T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİ BİBER (*Capsicum annuum* L.) ÜRETİM ALANLARINDA FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ, VEKTÖRLERİNİN ve DİĞER KONUKÇULARININ ARAŞTIRILMASI

HAKAN ÇARPAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
OCAK-2021

T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİ BİBER (*Capsicum annuum* L.) ÜRETİM ALANLARINDA FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ, VEKTÖRLERİNİN ve DİĞER KONUKÇULARININ ARAŞTIRILMASI

HAKAN ÇARPAR
ORCID:0000-0002-2511-4480

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA
ORCID:0000-0003-3319-1790

HATAY
OCAK-2021

27/01/2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Hakan ÇARPAR

ÖZET

HATAY İLİ BİBER (*Capsicum annuum* L.) ÜRETİM ALANLARINDA FİTOPLAZMA HASTALIKLARININ, VEKTÖRLERİNİN ve DİĞER KONUKÇULARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma 2015-2020 yılları arasında Hatay ilinde yetiştiriciliği yapılan biber alanlarındaki fitoplazma hastalıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada fitoplazmalara özgü sarılık, yaprakların kaşık şeklini alması, phyllody, virescence (yeşillenme), çiçeklerin dumura uğraması (sterility), iri tomurcuk, çalılaşma belirtisi gösteren biber, susam, fesleğen, patlıcan, domates ve yabancı otlardan örnekler alınmıştır. Ayrıca vektör böceklerin belirlenmesi amacıyla D-VAC ile böcek toplanmıştır. Bölgede yetiştiriciliği en çok yapılan salçalık biberlerde belirtiler %0,5-3 oranında gözlenir iken süs biberi ve Samandağ biberinde fitoplazma belirtilerine hiç rastlanmamıştır. Arazi içerisindeki susam ve fesleğen bitkilerinde bu oran %30 olarak tespit edilmiştir. Biber arazilerinde en çok *Empoasca* sp., *Cicadulina bipunctata* ve *Psammotettix* sp., türleri bulunurken bunları *Exitianus capicola*, *Euscelidius* sp., *Anaceratagallia laevis* ve *Balchutha hebe* türleri takip etmiştir. Kontrollü koşullarda yapılan T göz ve yonga aşı denemeleri ile hastalıklı bitkilerden sağlıklı test bitkilerine taşıma çalışmalarında susam ve fesleğen örneklerinden Cezayir menekşesine yapılan aşılamalarda başarılı olunmuştur. Tüm bitki örneklerinin toplam nükleik asit izolasyonları CTAB yöntemine göre yapılmış, böcek örneklerinde ise MN marka hazır kitlere göre yapılmıştır. Bitki örneklerinde fitoplazma tespitinde DAPI DNA boyamı yöntemi de kullanılmış ve fitoplazma varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda biber (*Capsicum annuum*), domates (*Solanum lycopersicum*), fesleğen (*Ocimum basilicum*), susam (*Sesamum indicum*) ve tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) bitkilerinde ve de bazı böcek türlerinde fitoplazmalar belirlenmiştir. Pozitif bulunan örnekler sekanslanmış ve MEGA X programında değerlendirilerek Genbankası'na sonuçlar yüklenmiştir. Genbankası'na yüklenen biber (MT993358), susam (MT994434), domates (MT992754), fesleğen (MT994432), *Empoasca* sp. (MT994430), *Exitianus capicola* (MT994433), *Euscelidius* sp. (MT994431) türlerinde *Candidatus* Phytoplasma trifolii; tarla sarmaşığı (MT993422) ve domates (MT992796) türlerinde *Candidatus* Phytoplasma solani tespit edilmiştir. Ayrıca biber örneklerinden fitoplazma tespit edilen 2 örnekte ELISA yöntemi ile cucumber mosaic virus (CMV) karışık enfeksiyon olarak bulunmuştur. Mevcut literatür bilgilere göre *Ca*. Phytoplasma trifolii, susam, fesleğen, *Exitianus capicola* ve *Euscelidius* sp.'de ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiş ve Genbankası'na yüklenmiştir.

2021, 88 sayfa.

Anahtar Kelimeler: Biber, *Ca*. Phytoplasma trifolii, fitoplazma, fesleğen, susam, Hatay.

