK, O. K. 2019. Lignin-based barrier restricts pathogens to the infection site and confers resistance in plants. The EMBO Journal, 38(23): e101948. https://doi.org/10.15252/embj.2019101948

LEPKA, P., STITT, M., MOLL, E., and SEEMÜLLER, E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55(1): 59–68. https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0202

LIU, Z., ZHAO, J., and LIU, M. 2016. Photosynthetic responses to phytoplasma infection in Chinese jujube. Plant Physiology and Biochemistry, 105: 12–20. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.003

MACHENAUD, J., HENRI, R., DIEUAIDE-NOUBHANI, M., PRACROS, P., RENAUDIN, J., and EVEILLARD, S. 2007. Gene expression and enzymatic activity of invertases and sucrose synthase in *Spiroplasma citri* or stolbur phytoplasma infected plants. Bulletin of Insectology, 60(2): 2019–2220.

MAIXNER, M. 2007. Biology of Hyalesthes obsoletus and approaches to control this soilborne vector of Bois noir disease. IOBC WPRS BULLETIN, 30(7): 3-9.

MALEMBIC-MAHER, S., SALAR, P., FILIPPIN, L., CARLE, P., ANGELINI, E., and FOISSAC, X. 2011. Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of "*Candidatus* phytoplasma rubi". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(9): 2129–2134. https://doi.org/10.1099/ijs.0.025411-0

MARCHI, G., CINELLI, T., RIZZO, D., STEFANI, L., GOTI, E., BARTOLA, M. DELLA, LUVISI, A., PANATTONI, A., and MATERAZZI, A. 2015. Occurrence of different phytoplasma infections in wild herbaceous dicots growing in vineyards affected by bois noir in Tuscany (Italy). Phytopathologia Mediterranea, 54(3):504-515. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16239

MARCO, F. DE, PAGLIARI, L., DEGOLA, F., BUXA, S. V., LOSCHI, A., DINANT, S., HIR, R. LE, MORIN, H., SANTI, S., and MUSETTI, R. 2016. Combined microscopy and molecular analyses show phloem occlusions and cell wall modifications in tomato leaves in response to '*Candidatus* Phytoplasma solani'. Journal of Microscopy, 263(2): 212–225. https://doi.org/10.1111/jmi.12426

MARCONE, C., GIBB, K. S., STRETEN, C., and SCHNEIDER, B. 2004a. "*Candidatus* Phytoplasma spartii", "*Candidatus* Phytoplasma rhamni" and "*Candidatus* Phytoplasma allocasuarinae", respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1025–1029. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02838-0

MARCONE, C., RAGOZZINO, A., and SEEMULLER, E. 1997. Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host Catharanthus roseus (periwinkle). Forest Pathology, 27(6): 347–350. https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1997.tb01449.x

MARCONE, C., SCHNEIDER, B., and SEEMÜLLER, E. 2004b. "*Candidatus* Phytoplasma cynodontis", the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1077–1082. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02837-0

MARGARIA, P., ABBÀ, S., and PALMANO, S. 2013. Novel aspects of grapevine response to phytoplasma infection investigated by a proteomic and phospho-proteomic approach with data integration into functional networks. BMC Genomics, 14(1): 38. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-38

MARTINI, M., LEE, I. M., BOTTNER, K. D., ZHAO, Y., BOTTI, S., BERTACCINI, A., HARRISON, N. A., CARRARO, L., MARCONE, C., KHAN, A. J., and OSLER, R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(9): 2037–2051. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65013-0

MARTINI, M., MARCONE, C., MITROVIĆ, J., MAIXNER, M., DELIĆ, D., MYRTA, A., ERMACORA, P., BERTACCINI, A., and DUDUK, B. 2012. "*Candidatus* Phytoplasma convolvuli", a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(12): 2910–2915. https://doi.org/10.1099/ijs.0.038612-0

MARTINI, M., MURARI, E., MORI, N., and BERTACCINI, A. 1999. Identification and epidemic distribution of two flavescence doree-related phytoplasmas in Veneto (Italy). Plant Disease, 83(10): 925–930. https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.10.925

MAUST, B. E., ESPADAS, F., TALAVERA, C., AGUILAR, M., SANTAMARÍA, J. M., and OROPEZA, C. 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology, 93(8): 976–981. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.8.976

MEHLE, N., SELJAK, G., RUPAR, M., RAVNIKAR, M., and DERMASTIA, M. 2010. The first detection of a phytoplasma from the 16SrV (Elm yellows) group in the mosaic leafhopper *Orientus ishidae*. New Disease Reports, *22:* 11. https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.011

MILOSEVIC, N., and SLUSARENKO, A. J. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. Physiological and Molecular Plant Pathology, 49(3): 143–158. https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0045

MIYAZAKI, A., SHIGAKI, T., KOINUMA, H., IWABUCHI, N., RAUKA, G. B., KEMBU, A., SAUL, J., WATANABE, K., NIJO, T., MAEJIMA, K., YAMAJI, Y., and NAMBA, S. 2018. *Candidatus* phytoplasma noviguineense, a novel taxon associated with bogia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of new Guinea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68(1): 170–175. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002480

MONTANO, H. G., DAVIS, R. E., DALLY, E. L., HOGENHOUT, S., PIMENTEL, J. P., and BRIOSO, P. S. T. 2001. *Candidatus* Phytoplasma brasiliense, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(3): 1109–1118. https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1109

MORI, N., BRESSAN, A., MARTINI, M., GUADAGNINI, M., GIROLAMI, V., and BERTACCINI, A. 2002. Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée-type phytoplasmas. Vitis, 41(2): 99–102.

MORI, N., MITROVIĆ, J., SMILJKOVIĆ, M., DUDUK, N., PALTRINIERI, S., BERTACCINI, A., and DUDUK, B. 2013. *Hyalesthes obsoletus* in Serbia and its role in the epidemiology of corn reddening. Bulletin of Insectology, 66(2): 245–250. www.bulletinofinsectology.org

MORI, N., PAVAN, F., BONDAVALLI, R., REGGIANI, N., PALTRINIERI, S., and BERTACCINI, A. 2008. Factors affecting the spread of "bois noir" disease in north Italy vineyards. Vitis, 47(1): 65–72.