ABSTRACT

INVESTIGATION on PHYTOPLASMA DISEASES, THEIR INSECT VECTORS and NATURAL HOSTS in PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GROWING AREAS of HATAY-TURKEY

This study was conducted to determine the phytoplasma diseases of pepper plants in Hatay province between 2015 and 2020. Samples of pepper, sesame, basil, eggplant, tomato and weeds which had typical phytoplasma symptoms of yellowing and rolling upwards of leaves, phyllody, virescence, sterility, big buds and witches' broom were collected from the pepper fields. Furthermore, insect samples were collected by D-VAC to determine the vector species. Symptoms were observed with a ratio of 0.5-3% on the peppers which are grown for pepper paste, no symptoms were observed from the chili peppers and Samandağ pepper. Sesame and basil plants in the pepper fields shown 30% ratio of these symptoms. *Empoasca* sp., *Cicadulina bipunctata* ve *Psammotettix* sp., *Exitianus capicola*, *Euscelidius* sp., *Anaceratagallia laevis* and *Balchutha hebe* were found as insect vectors of the phytoplasmas as descending order of population densities. T-bud and chip grafting methods were successful for phytoplasma transmission from infected sesame and basil plants to healthy periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) plants in controlled conditions. Total nucleic acid isolations from the plant samples were done by CTAB method and from insect samples by MN (Macherey-Nagel) DNA mini kit method. DAPI DNA dyeing method was also used to determine the phytoplasma presence. Phytoplasmas were detected in pepper, tomato, basil, sesame and bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) and some insect samples. DNA of positive samples were sequenced, processed by MEGA X software and uploaded to Genbank. Samples uploaded to Genbank were identified as *Candidatus* Phytoplasma trifolii on pepper (MT993358), sesame (MT994434), tomato (MT992754), basil (MT994432), *Empoasca* sp. (MT994430), *Exitianus capicola* (MT994433), *Euscelidius* sp. (MT994431); and as *Candidatus* Phytoplasma solani on binweed (MT993422) and tomato (MT992796). Moreover, cucumber mosaic virus (CMV) was determined by ELISA method in the two of the pepper samples as mixed infections with phytoplasmas. To our knowledge, this study is first to identify and upload to Genbank of *Ca*. Phytoplasma trifolii on sesame, basil, *Exitianus capicola* and *Euscelidius* sp.

2021, 88 pages.

Key Words: Basil, *Ca*. Phytoplasma trifolii, Hatay, pepper, phytoplasma, sesame.

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve değerlendirilmesi sırasında sahip olduğu değerli bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmaya yön veren ve hiçbir yardımı ve kıymetli vaktini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Nihat DEMİREL ve Doç. Dr. Eminur ELÇİ'ye, analiz programlarının kurulması, kullanılması ve sonuçların değerlendirilmesi konusunda kıymetli vakitlerini ayırarak yardımcı olan Doç. Dr. Eminur ELÇİ ve Doç. Dr. D. Soner AKGÜL'e, tez çalışmaları sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan MKÜ Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 15981) içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda ilk çalışmalarımı yürüttüğüm Alata Araştırma Genel Müdürlüğü'ne ve Ziraat Yüksek Mühendisi Bülent ALTAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Böcek örneklerimin teşhisini yapan Prof. Dr. Hüseyin BAŞPINAR (Adnan Menderes Üniversitesi) ve yabancı ot bitki türleri teşhisini yapan Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ hocalarıma özellikle teşekkürlerimi sunarım. Böceklerin fotoğraflanması ve düzenlenmesinde katkı sunan Ahmet Emin YILDIRIM ve Dr. Başak ULAŞLI'ya şükranlarımı bildiririm.