MORI, N., PAVAN, F., REGGIANI, N., BACCHIAVINI, M., MAZZON, L., PALTRINIERI, S., and BERTACCINI, A. 2012. Correlation of bois noir disease with nettle and vector abundance in northern Italy vineyards. Journal of Pest Science, 85(1): 23–28. https://doi.org/10.1007/s10340-011-0375-0

MORI, N., QUAGLINO, F., TESSARI, F., POZZEBON, A., BULGARI, D., CASATI, P., and BIANCO, P. A. 2015. Investigation on "bois noir" epidemiology in north-eastern Italian vineyards through a multidisciplinary approach. Annals of Applied Biology, 166(1): 75-89 https://doi.org/10.1111/aab.12165

MUROLO, S., MANCINI, V., and ROMANAZZI, G. 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to vmp1 gene characterization. Plant Pathology, 63(3): 700–707. https://doi.org/10.1111/ppa.12122

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. Journal of Applied Microbiology, 109(6): 2049–2059. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04835.x

MUROLO, S., and ROMANAZZI, G. 2015. In-vineyard population structure of '*Candidatus* Phytoplasma solani' using multilocus sequence typing analysis. Infection, Genetics and Evolution, 31: 221–230. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.028

MUSETTI, R., BUXA, S. V., DE MARCO, F., LOSCHI, A., POLIZZOTTO, R., KOGEL, K. H., and VAN BEL, A. J. E. 2013. Phytoplasma-triggered Ca2+ influx is involved in sieve-tube blockage. Molecular Plant-Microbe Interactions, 26(4): 379–386. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-12-0207-R

MUSETTI, R., MARABOTTINI, R., BADIANI, M., MARTINI, M., SANITÀ DI TOPPI, L., BORSELLI, S., BORGO, M., and OSLER, R. 2007. On the role of H2O2 in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. Functional Plant Biology, 34(8): 750-758. https://doi.org/10.1071/FP06308

MUSETTI, R., and PAGLIARI, L. 2019. Phytoplasmas (R. Musetti & L. Pagliari (ed.); C. 1875). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8837-2

MUSETTI, R., PAOLACCI, A., CIAFFI, M., TANZARELLA, O. A., POLIZZOTTO, R., TUBARO, F., MIZZAU, M., ERMACORA, P., BADIANI, M., and OSLER, R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. Phytopathology,

100(4): 390–399. https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-4-0390
MUSIĆ, M. Š., ŠKORIÆ, D., HALUŠKA, I., KRIŽANAC, I., PLAVEC, J., and MIKEC, I. 2011. First report of flavescence dorée-related phytoplasma affecting grapevines in Croatia. Plant Disease, 95(3): 353. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0664
NADERALI, N., NEJAT, N., VADAMALAI, G., DAVIS, R. E., WEI, W., HARRISON, N. A., KONG, L., KADIR, J., TAN, Y. H., and ZHAO, Y. 2017. '*Candidatus* Phytoplasma wodyetiae', a new taxon associated with yellow decline disease of foxtail palm (*Wodyetia bifurcata*) in Malaysia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(10): 3765–3772. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002187
NASIR, F., AKHTAR, K. P., HAMEED, A., YOUSAF, S., GULZAR, T., SARWAR, N., SHAH, T. M., and KIRAN, S. 2017. Fitoplazma ile enfekte olmuş farklı Desi ve Kabuli tipi nohut genotiplerinin yapraklarındaki biyokimyasal değişiklikler. Turkish Journal of Biochemistry, 42(4): 409–417. https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0177
NEGRO, C., SABELLA, E., NICOLÌ, F., PIERRO, R., MATERAZZI, A., PANATTONI, A., APRILE, A., NUTRICATI, E., VERGINE, M., MICELI, A., DE BELLIS, L., and LUVISI, A. 2020. Biochemical Changes in Leaves of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese Infected by Bois Noir Phytoplasma. Pathogens, 9(4), 269. https://doi.org/10.3390/pathogens9040269
NEJAT, N., VADAMALAI, G., DAVIS, R. E., HARRISON, N. A., SIJAM, K., DICKINSON, M., ABDULLAH, S. N. A., and ZHAO, Y. 2013. "*Candidatus* phytoplasma malaysianum", a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(PART2): 540–548. https://doi.org/10.1099/ijs.0.041467-0
OLIVERI, C., PACIFICO, D., D′URSO, V., LA ROSA, R., MARZACHÌ, C., and TESSITORI, M. 2015. Bois noir phytoplasma variability in a Mediterranean vineyard system: new plant host and putative vectors. Australasian Plant Pathology, 44(2): 235–244. https://doi.org/10.1007/s13313-014-0342-3
ÖZDEMIR, N., SAYGILI, H., SAHIN, F., KARSAVURAN, Y., BAYRAK, O. F., and ORAL, B. 2007. Host range and genetic characterization of a phytoplasma causing tomato stolbur disease in Turkey. II.International Symposium on Tomato Diseases, 255–262.
ÖZDEMIR, Z. 2017. Phytoplasmas of sesame and *Orosius orientalis* are genetically diverse based on 16S rDNA sequencing and PCR-RFLP in Turkey. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50(13–14): 674–686. https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1368907
ÖZDEMIR, Z. 2018. Identification of phytoplasmas from *Neoaliturus haematoceps* associated with sesame phyllody disease in southwestern Turkey. Journal of Phytopathology, 166(4): 242–248. https://doi.org/10.1111/jph.12681
ÖZDEMIR, Z., and CAGIRGAN, M. I. 2015. Identification and characterization of a phytoplasma disease of jute (*Corchorus olitorius* L.) from south-western Turkey. Crop Protection, 74, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.018
PACIFICO, D., ALMA, A., BAGNOLI, B., FOISSAC, X., PASQUINI, G., TESSITORI, M., and MARZACHÌ, C. 2009. Characterization of Bois Noir Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of a Stolbur-Specific

Putative Membrane Protein Gene. Phytopathology, 99(6): 711–715. https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-6-0711

PAGLIARANI, C., GAMBINO, G., FERRANDINO, A., CHITARRA, W., VRHOVSEK, U., CANTU, D., PALMANO, S., MARZACHÌ, C., and SCHUBERT, A. 2020. Molecular memory of Flavescence dorée phytoplasma in recovering grapevines. Horticulture Research, 7(1), 126. https://doi.org/10.1038/s41438-020-00348-3

PAPURA, D., BURBAN, C., VAN HELDEN, M., GIRESSE, X., NUSILLARD, B., GUILLEMAUD, T., and KERDELHUÉ, C. 2012. Microsatellite and Mitochondrial Data Provide Evidence for a Single Major Introduction for the Neartic Leafhopper *Scaphoideus titanus* in Europe. PLoS ONE, 7(5), e36882. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036882