Arazi çalışmalarım sırasında gerek araç temini gerekse üretici işbirliği sağlama noktasında desteğini esirgemeyen Ömer SÜRMELİ (Sürmeli-Keleş Teknik Tarım) ve çocukları, değerli dostlarım, Mehmet, Ahmet, Mustafa ve Rüştü SÜRMELİ'ye, sıvı azot temininde yardımcı olan Mehmet ASLAN ve YETİŞEN KAUÇUK'a ve de çiftçilerimize özellikle de Avsuyu Mahallesi'nden Hikmet AKINCI amcaya sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen eşime ve sevgili kızlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu doktora tez çalışmamı beni bu günlere getiren, özveri ile yetiştiren sevgili babam ve anneme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
ÇİZELGELER DİZİNİ IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ X
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
3. MATERYAL ve YÖNTEM 13
3.1. Materyal 13
3.2. Yöntem 16
3.2.1.Arazi Çalışmaları 16
3.2.1.1. Biber Bitkilerinde Belirtilerin Değerlendirmesi 16
3.2.1.2. Fitoplazmalara Konukçu Olan Diğer Türlerin Belirlenmesi 17
3.2.1.3. Vektör Böceklerin Toplanmasına Yönelik Çalışmalar 18
3.2.1.4.Fitoplazmaların Arazide Doğal Taşınmasına Yönelik Çalışmalar 19
3.2.2. Kontrollü İklim Odası ve Sera Çalışmaları 20
3.2.2.1. Sağlıklı Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi 20
3.2.2.2. Şüpheli Bulunan Bitkilerin Kontrollü Koşullarda Kültüre Alınması 21
3.2.2.3. Doku Aşılaması İle Fitoplazmaların Sağlıklı Bitkilere Taşınması Çalışmaları 22
3.2.2.4. Tohumla Taşıma Çalışmaları 22
3.2.3. Laboratuvar Çalışmaları 23
3.2.3.1. DAPI ile DNA Boyama ve Florasan Mikroskopi Görüntülemesi 23
3.2.3.2. Moleküler Çalışmalar 23
3.2.3.2.1 Bitki ve Böcek Örneklerinde DNA İzolasyonu 23
3.2.3.2.2 Polymerase Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları 27
3.2.3.2.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi 28
3.2.3.2.4 DNA Dizi Analizi (Sekanslama) 28
3.2.3.2.5 Filogenetik Analizler 29
3.2.3.3. Serolojik Çalışmalar 29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 31
4.1. Arazi Çalışmaları 31
4.1.1. Konukçu Bitkilerde Belirtilerin Değerlendirmesi 32
4.1.2. Fitoplazmalara Konukçu Olan Diğer Türlerin Belirlenmesi 33
4.1.3. Vektör Böceklerin Toplanmasına Yönelik Çalışmalar 37

4.1.4. Şüpheli Bulunan Bitkilerin Kontrollü Koşullarda Kültüre Alınması 39
4.1.5. Fitoplazmaların Arazide Doğal Taşınmasına Yönelik Çalışmalar 39
4.2. Kontrollü İklim Odası ve Sera Çalışmaları 40
4.2.1. Doku Aşılaması ve Böcek Vektörler ile Fitoplazmaların Sağlıklı Bitkilere Bulaştırılması Çalışmaları 40
4.2.2. Tohumla Taşıma Çalışmaları 42
4.3. Laboratuvar Çalışmaları 43
4.3.1. DAPI ile DNA Boyama ve Florasan Mikroskopi Görüntülemesi 43
4.3.2. Moleküler Çalışmalar 44
4.3.2.1. Bitki ve Böcek Numunelerinden DNA İzolasyonu 44
4.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Direk PCR ve Nested-PCR) Çalışma Sonuçları 45
4.3.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi 48
4.3.2.4. DNZ Dizi Analizi (Sekans) 53
4.3.2.5. Filogenetik Analizler 53
4.3.3. Serolojik Çalışmalar 56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 58
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 80
EKLER 81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Hatay ilinde yoğun olarak biber üretimi yapılan ilçeler 13
Şekil 3.2. Arazilerde D-VAC aleti ile böcek toplama işlemi 14
Şekil 3.3. Hatay ili açık alan (A-F) ve örtüaltı (G-H) biber üretim alanlarından genel görünümler 15
Şekil 3.4. Biber bitkilerinin yapraklarında kaşıklanma belirtisi (A), aşırı sürgün oluşumu ve bodurlaşma belirtisi (B,C) ve çiçeklerin yeşillenmesi ile iri tomurcuk oluşumu (D) 16
Şekil 3.5. Biber arazilerinin içerisinde ya da kenar sıralarında yetiştirilen diğer türler: A) Patlıcan, B) Susam, süpürge otu, zeytin, C) Tütün, D) Kabak ve E) Fesleğen 17
Şekil 3.6. Hastalığın bulaşık olduğu arazilerden toplanan böceklerle hastalığı taşıma amacıyla Cicadellidae olduğu düşünülen türlerin canlı olarak alınması 18
Şekil 3.7. D-VAC ile toplanan böceklerin dondurulduktan sonra ön sınıflandırılması 19
Şekil 3.8. Biber üretim alanlarında fitoplazmaların doğal taşınmasını araştırmak amacıyla biber tarlasına yerleştirilen susam ve Cezayir menekşesi bitkileri 20
Şekil 3.9. Kontrollü koşullarda ve arazi çalışmalarında fitoplazma taşıma denemelerinde kullanılan farklı bitki türleri: A) Biber (*Capsicum annuum*), B) Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) ve C-D) Tütün (*Nicotiana glutinosa, N. tabacum*) bitkileri 21
Şekil 3.10. Biber alanlarında fitoplazma belirtisi gösteren, tarladan sökülerek saksılara dikilen ve kontrollü iklim odalarında gözlenen biber bitkileri 22
Şekil 4.1. Cicadellidae, Aphididae ve Aleyrodidae gibi familyalara ait böcek türlerini yakalamak amacıyla sarı yapışkan (A) ve Domates güvesi (*Tuta absoluta*) gibi zararlıları yakalamak amacıyla feromon (B) tuzaklar kullanılanılarak seralarda Samandağ biberi yetiştiriciliği 31
Şekil 4.2. Biber bitkilerinde fitoplazma enfeksiyonu ile ilişkili yaprakların kaşık şeklini alması, yaprakların ve çiçeklerin yukarı yönelmesi, çiçek yapılarının dumura uğraması şeklindeki belirtiler 33
Şekil 4.3. Biber alanı içerisinde yetiştirilen diğer kültür bitkisi türlerinde görülen belirtiler. *Ca*. Phytoplasma tirfolii tesbit edilen fesleğen (A), susam (B) ve domates (C) bitkileri ile Ca. Phytoplasma solani tesbit edilen domates (D) bitkisindeki fillodi (phyllody) ve cadısüpürgesi (witch's broom) belirtileri 35
Şekil 4.4. Biber arazilerinde yoğun olarak bulunan ve teşhis edilebilen bazı türlerin dorsal ve ventral görüntüleri (1. *Balchutha hebe,* 2. *Empoasca* sp., 3. *Exitianus capicola,* 4. *Cicadulina bipunctata,* 5. *Euscelidius* sp., 6. *Anaceratagallia laevis,* 7.*Psammotettix* sp.) 38
Şekil 4.5. Enfekteli fesleğen bitkisinden Cezayir menekşesine sürgün aşılaması (A, F, G, H); enfekteli susamdan Cezayir menekşesine sürgün

aşılaması (D); enfekteli susamdan tütün (B) ve susamdan biber (C, E) bitkilerine sürgün aşılaması. Enfekteli biber bitkisine küsküt (*Cuscuta* sp.) tutundurma çalışması 41

Şekil 4.6. Enfekteli olduğu düşünülen (A,B,C) ve sağlıklı biber (*Capsicum annuum*) bitkilerinde (D), dikey (A, B) ve yatay (C,D) kesitlerle yapılan DAPI boyama görüntüleri 44

Şekil 4.7. P1/P7 primer çifti ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen pozitif bantlar (1-5 biber, 6-9domates, 10-14 susam, 15,16 fesleğen, 17-18 pozitif kontrol, W:su, M: marker, 100bp plus) 46

Şekil 4.8. Belirti gösteren biber örneklerinin P1/P7 primer çifti ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen pozitif bantlar (1-25 biber, 26 pozitif kontrol, 27: su, M: marker, 100bp plus). 46

Şekil 4.9. PCR çalışmalarında P1/P7 üzerinden fU5/rU3 ile Nested PCR sonucu (A), P1/P7 üzerinden F2n/R2 primer çiftleriyle yapılan Nested PCR sonucu (B), 1-4 biber, 5-7 domates, 8-11 susam, 12-14 fesleğen, 15-16 pozitif kontrol, 17 su, 18 buffer (alttaki örnekler aynı sıra ile F2n/R2 primerleri ile Nested PCR yapılmıştır) 47

Şekil 4.10. Tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) örnekleri (1-7), fener otu (*Physalis angulata*) örneği (8), *Empoasca* sp türleri (9-16), Delphacideae türleri (17-19), *Exitianus capicola* (20), *Euscelidius* sp. örnekleri (21-22, 24-26), biber (*Capsicum annuum*) örnekleri (27-34), susam (*Sesamum indicum*) örnekleri (35-37), fesleğen (*Ocimum basilicum*) örnekleri (38-40) pozitif kontrol (41-43), su kontrol (23,44). Marker (M), Hibrigen 100 bp plus 48

Şekil 4.11. F1/R0 primerleri ile Direct PCR aşamasından sonra F2n/R2 primerleri ile Nested PCR aşaması sonuçları. (1-2 biber, 3-4 domates, 5-6 susam, 7-8 fesleğen, 9-10 tarla sarmaşığı, 11-15 Empoasca sp., 16 su) (Marker (M): Hibrigen 100 bp plus) 48

Şekil 4.12. RsaI enzimi ile biber (1), domates (2), fesleğen (3), susam (4), Empoasca sp. (5), Exitianus capicola (6), Euscelidius sp. (7), Delphacide (tanımlananmış tür-8) ve negatif kontrol (9) örnekleri ile RFLP çalışması (A); RsaI, AluI ve MseI enzimleri ile biber örneklerinde (1,2,3,4) RFLP çalışması (B). M: Marker: Hibrigen, 100 bp plus 50