PASSERA, A., ZHAO, Y., MUROLO, S., PIERRO, R., ARSOV, E., MORI, N., MOUSSA, A., SILLETTI, M. R., CASATI, P., PANATTONI, A., WEI, W., MITREV, S., MATERAZZI, A., LUVISI, A., ROMANAZZI, G., BIANCO, P. A., DAVIS, R. E., and QUAGLINO, F. 2020. Multilocus Genotyping Reveals New Molecular Markers for Differentiating Distinct Genetic Lineages among "*Candidatus* Phytoplasma Solani" Strains Associated with Grapevine Bois Noir. Pathogens, 9(11), 970. https://doi.org/10.3390/pathogens9110970

PATUI, S., BERTOLINI, A., CLINCON, L., ERMACORA, P., BRAIDOT, E., VIANELLO, A., and ZANCANI, M. 2013. Involvement of plasma membrane peroxidases and oxylipin pathway in the recovery from phytoplasma disease in apple (*Malus domestica*). Physiologia Plantarum, 148(2): 200–213. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01708.x

PLAVEC, J., KRIŽANAC, I., BUDINŠĆAK, Ž., ŠKORIĆ, D., and MUSIĆ, M. Š. 2015. A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. European Journal of Plant Pathology, 142(3): 591–601. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0637-4

POLI, Y., NALLAMOTHU, V., BALAKRISHNAN, D., RAMESH, P., DESIRAJU, S., MANGRAUTHIA, S. K., VOLETI, S. R., and NEELAMRAJU, S. 2018. Increased Catalase Activity and Maintenance of Photosystem II Distinguishes High-Yield Mutants From Low-Yield Mutants of Rice var. Nagina22 Under Low-Phosphorus Stress. Frontiers in Plant Science, *9*, 1543. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01543

POROTIKOVA, E. V., YURCHENKO, E. G., and VINOGRADOVA, S. V. 2020. First Report of '*Candidatus* Phytoplasma solani' Associated with Bois Noir on Grapevine (*Vitis vinifera*) in Krasnodar Region of Russia. Plant Disease, 104(1): 277–277. https://doi.org/10.1094/pdis-03-19-0508-pdn

PRADIT, N., RODRIGUEZ-SAONA, C., KAWASH, J., and POLASHOCK, J. 2019. Phytoplasma Infection Influences Gene Expression in American Cranberry. Frontiers in Ecology and Evolution, 7, 178. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00178

PREZELJ, N., COVINGTON, E., ROITSCH, T., GRUDEN, K., FRAGNER, L., WECKWERTH, W., CHERSICOLA, M., VODOPIVEC, M., and DERMASTIA, M. 2016. Metabolic consequences of infection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. "modra frankinja" with flavescence dorée phytoplasma. Frontiers in Plant Science, 7(MAY2016), 711. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00711

PREZELJ, N., NIKOLIĆ, P., GRUDEN, K., RAVNIKAR, M., and DERMASTIA, M. 2013. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. Plant Pathology, 62(4): 760–766. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02693.x

PŘIBYLOVÁ, J., and ŠPAK, J. 2013. Dodder Transmission of Phytoplasmas. In: M. Dickinson & J. Hodgetts (Ed.), Phytoplasma Methods and Protocols (ss. 41–46). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_4

QUAGLINO, F., MAGHRADZE, D., CASATI, P., CHKHAIDZE, N., LOBJANIDZE, M., RAVASIO, A., PASSERA, A., VENTURINI, G., FAILLA, O., and BIANCO, P. A. 2016. Identification and Characterization of New ' *Candidatus* Phytoplasma solani' Strains Associated with Bois Noir Disease in *Vitis vinifera* L. Cultivars Showing a Range of Symptom Severity in Georgia, the Caucasus Region. Plant Disease, 100(5): 904–915. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-0978-RE

QUAGLINO, F., MUROLO, S., ZHAO, Y., CASATI, P., DURANTE, G., WEI, W., BIANCO, P. A., ROMANAZZI, G., and DAVIS, R. E. 2017. Identifcation of new -J and -K 16SrXII subgroups and distinct single nucleotide polymorphism genetic lineages among 'Candidatus Phytoplasma solani' strains associated with bois noir in Central Italy. Australasian Plant Pathology, 46: 31–34.

QUAGLINO, F., SANNA, F., MOUSSA, A., FACCINCANI, M., PASSERA, A., CASATI, P., BIANCO, P. A., and MORI, N. 2019. Identification and ecology of alternative insect vectors of '*Candidatus* Phytoplasma solani' to grapevine. Scientific Reports, 9(1): 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56076-9

QUAGLINO, F., ZHAO, Y., CASATI, P., BULGARI, D., BIANCO, P. A., WEI, W., and DAVIS, R. E. 2013. "*Candidatus* Phytoplasma solani", a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(PART8): 2879–2894. https://doi.org/10.1099/ijs.0.044750-0

RADONJIĆ, S., HRNČIĆ, S., KRSTIĆ, O., CVRKOVIĆ, T., MITROVIĆ, M., JOVIĆ, J., and TOŠEVSKI, I. 2013. First report of alder yellows phytoplasma infecting common and grey alder (*Alnus glutinosa* and *A. incana*) in Montenegro. Plant disease, 97(5): 686-686. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1087-PDN

RAO, G. P., BERTACCINI, A., FIORE, N., and LIEFTING, L. W. 2018. *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I* (G. P. Rao, A. Bertaccini, N. Fiore, & L. W. Liefting (ed.)). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3

RASOOL, A., JAHAN, M., SHAZAD, U., TARIQ, A., and CALICA, P. N. 2020. Effect of Phytoplasma Infection on Primary and Secondary Metabolites andAntioxidative Enzyme Activities of Sweet Orange (*Citrus sinenses* L.). Journal of Plant Pathology & Microbiology, 11(10): 519.

REISENZEIN, H., and STEFFEK, R. 2011. First outbreaks of grapevine "flavescence dorée" in Austrian viticulture. Bulletin of Insectology, 64: 223–224.