Şekil 4.13. Genbankasına yüklenen *Ca*. Phytoplasma trifolii (16SrVI) olarak tesbit edilen örneklerin iPhyClassifier programında endonükleaz enzimleriyle kesimleri 51

Şekil 4.14. Genbankasına yüklenen *Ca*. Phytoplasma solani (16SrXII) olarak tesbit edilen örneklerin iPhyClassifier programında endonükleaz enzimleriyle kesimleri 52

Şekil 4.15. ChromasPro 2.1.8 programında forward ve reverse okumalarının görüntüsü 53

Şekil 4.16. Seçili bitki ve böcek örneklerinden elde edilen fitoplazma hastalıkları ile referans örneklerin MEGA-X programında elde edilen filogenetik ağacı. MK209688 (Yılmaz ve ark., 2019); EU573925 (Raj ve ark., 2009); MG732925 (Usta ve ark.,2018); MK942732 (Moonjuntha ve

ark., 2019); JN833711 (Martini ve ark., 2012); MN047263 (Jakovljević ve ark., 2019); KF614623 (Adamovic ve ark., 2013); JN561702 (Bobev ve ark., 2013); FJ226570 (Volokhov, 2008) 54
Şekil 4.17. Seçili bitki ve böcek örneklerinden elde edilen ve Genbank kodları alınan örneklerle referans örneklerinin MEGA-X programında oluşturulmuş filogenetik ağacı. 55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Akdeniz Bölgesi 2019 yılı biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı iller ve üretim miktarları 2
Çizelge 3.1. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR girdileri 27
Çizelge 3.2. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR döngüleri 27
Çizelge 3.3. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan pirimer çiftleri 28
Çizelge 4.1. Biber alanlarında diğer bitki türlerinde belirlenen fitoplazmalar 36
Çizelge 4.2. Doku aşılaması yoluyla *Ca*. Pytoplasma trifolii fitoplazmasının bulaşma oranları 42
Çizelge 4.3. Potansiyel vektör böcek türlerinde belirlenen fitoplazmalar 49
Çizelge 4.4. *Ca*. Pytoplasma trifolii taşıdığı bildirilen vektör böcek türleri 50
Çizelge 4.5. Fitoplazma tespit edilen ve Genbank'a yüklenen türler ve Genbank kodları 56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

^{o}C	: Derece Celsius
da	: Dekar (1000 m^2)
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molarite
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nanometre
pMol	: Pikomol
V	: Hacim
W	: Ağırlık

KISALTMALAR

BCTV	: *Beet curly top virüs*
CMV	: *Cucumber mosaic virus*
CTAP	: Cetyltrimethylammonium bromide
DAPI	: Diamidino-2-phenylindole
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA	: Deoksiribonükleik asit
IRPCM	: The International Organization for Mycoplasmology
MLOs	: Mikoplazma benzeri organizmalar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PLRV	: *Potato leaf-roll virus*
PVX	: *Potato virus* X
PVY	: *Potato virus* Y
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit

TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*

TSWV : *Tomato spotted wilt virus*

ToChLPV : *Tomato chino la paz virus*

YY : Yüzyıl

1. GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.), patlıcangiller (Solanaceae) familyasına ait, anavatanı Güney ve Orta Amerika olan açık alan ve örtüaltı bitkisidir. Biberin günümüzden 9000 yıl önce Amerika kıtasında besin olarak kullanıldığı ve 6000 yıl kadar öncesinden beri de yetiştiriciliği yapıldığı bilinmektedir (Perry ve ark., 2007). Biberin Amerika'nın 1492 yılında keşfinden sonra dünyaya yayıldığının tarihi belgelerde gösterildiği, ticari olarak üretiminin ise 1600'lü yıllardan itibaren yapıldığı bildirilmiştir (DeWitt ve Gerlach, 1990). Ülkemize ise 16. YY'de Osmanlı İmparatorluğu döneminde Avrupa ile yapılan ticaret sebebiyle İstanbul'dan girdiği düşünülmektedir.

Yemek kültürümüzde önemli bir yere sahip olan biber, taze olarak veya kurutularak, turşusu kurularak, sos, salça, meze, toz biber ve pul biber olarak tüketilen bir gıda ürünü olup ilaç ve baharat yapımında da geniş bir kullanıma sahiptir. Dünyada yaklaşık 2 milyon ha alanda 36 milyon ton taze biber, 1 milyon 856 bin ha alanda 4.625.833 ton kuru biber üretilmekte olup Çin yaklaşık 18 milyon ton toplam üretimle ilk sıradadır. Çin'i 3,3 milyon ton üretimle Meksika takip ederken ülkemiz 2,5 milyon ton üretimle 3. sırada yer almaktadır (Anonimous, 2017).

Capsicum cinsi içerisinde 30'a yakın biber türü bulunmaktadır. Dünyada tarımı yapılan 5 tür (*Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., ve *C. pubescens* Ruiz & Pav.) bulunmaktadır (Bosland 1994). Ülkemizde ise biber üretiminin neredeyse tamamı *C. annuum* türüne ait olup (Eken ve Mavi, 2016), çarliston, dolmalık, kapya, salçalık, sivri ve süs biberi üretimi yapılmaktadır. Ülkemizde biber üretiminde Antalya yaklaşık 500 bin ton üretimle 1. sırada iken, Hatay 60 bin ton üretimle 12. sıradadır (Anonim, 2020).

Kendine özgü iklim ve toprak özelliklerine sahip olan Hatay, farklı ürün desenine sahip olup gerek birinci ürün gerekse turfanda üretime olanak sağlamaktadır. Hatay'ın toplam yüz ölçümü 540.300 hektar olup bu alanların %51'ini tarım arazileri oluşturmaktadır ve bu tarım alanlarının da 206.553 hektarı (%75) ekonomik olarak sulanabilir tarım arazisidir. Hatay'da neredeyse yılın dört mevsiminde üretim yapmak mümkündür. Hatay tarım arazilerinin yaklaşık %10'unda sebzecilik yapılmaktadır. Hatay'da 4.071 hektar alanda yaklaşık 62 bin ton salçalık, kapya, dolmalık ve sivri

biber üretimi yapılmaktadır. Hatay'da biber üretiminde en büyük pay 21 bin dekarlık alanda 44 bin ton üretimle salçalık biber üretiminde olup salçalık biberi 14 bin ton üretimle sivri biber takip etmektedir (Anonim, 2020). İnsan beslenmesinde önemi oldukça fazla olan biberin, ülkemizde ve ilimizde önemli düzeyde üretimi yapıldığı görülmektedir. Ancak birim alandan elde edilen üretim miktarına bakıldığında Hatay'ın birim alandan daha az verim elde ettiği görülmektedir. Hatay ilinde, Adana ilinden daha fazla alanda üretim yapmasına rağmen Adana, toplam biber üretimi bakımından Hatay'ın üretim miktarının 2 katı üretime sahiptir (Çizelge 1.1). Bu da Hatay'daki biber üretimini olumsuz yönde etkileyen birçok unsurun (hastalık, zararlı, yetiştirme koşulları, teknik bilgi yetersizliği vd.) varlığına işaret etmektedir.

Çizelge 1.1. Akdeniz Bölgesi 2019 yılı biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı iller ve üretim miktarları

İller	**Üretim alanı (Dekar)**			**Üretim miktarı (ton)**		
	Salçalık	**Dolmalık**	**Sivri**	**Salçalık**	**Dolmalık**	**Sivri**
Adana	19.180	50	4.289	105.668	75	14.980
Antalya	15587	13597	26142	131920	104730	177479
Hatay	21001	779	7645	44054	1834	14384
Mersin	700	5574	44529	4725	26154	281155
Kilis	26035	-	-	64578	-	-
Türkiye	372775	122952	277642	1234423	371918	902203

Biber, gerek açık alan gerekse örtüaltı yetiştiriciliği yapılan bir bitkidir. Örtüaltı yetiştiricilik, açık alana göre daha iyi kontrol edilebilir olduğundan sebzelerde hastalık ve zararlıların bulaşmasını nispeten azaltırken açık alan yetiştiriciliği pek çok hastalık ve zararlının hedefi halindedir.

Biberi hastalandıran pek çok virüs ve fitoplazma hastalığı bilinmektedir. Hatay ilinde biberde hastalık meydana getiren virüsler ile ilgili çalışmalar yapılmış (Sertkaya ve ark., 2003; Sertkaya, 2008; Sertkaya, 2012; Özdağ ve Sertkaya 2017; Sertkaya ve Çarpar, 2017) olsa da biberde sorun olan fitoplazma hastalıkları yeterince bilinmemektedir. Bununla birlikte fitoplazma hastalıklarının bazı belirtileri virüslerle karıştırılabilmektedir. Önceleri virüs olarak bilinen birçok hastalığın fitoplazma kaynaklı olduğu artık bilinebilmektedir. Örnek olarak sarılık, cadısüpürgesi (witches' broom), cüceleşme ve yaprak şekil bozuklukları bitkilerde hem fitoplazma hem de virüsün varlığına işaret etmektedir. Sebzelerde virüs ve fitoplazmaların bitkiyi birlikte