RIEDLE-BAUER, M., SÁRA, A., and REGNER, F. 2008. Transmission of a Stolbur Phytoplasma by the Agalliinae Leafhopper Anaceratagallia ribauti (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). Journal of Phytopathology, 156(11–12): 687–690. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01416.x

ROMANAZZI, G., and MUROLO, S. 2008. Partial Uprooting and Pulling to Induce

Recovery in Bois noir-Infected Grapevines. Journal of Phytopathology, 156(11–12): 747–750. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01424.x

ROMANAZZI, G., MUROLO, S., and FELIZIANI, E. 2013. Effects of an innovative strategy to contain grapevine Bois noir: Field treatment with resistance inducers. Phytopathology, 103(8): 785–791. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0031-R

RUSJAN, D., HALBWIRTH, H., STICH, K., MIKULIČ-PETKOVŠEK, M., and VEBERIČ, R. 2012a. Biochemical response of grapevine variety "Chardonnay" (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (Bois noir). *European* Journal of Plant Pathology, 134(2): 231–237. https://doi.org/10.1007/s10658-012-9988-2

RUSJAN, D., and MIKULIC-PETKOVSEK, M. 2015. Phenolic responses in 1-year-old canes of *V itis vinifera* cv. Chardonnay induced by grapevine yellows (Bois noir). Australian Journal of Grape and Wine Research, 21(1): 123–134. https://doi.org/10.1111/ajgw.12106

RUSJAN, D., VEBERIČ, R., and MIKULIČ-PETKOVŠEK, M. 2012b. The response of phenolic compounds in grapes of the variety "Chardonnay" (*Vitis vinifera* L.) to the infection by phytoplasma Bois noir. European Journal of Plant Pathology, 133(4): 965–974. https://doi.org/10.1007/s10658-012-9967-7

RYALS, J. A., NEUENSCHWANDER, U. H., WILLITS, M. G., MOLINA, A., STEINER, H. Y., and HUNT, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell, 8(10): 1809–1819. https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809

ŠAFÁŘOVÁ, D., ZEMÁNEK, T., VÁLOVÁ, P., and NAVRÁTIL, M. 2016. 'Candidatus phytoplasma cirsii', a novel taxon from creeping thistle [*Cirsium arvense* (L.) Scop.]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(4): 1745–1753. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000937

SAIRAM, R. K., and SAXENA, D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science, 184(1): 55–61. https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2000.00358.x

SAITOU, N., and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4(4): 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

SALEHI, E., SALEHI, M., TAGHAVI, S. M., and IZADPANAH, K. 2016. First report of a 16SrIX group (pigeon pea witches'-broom) phytoplasma associated with grapevine yellows in Iran. Journal of Plant Pathology, 98(2): 376.

SALEHI, E., TAGHAVI, S. M., SALEHI, M., and IZADPANAH, K. 2014. Partial biological and molecular characterization of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Fars and Lorestan provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 50(2): 55–64.

SANTI, S., DE MARCO, F., POLIZZOTTO, R., GRISAN, S., and MUSETTI, R. 2013. Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. Frontiers in Plant Science, 4(JUN), 171. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00171

SAWAYANAGI, T., HORIKOSHI, N., KANEHIRA, T., SHINOHARA, M., BERTACCINI, A., COUSIN, M. T., HIRUKI, C., and NAMBA, S. 1999. "*Candidatus* Phytoplasma japonicum", a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. International Journal of Systematic

Bacteriology, 49(3), 1275–1285. https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1275
SCANDALIOS, J. G., LINGQIANG, G., and POLIDOROS, A. N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. pp. 343-406.
SCHNEIDER, B., GIBB, K. S., and SEEMÜLLER, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. Microbiology, 143(10): 3381–3389. https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3381
SCHNEIDER, B., and SEEMÜLLER, E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. Applied and Environmental Microbiology, 60(9): 3409-3412.
SCHNEIDER, B., TORRES, E., MARTÍN, M. P., SCHRÖDER, M., BEHNKE, H. D., and SEEMÜLLER, E. 2005. "*Candidatus* Phytoplasma pini", a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, *55*(1): 303–307. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63285-0
SCHVESTER, D., CARLE, P., and MOUTOUS, G. 1961. Sur la transmissiondela flavescence dorée des vignes par une cicadelle. ComptesRendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France, 47, 1021–1024.
SEEMÜLLER, E., and SCHNEIDER, B. 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *I*nternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4): 1217–1226. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02823-0
SERTKAYA, G., MARTINI, M., ERMACORA, P., MUSETTI, R., and OSLER, R. 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. Phytoparasitica, 33(4): 380–390. https://doi.org/10.1007/BF02981306
SERTKAYA, G., MARTINI, M., MUSETTI, R., and OSLER, R. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. Bulletin of Insectology, 60(2): 141-142.
SFORZA, R., CLAIR, D., DAIRE, X., LARRUE, J., and BOUDON-PADIEU, E. 1998. The Role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the Occurrence of Bois noir of Grapevines in France. Journal of Phytopathology, 146(11–12): 549–556. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04753.x
SHARON, R., HARARI, A. R., ZAHAVI, T., RAZ, R., DAFNY-YELIN, M., TOMER, M., SOFER-ARAD, C., WEINTRAUB, P. G., and NAOR, V. 2015. A yellows disease system with differing principal host plants for the obligatory pathogen and its vector. Plant Pathology, 64(4): 785–791. https://doi.org/10.1111/ppa.12316
SHETTY, K., CURTIS, O. F., LEVIN, R. E., WITKOWSKY, R., and ANG, W. 1995. Prevention of Vitrification Aßociated with in vitro Shoot Culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by Pseudomonas spp. Journal of Plant Physiology, 147(3–4): 447–451. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82181-4
SIPAHIOGLU, H. M., DEMIR, S., MYRTA, A., AL RWAHNIH, M., POLAT, B., SCHENA, L., USTA, M., AKKOPRU, A., SELCUK, M., IPPOLITO, A., and MINAFRA, A. 2006. Viroid, phytoplasma, and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural

Science, 34(1): 1–6. https://doi.org/10.1080/01140671.2006.9514380

SMART, C. D., SCHNEIDER, B., BLOMQUIST, C. L., GUERRA, L. J., HARRISON, N. A., AHRENS, U., LORENZ, K. H., SEEMÜLLER, E., and KIRKPATRICK, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Applied and environmental microbiology, 62(8): 2988–2993. https://doi.org/10.1128/AEM.62.8.2988-2993.1996

SPOEL, S. H., and DONG, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nature Reviews Immunology 12(2): 89–100. https://doi.org/10.1038/nri3141

TAMURA, K., NEI, M., and KUMAR, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(30): 11030–11035. https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101

ULUBAŞ SERÇE, Ç., GAZEL, M., ÇAGLAYAN, K., BAŞ, M., and SON, L. 2006. Phytoplasma Diseases Of Fruit Trees in Germplasm and Commercial Orchards in Turkey. Journal of Plant Pathology, 88(2): 179–185.