enfekte ettiğine dair de birçok rapor bulunmaktadır. Meksika'da biber bitkilerinde 16SrIII gruba ait fitoplazmalar ile begomovirüslere ait iki adet tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) ve tomato chino la paz virus (ToChLPV)'un aynı bitkide varlığı bildirilmiştir. Hastalıklı bitkiler, yaprak sararması, nekrotik lezyonlar, boğum aralarının kısalması, renk bozuklukları, yaprakların kalınlaşması ve şekil bozukluğu gibi tipik belirtiler sergilemiştir (Lebsky ve ark., 2011).

Fitoplazmalar, bakterilerin Mollicute sınıfına giren hastalık etmenleridir. Dünya geneline yayılmış olan etmen, bitkilerde sarılık, bodurluk ve cadısüpürgesi (Witches' broom), phyllody, virescence (çiçek yeşillenmesi) belirtilerine neden olur. Hastalık dünyada ilk kez 1603 yılında Japonya'da dut cücelik hastalığı olarak bildirilmiştir (Okuda, 1972). Pavlonya cadısüpürgesi hastalığı, pirinç sarı cücelik hastalığı ve sarılık hastalıkları 1900'lerin başında rapor edilmiştir (Kunkel, 1926; Okuda, 1972; Lee ve ark., 2000). Hastalık kültüre alınamadığı, vektörlerle taşındığı ve belirtileri virüs belirtilerine benzediği için 1967 yılına kadar hastalığa neden olan etmenin virüs olduğu düşünülmüştür (Doi ve ark., 1967; Lee ve ark., 2000). Doi ve arkadaşları 1967 yılında, dut cücelik, pavlonya cadısüpürgesi ve aster sarılığı gibi hastalıklarla bulaşık bitkilerin floeminin çok ince bölümlerinde insan ve hayvan mikoplazmalarına benzeyen yapıları keşfetmişlerdir. Hücre duvarı olmayan bu etmenin tek bir membran ile çevrili ve mikoplazmalara benzeyen büyüklükte (80-800 nm) pleimorfik yapıda olduğunu bildirmişlerdir. Bundan dolayı 1967 yılına kadar hastalığa sebep olan etmen, mikoplazma benzeri organizmalar (MLOs=mycoplasma-like organisms) olarak adlandırılmış ancak o tarihten beri bu tür hastalıklara neden olan etmenin fitoplazma ya da spiroplazma olarak isimleri değiştirilmiştir (McCoy ve ark., 1989; Lee ve Davis, 1992). Uluslararası Mikoplazmoloji Organizasyonu (The International Organization for Mycoplasmology=IRPCM)'nun 1994 yılında 10. kongresinde Fitoplazma Çalışma Takımı "Fitoplazma" ismini kabul etmiştir. IRPCM (The International Organization for Mycoplasmology) tarafından 2004 yılında ise '*Candidatus* (*Ca*.) Phytoplasma' olarak yeni cins içerisinde yer alması önerilmiştir (IRPCM, 2004). Fitoplazmalar, 2018 yılına gelindiğinde, her biri bir dizi alt grup içeren 33 ribozomal grupta kategorize edilmiştir (Bertaccini ve Lee, 2018). Dünya genelinde sebzeleri etkileyen 16 farklı ribosomal gruba ait fitoplazma bildirilmiştir. Sebzelerde en fazla hastalık oluşturan aster yellows fitoplazma grubu (16SrI), peanut witches' broom (16SrII) grubu takip etmektedir.

Fitoplazmalar dünya genelinde kültür bitkilerinde ve doğal ekosistemde yıkıcı kayıplara sebep olmaktadır. Etmen, orman ağaçlarında, bağlarda, meyve bahçelerinde, süs bitkilerinde, yabancı otlarda ve patates, domates, biber, patlıcan gibi sebzeler dahil çok sayıda bitkide hastalık oluşturmakta, yaprak pireleri, bitki pireleri ve pysillid gibi vektör böceklerle, aşı ile, doğal kök kaynaşması yolu ile ve de küsküt (*Cuscuta* sp.) gibi parazit bitkilerle taşınabilmektedir (Çıtır, 1985, McCoy ve ark.,1989; Şaş-Sertkaya, 1999; Lee ve ark., 2000; Singh ve Singh 2000; Seemüller ve ark.,2002; Pracros ve ark., 2006; Weintraub ve Beanland, 2006; Bertaccini, 2007; Hogenhout and Music, 2010). Fitoplazma hastalıklarının dünyanın farklı bölgelerinde patlıcanda %40, domateste %60, patateste %30-80 ve hıyarda %80 oranında önemli derecede ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Bogoutdinov ve ark., 2008; Navratil ve ark., 2009; Rao ve Kumar, 2017).