URWIN, R., and MAIDEN, M. C. J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends in Microbiology, 11(10): 479–487. https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006

USTA, M., GÜLLER, A., and SIPAHIOĞLU, H. M. 2017. Detection and characterization of two phytoplasma lineages on cucumber (*Cucumis sativus* L.) with same symptomatology based on virtual RFLP and nucleotide sequence analysis of 16S rDNA. Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences, 27(3): 299–308. https://doi.org/10.29133/yyutbd.288346

USTUN, R., YOL, E., IKTEN, C., CATAL, M., and UZUN, B. 2017. Screening, selection and real-time qPCR validation for phytoplasma resistance in sesame (*Sesamum indicum* L.). Euphytica, 213(7): 1–9. https://doi.org/10.1007/s10681-017-1936-y

VALIUNAS, D., STANIULIS, J., and DAVIS, R. E. 2006. "*Candidatus* Phytoplasma fragariae" a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, Fragaria x ananassa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(1): 277–281. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63935-0

VALLET, C., CHABBERT, B., CZANINSKI, Y., and MONTIES, B. 1996. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. Annals of Botany, 78(5): 625–632.

VELIKOVA, V., YORDANOV, I., and EDREVA, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151(1): 59–66. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1

VERDIN, E., SALAR, P., DANET, J. L., CHOUEIRI, E., JREIJIRI, F., EL ZAMMAR, S., GÉLIE, B., BOVÉ, J. M., and GARNIER, M. 2003. "*Candidatus* phytoplasma phoenicium" sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International* Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(3): 833–838. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02453-0

WEI, W., LEE, I. M., DAVIS, R. E., SUO, X., and ZHAO, Y. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of

new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(10): 2368–2377. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0

WEINTRAUB, P. G., and BEANLAND, L. 2006. Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of* Entomology, 51(1): 91–111. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039

WEINTRAUB, P. G., and JONES, P. 2010. Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical, 44(8): 085201. https://doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201

WHITE, D. T., BLACKALL, L. L., SCOTT, P. T., and WALSH, K. B. 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in "*Candidatus* Phytoplasma australiense" and a new taxon, "Candidatus Phytoplasma australasia". International Journal of Systematic Bacteriology, 48(3): 941–951. https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-941

WIN, N. K. K., LEE, S. Y., BERTACCINI, A., NAMBA, S., and JUNG, H. Y. 2013. "*Candidatus* Phytoplasma balanitae" associated with witches' broom disease of Balanites triflora. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(PART2): 636–640. https://doi.org/10.1099/ijs.0.041566-0

WOESE, C. R., and FOX, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(11): 5088–5090. https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088

XUE, C., LIU, Z., DAI, L., BU, J., LIU, M., ZHAO, Z., JIANG, Z., GAO, W., and ZHAO, J. 2018. Changing Host Photosynthetic, Carbohydrate, and Energy Metabolisms Play Important Roles in Phytoplasma Infection. Phytopathology, 108(9): 1067–1077. https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-18-0058-R

ZAFARI, S., NIKNAM, V., MUSETTI, R., and NOORBAKHSH, S. N. 2012. Effect of phytoplasma infection on metabolite content and antioxidant enzyme activity in lime (*Citrus aurantifolia*). Acta Physiologiae Plantarum, 34(2): 561–568. https://doi.org/10.1007/s11738-011-0855-0

ZAMBON, Y., CANEL, A., BERTACCINI, A., and CONTALDO, N. 2018. Molecular Diversity of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows Disease in North-Eastern Italy. Phytopathology, 108(2): 206–214. https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0253-R

ZAMHARIR, M. G., and MIRABOLFATHI, M. 2011. Association of a Phytoplasma with Pistachio Witches' Broom Disease in Iran. Journal of Phytopathology, 159(1): 60–62. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01697.x

ZHAO, Y., SUN, Q., WEI, W., DAVIS, R. E., WU, W., and LIU, Q. 2009a. '*Candidatus* phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59(10): 2496–2504. https://doi.org/10.1099/ijs.0.010413-0

ZHAO, Y., WEI, W., DAVIS, R. E., and LEE, I. M. 2009b. Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. in: Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors (pp. 64–92). CABI. https://doi.org/10.1079/9781845935306.0064

ZHAO, Y., WEI, W., LEE, I.-M., SHAO, J., SUO, X., and DAVIS, R. E. 2009c. 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 Systemic and Evolutionary Microbiology, 59(10): 2582–2593. https://doi.org/10.1099/ijs.0.010249-0

ZREIK, L., CARLE, P., BOVE, J. M., and GARNIER, M. 1995. Characterization of the mycoplasmalike organism associated with Witches'- broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, "*Candidatus* phytoplasma aurantifolia". International Journal of Systematic Bacteriology, 45(3): 449–453. https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-449

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER
Adı Soyadı **:** Eray ŞİMŞEK

EĞİTİM

Derece	**Alan**	**Okul**	**Yılı**
Lisans	Bitki Koruma	Ege Üniversitesi	2012
Yüksek Lisans	Fitopatoloji	Harran Üniversitesi	2014
Doktora	Fitopatoloji	Harran Üniversitesi	2021

Yayınlar:

Şimşek, E., Güldür, M.E. (2021). Detection and Molecular Characterization of Phytoplasmas based on 16S rDNA gene region by phylogenetic and *in silico* RFLP analysis of Local Grapevine Cultivars in Şanlıurfa and Adıyaman. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, (in press).

EKLER

EK1: GenBankasından ve Çeşitli yayınlardan derlenen VMP1 ve Stamp geni profilleri

VMP1		***Stamp***		**Strain adı**	**Konukçu**	**Bölge**
Varyant	**GenBank**	**Varyant**	**GenBank**			
VM10	KC703031	ST2	KC703017	Rqg31	*Reptalus quinquecostatus*	Sırbistan
VM10	**KC703032**	**ST2**	**KC703018**	**Vv17**	***Vitis vinifera***	**Sırbistan**
VM10	KC703023	ST4	KC703009	Rpg39	*Reptalus panzeri*	Sırbistan
VM10	KC703024	ST4	KC703010	Rpm34	*Reptalus panzeri*	Sırbistan
VM10	KC703025	ST4	KC703011	Rqg60	*Reptalus quinquecostatus*	Sırbistan
VM10	**AM992103**	**ST4**	**FN813261**	**STOL**	***Capsicum annuum***	**Sırbistan**
VM10	KC703027	ST4	KC703013	Vexp Rpg11	*Reptalus panzeri*	Sırbistan
VM10	KC703028	ST4	KC703014	Vexp Rpm5	*Reptalus panzeri*	Sırbistan
VM10	KC703026	ST4	KC703012	Vv21	*Vitis vinifera*	Sırbistan
VM11	**JQ977735**	**ST5**	**JQ977720**	**LA6_I_C**	***Convolvulus arvensis***	**Almanya**
VM12	**AM992102**	**ST5**	**FN813256**	**GGY**	***Vitis vinifera***	**Almanya**
VM14	**KJ469734**	**ST2**	**KJ469724**	**Vv12_Kn6**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM14	**KJ469734**	**ST3**	**KJ469723**	**Vv12_751**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM14	**KJ469734**	**ST5**	**KJ469721**	**Vv12_754**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM15	KJ145346	ST9	KJ145345	60/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM15	HM008614	ST9	KJ145387	Aa25	*Vitis vinifera*	İtalya
VM15	**KJ469727**	**ST9**	**KJ469718**	**Ho13_1006**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM18	**KJ469729**	**ST8**	**KJ469720**	**Ho13_838**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM23	**KJ469728**	**ST19**	**KJ469719**	**CrHo13_1183**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM25	**KF957605**	**ST6**	**KF957607**	**MK44**	***Vitis vinifera***	**Makedonya**
VM27	**HM008602**	**ST21**	**KJ145380**	**Aa16**	***Vitis vinifera***	**İtalya**

VM28	**KC703033**	**ST1**	**KC703019**	**Rqg50**	***Reptalus quinquecostatus***	**Sırbistan**
VM28	KP739858	ST1	KP739854	17-11	*Vitis vinifera*	Bosna Hersek
VM28	KJ469735	ST1	KJ469722	CrAr12_722_2	*Anaceratagallia ribauti*	Avusturya
VM28	KC703034	ST1	KC703020	Rpg47	*Reptalus panzeri*	Sırbistan
VM28	**KJ469735**	**ST5**	**KJ469721**	**Vv12_752**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM28	**HM008601**	**ST18**	**KJ145383**	**Aaq1**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM28	KJ145354	ST20	KJ145340	136/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM28	KJ145355	ST20	KJ145343	166/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM28	**HM008599**	**ST20**	**KJ145382**	**Mca21**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM28	KJ145353	ST20	KJ145342	P10/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM33	**KJ469730**	**ST5**	**KJ469721**	**CrHo12_601**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM34	**AM992101**	**ST11**	**FN813267**	**19-25**	***Vitis vinifera***	**Almanya**
VM35	**AM992095**	**ST10**	**FN813270**	**PO**	***Hyalesthes obsoletus***	**Fransa**
VM36	**KC703030**	**ST31**	**KC703016**	**Rqg42**	***Reptalus quinquecostatus***	**Sırbistan**
VM38	**AM992097**	**ST10**	**FN813259**	**LG**	***Solanum lycopersicum***	**Fransa**
VM39	**KJ145349**	**ST5**	**KJ145334**	**78/11**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM40	**HM008607**	**ST32**	**KJ145376**	**Mp49**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM44	**HM008612**	**ST22**	**KJ145375**	**Mvercer2**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM45	**KJ145360**	**ST5**	**KJ145330**	**315/11**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM45	KJ145358	ST5	KJ145336	P136/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM45	KJ145357	ST5	KJ145333	P75/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM46	KJ145350	ST1	KJ145337	115/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM46	KJ145352	ST1	KJ145338	353/11	*Vitis vinifera*	İtalya
VM46	HM008605	ST1	KJ145377	Ag4a	*Vitis vinifera*	İtalya

VM46	**HM008606**	**ST1**	**KJ145379**	**Mp46**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM46	KU588192	ST1	KU588188	PM1	*Solanum tuberosum*	Karadağ
VM46	KC703035	ST1	KC703021	Vv5	*Vitis vinifera*	Sırbistan
VM46	**KC703029**	**ST3**	**KC703015**	**Rpm35**	***Reptalus panzeri***	**Sırbistan**
VM46	**KJ145351**	**ST5**	**KJ145332**	**287/11**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM46	**KC703036**	**ST30**	**KC703022**	**Vv24**	***Vitis vinifera***	**Sırbistan**
VM50	**KJ469732**	**ST5**	**KJ469721**	**Ca13_RF**	***Convolvulus arvensis***	**Avusturya**
VM53	**AM992100**	**ST15**	**FN813258**	**P7**	***Catharanthus roseus***	**Lübnan**
VM53	**KT184878**	**ST15**	**KT184885**	**Tsol89**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM53	KT184878	ST15	KT184885	Kiqu84	*Vitis vinifera*	Gürcistan
VM54	**KJ145356**	**ST20**	**KJ145341**	**P42/11**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM57	**KJ469731**	**ST1**	**KJ469722**	**CrHo12_721**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM59	**KF957606**	**ST11**	**KF957609**	**MK94**	***Vitis vinifera***	**Makedonya**
VM60	**KJ469725**	**ST11**	**KJ469716**	**CrHo12_650**	***Hyalesthes obsoletus***	**Avusturya**
VM61	**KJ469726**	**ST29**	**KJ469717**	**Vv12_274**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM62	**KJ145348**	**ST5**	**KJ145335**	**425/11**	***Vitis vinifera***	**İtalya**
VM63	**KJ469733**	**ST1**	**KJ469722**	**Vv12_Ill6**	***Vitis vinifera***	**Avusturya**
VM64	**KT184867**	**ST35**	**KT184879**	**Carv1**	***Convolvulus arvensis***	**Gürcistan**
VM65	**KT184868**	**ST36**	**KT184880**	**Carv2**	***Convolvulus arvensis***	**Gürcistan**
VM66	**KT184869**	**ST37**	**KT184881**	**Char7**	***Convolvulus arvensis***	**Gürcistan**
VM67	**KT184870**	**ST38**	**KT184882**	**Char8**	***Convolvulus arvensis***	**Gürcistan**
VM68	**KT184871**	**ST38**	**KT184882**	**Sape19**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM69	**KT184872**	**ST38**	**KT184882**	**GoMt25**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM70	**KT184873**	**ST37**	**KT184881**	**Kisi38**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM71	**KT184874**	**ST37**	**KT184881**	**Rkat47**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**

VM71	KT184874	ST37	KT184881	Sape51	*Vitis vinifera*	Gürcistan
VM71	KT184874	ST37	KT184881	Sape62	*Vitis vinifera*	Gürcistan
VM73	**KT184875**	**ST39**	**KT184883**	**Amla77**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM74	**KT184877**	**ST40**	**KT184884**	**Sabu84**	***Vitis vinifera***	**Gürcistan**
VM76	KT766176	ST1	KP739847	G24-13	*Vitis vinifera*	Bosna Hersek
VM76	KU588193	ST1	KU588189	PM2	*Solanum tuberosum*	Karadağ

EK2: Çalışmadan elde edilen izolatların ilgili DNA dizileri

```
>ERAY_SIMSEK_GrS19_SECY1
    Length = 908
CATCAAAACT TTTTGGTTTA GGCATTTATC CTTATATTAC AGCTTCTATT GTAGTTCAAT
TTTTACAAAA ACTTTTACCT ATTTGCCGTG AGTGGAAAGA ACAAGGCCAA ATCGGTAAAC
GTAAACTTAA CCTTTTAACT AGGGCTTTAG CTTTATTATT TGTTTTTGGA CAAACTTTTG
GAATGATTCA AAAAACAAGT GATTCATTGG CAGTTTGCTT TTTGATCCCT TTAATTGCCG
CTGCTGGATG TGCTATTTTA ATTTGGTTTG CTGATTTAAT CAACTCTCAA GGGATTGGTA
ATGGAACTTC TATTTTAATT ATGGCCTCAA TGAGTAATAA TTTAATTGAC TCTTTAAAAG
AAATAAAACA AAATTATTAC GACAATTTAT TTACCAACAA TTTTGACCCA AAATTGCTAA
CACAATTTAT TTTAATTATC TTAGTATTGC TTTTATTTTT AATTGTAACT GTGATTGTCC
AAATTACTTC TTTAAAAATA CCAGTACAAT ACGCTCGCAA TCAAAGTCCA TCAAAAAGTA
ATAGTTATAT CCCTTTTAAA ATTAACACTG CTGGAGTAAT GCCTGTAATT TTGGCAAATG
CCTTGATGCA ACCTTTCAAA ATGTTAATCC CAATAATTAA AAATAATCAA GGTTTTGAGA
ATTTTGTCAA TTATTTAACT AATATTGACA TCGTTAATTT TGCTTTGAGC TTGCATATTT
TATTAATTAT TGTTTTTTCT TTTTTCTCTA CTTTTATGAA TGTTAATCCT GAAGATATTT
CCGAGCATTT ATCCAAACAA GATGCCTATA TTGTTGGTTT TAGACCAGGA GAACAAACAA
TGAAATACTT ATCTTCTCTT TTGTTCAAAG TGTTTTTTGG AAAAAAACAC ACAAAAAAAA
TCACAGTG*
```

>ERAY_SIMSEK_GrS19_TUF1
Length = 906

TATGACCAAA TTGATAACGC TCCTGAAGAA AGAGAACGTG GAATTACGAT TAAAACTTCT
CACGTTGAAT ATGAAACATC AAAAAGACAC TATGCTCACG TTGATTGTCC AGGACACGCC
GATTATATTA AAAACATGAT TACTGGTGCT GCTCAAATGG ATGCCGCTAT TTTAGTAGTT
TCTGGCGCAG ATAGTGTTAT GCCTCAAACT AGAGAACATA TTTTGTTAGC TCGCCAAGTA
GGGGTTCCTA AAATTGTTGT TTTCTTAAAC AAATGTGACC TTTGTCCGGA TGAAGAAATT
TTAGAATTAG TTGAAATGGA AGTCCGTGAA TTATTATCTA AATATGATTT TCCGGGCGAT
GATACCCCTA TTATTAGAGG TTCTGCGTTA AAAGCTTTAG AAGGTGACAA ACATTACATT
GCACAAGTTA ACGAATTAAT CAACGCTTTA GATTCTTACA TTGAAGATCC AGTGCGTGAA
GTTGATAAAC CTTTCTTAAT GCCAGTCGAA GATGTTTTCA CTATCACTGG TAGAGGAACA
GTAGTTACTG GTAGAGTTGA AAGAGGACAA GTTAAAGCTG GTGATGAAAT AGAAATCATA
GGTCTTAAAG ACACTAGAAA AACCATCGTA ACAGCAATTG AAATGTTTAA AAAAGATTTA
GATTTTGCTC AAGCAGGCGA TAACGTTGGA GCTTTGTTGC GTGGAATTAA CCGTGAAGAT
GTTCAACGTG GTCAAGTGTT AGCCAAACCA GGTTCTGTGA AACCTCATTT TCAATTTGTG
GCGCAAGCTT ATATCTTAAC TAAAGAAGAA GGAGGACGAC ACACTGCCTT TTTTTCCCAA
TACCGTCCGC AATTCTATTT CCGTACAACT GATATTACAG GAGTTGTTGA ATTACAAGGT
GATGTT*

>ERAY_SIMSEK_GrS19_VMP1
Length = 1293

GTTTTGACTT TCGCTTCAAC TAAACATTTG GTAGCTGCAG CCAGTACAAC TGCTCCTAAT
TTGGAAGGAA AAGTAACATA TAATAAAACA AAACCAACCA TAGCACAATT AAATAGTTTG
TTAAAATCAA CAAATACAGC GATTATTTTA ACTAGTGAAG AAAGCAGAAA CCCTAATCAT
CAATCAGTTT TAAATAAAGT TTTAAACCCT GGCCAAAATT TATCTTCAGA GATGGTTAAT
ATTAGTTTTA ACAGCAGCAC TTCTGAATTA AAAATAGCAG TGGCAAGCAG TTGTTGTACA
ATAACAGGCT CAGAAGTTGT TTTTAACCAA ATATCAGTCA CCCAAGATTT AAGCACTTTC
ACAAAAACTC CAACAGATCA AGCAATTACT GTTACACAAG CAGAATCTAC AAATCCAACC
CAAGGGACTG TAAATAAGTT CTTACAAACA GCTGGTTCAT TGACTGTAGG TACTGATGTA
ACAATTACAT TTAACGCTAA CGAAAGAAAA GCAACCCTTG CTGTTGTTGC AAATTCTACT
AGAGCACAAG GTGATAATGT TGTATTTACT AATGTAACAG TAACAGTAGA AAAACAAGAT
TTAAGCACTT TCACACACGA TAATAAAAAT AAAGCAATTA CTATTACACA AGCAGAATCT
ACAACTCCAA CTCAAGACAC TTTAAATAAA TTCTTACAAA CAGCTGGTTC ATTGACTGTA
GGTACTGATG TAACAATTAC ATTTAATGCT AACGAAAGAA AAGCAACCCT TACTGCGACT
CCAAATTCTA CTCAAGCAAA AGGTAATGTT GTATTTACTA ATGTAACAGT AGAAAAACAA
GATTTAAGCA ATTTCACAAA ACCTACAACT GAAACAATTA CTGTTACACA AGCAGAAGTT
ACAAGTAAAG ACCAAAATGC TTTAAATAAA TTCTTAAAAC AAGCTGGTTC ATTAACTGTA
AATACTGATG CAACAATTGA ATTTGATACT ACCAACAAAA AAGCAACTAT TACTGCGACT
CCAAATTCTA CTCAAGCAAA AGGTAATGTT GTATTTACTA ATGTAACAGT AGAAAAACCA
GAATTAAACA CAACATTAAC AGTAAAAGAG TTAGGTCAAA TAAATGCAAG AACTCAAGCT
GCAGTTAAAG CTGCAATGTT AAGTAAAAAT ACTAATTTAC AAAATGTAGA CCAAAATAGA
TTTACAATTA CTTTAGATAC TGATGCTAGC AAAAACAAAG CAACAGTAAC GCATCCAGAT
TTTGCTGATG CAGTAGAAGT TTCATTTAGC GTT*

>Eray_SIMSEK_GrS19_16SrDNA
Length = 1199

ATAGGAGATA AGAAGGCATC TTTTTATTTT TAAAAGACCT AGCAATAGGT ATGCTTAGGG
AAGAGCTTGC GTCACATTAG TTAGTTGGTG GGGTAATGGC CTACCAAGAC GATGATGTGT
AGCCGGGCTG AGAGGTCGAA CGGCCACATT GGGACTGAGA CACGGCCCAA ACTCCTACGG
GAGGCAGCAG TAAGGAATTT TCGGCAATGG AGGAAACTCT GACCGAGCAA TGCCGCGTGA
ACGATGAAGT ATTTCGGTAC GTAAAGTTCT TTTATTAGGG AAGAAAAGAT GGTGGAAAAA
CCATTATGAC GGTACCTAAT GAATAAGCCC CGGCTAACTA TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
TACATAGGGG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGTGCGTA GGCGGTTAAA
TAAGTTTATG GTCTAAGTGC AACGCTCAAC GTTGTGATGC TATAAAAACT GTTTAGCTAG
AGTTGGATAG AGGCAAGTGG AATTCCGTGT GTAGTGGTAA AATGCGTAAA TATACGGAGG
AACACCAGAA GCGAAGGCGG CTTGCTGGGT CTTAACTGAC GCTGAGGCAC GAAAGCGTGG
GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCCTA AACGATGAGT ACTAAACGTT
GGATAAAACC AGTGTTGAAG TTAACACATT AAGTACTCCG CCTGAGTAGT ACGTACGCAA
GTATGAAACT TAAAGGAATT GACGGGACTC CGCACAAGCG GTGGATCATG TTGTTTAATT
CGAAGGTACC CGAAAAACCT CACCAGGTCT TGACATGCTT TTGCAAAGCT GTAGAAATAC
AGTGGAGGTT ATCAGAAGCA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTGTTGTTAA TTGCCATCAT TAAGTTGGGG
ACTTTAGCAA GACTGCCAAT GATAAATTGG AGGAAGGTGG GGACGACGTC AAATCATCAT
GCCCCTTATG ACCTGGGCTA CAAACGTGAT ACAATGGCTG TTACAAAGGG TAGCTAAAGC
GTAAGCTTCT GGCGAATCTC AAAAAAGCAG TCTCAGTTCG GATTGAAGTC TGCAACTCGA
CTTCATGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGC GAATCAGCAT GTCGCGGTGA ATACGTTCT*

>Eray_SIMSEK_GrS72_16SrDNA
Length = 1202

ATAGGAGACA AGAAGGCATC TTCTTGTTTT TAAAAGACCT AGCAATAGGT ATGCTTAGGG
AGGAGCTTGC GTCACATTAG TTAGTTGGTG GGGTAAAGGC CTACCGAGAC TATGATGTGT
AGCCGGGCTG AGAGGTTGAA CGGCCACATT GGGACTGAGA CACGGCCCAA ACTCCTACGG
GAGGCAGCAG TAGGGAATTT TCGGCAATGG AGGAAACTCT GACCGAGCAA CGCCGCGTGA
ACGATGAAGT ATTTCGGTAC GTAAAGTTCT TTTATTAGGG AAGAATAAAT GATGGAAAAA
TCATTCTGAC GGTACCTAAT GAATAAGCCC CGGCTAACTA TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
TACATAGGGG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGTGCGTA GGCGGTTAAA
TAAGTTTATG GTCTAAGTGC AATGCTTAAC ATTGTGATGC TATAAAAACT GTTTAACTAG
AGTAAGATAG AGGCAAGTGG AATTCCATGT GTAGTGGTAA AATGCGTAAA TATATGGAGG
AACACCAGTA GCGAAGGCGG CTTGCTGGGT CTTTACTGAC GCTGAGGCAC GAAAGCGTGG
GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAGT ACTAAATGTT
GGGTAAAACC AGTGTTGAAG TTAACACATT AAGTACTCCG CCTGAGTAGT ACGTACGCAA
GTATGAAACT TAAAGGAATT GACGGGACTC CGCACAAGCG GTGGATCATG TTGTTTAATT
CGAAGGTACC CGAAAAACCT CACCAGGTCT TGACATGCTT CTGCAAAGCT GTAGAAACAC
AGTGGAGGTT ATCAGTTGCA CAGGTGGTGC ATGGTGGTCG TCAGCCCGTG TCGTGAGATG
TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTATTGTTAG TTGCCAGCAC GTAATGGTGG
GGACTTTAGC AAGACTGCCA GTGATAAATT GGAGGAAGGT GGGGACGACG TCAAATCATC
ATGCCCCTTA TGACCTGGGC TACAAACGTG ATACAATGGC TGTTACAAAG GGTAGCTGAA
ACGTAAGTTT TTGGCGAATC TCAAAAAAAC AGTCTCAGTT CGGATTGAAG TCTGCAACTC
GACTTCATGA AGTTGGAATC GCTAGTAATC GCGAATCCAG CATGTCGCGG TGAATACGTT
CT*