Fitoplazmaların bitki üretim materyalleri, tohumla ve vektör böceklerle taşındığı bilinse de doğada yayılmasında en büyük rol vektör böceklerdedir. Bilinen böcek vektörleri, Cicadellidae, Fulgoromorpha ve Psyllidae grubu içerisindeki yaprak pireleri, bitki pireleri ve psyllidlerdir. Ancak hastalığın taşınmasında sorumlu en geniş grup Cicadellidae familyasına aittir. Cucurbitacea (hıyar, kabak), Solanaceae (biber) ve Cruciferae (turp) familyasını enfekte eden peanut witches' broom fitoplazması, *Orosius albicinctus*, *Macrosteles laevis* ve *Orosius argentatus* ile taşınırken (Tran-Nguyen ve ark., 2003; Salehi ve ark., 2015), aster yellows fitoplazması *Macrosteles quadrilineatus* ile taşınmaktadır (Zheng-Nan ve ark., 2013). *Empoasca devastans*, *Hishimonus phycitis* ve *Circulifer haematoceps*, patlıcan ve lahanada şiddetli ürün kayıplarına neden olan, clover proliferation (16SrVI) fitoplazmasını (Thomas ve Krishnaswami, 1939; Salehi ve ark., 2007) taşırken, *Macrosteles laevis*, *Hyalesthes obsoletus* ve *Circulifer tenellus* sebzelerde stolbur fitoplazmasının (16SrXII-A) vektörleri olarak bildirilmiştir. Özellikle *C. tenellus* potato purple top hastalığının potansiyel vektörü olarak tanımlanmıştır. Bir tek böcek türü bir veya daha fazla fitoplazma hastalığını taşıyabileceği gibi bir fitoplazma farklı böcek türleriyle de taşınabilmektedir (Lee ve ark., 1998). Hatay ilinde yetiştiriciliği yapılan Solanaceae familyasına ait kültür bitkilerinde sorun olan ve fitoplama hastalıklarını taşıdığı bilinen bu vektör böceklerin varlığı bildirilmiştir (Kılıç ve Sertkaya, 2019).

Birçok yabancı ot türlerinin fitoplazmalara alternatif konukçu olabileceği

bilinmektedir. Asya ve Avrupa kıtalarında, tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*), köy göçüren (*Cirsium arvense*), küsküt (*Cuscuta* sp.), ısırgan (*Urtica dioica*) ve sütleğen (*Euphorbia falcata*) stolbur fitoplazması (16SrXII-A); şeytan elması (*Datura stramonium*), Hint keneviri (*Cannabis sativa*), semiz otu (*Portulaca oleracea* ve *P. grandiflora*) brinjal little leaf fitoplazması (16SrVI), *Suaeda aegyptiaca* (Amaranthaceae), sarı papatya (*Cota tinctoria*), beyaz söğüt (*Salix alba*), salkım söğüt (*Salix babylonica*) horoz ibiği (*Amaranthus retroflexus*) *Candidatus* Phytoplasma trifolii' için potansiyel konukçulardır (Navratil ve ark., 2009; Ember ve ark., 2011; Sertkaya et al., 2013; Rao ve Kumar, 2017; Askari Seyahooei ve ark., 2017; Hemmati ve ark., 2018; Zamharir, 2018; Shahryari ve Allahverdipour, 2018; Oksal, 2020). Kolza, domates ve kanola gibi bazı bitkilerde fitoplazmaların tohumla da taşınabildiği bildirilmiştir (Calari ve ark., 2011; Satta ve ark., 2019). Erken dönem bulaşmalarda çiçek ve meyve oluşumu mümkün olmadığından bu sadece bitkilere geç bulaşmalarda (bitki belirli miktarda meyve/tohum oluşturduktan sonra) mümkündür. Ayrıca bulaşık bitkilerden elde edilen fidelerde dördüncü yapraktan sonra bitkide fitoplazma varlığının azaldığı bildirilmiştir (Olivier ve ark., 2010; Satta ve ark., 2019).

Bu çalışma ile;

-biberde enfeksiyon oluşturabilen fitoplazma hastalıkları ve yaygınlığı araştırılmış,

-fitoplazma hastalıklarını taşıdığı bilinen ve/veya potansiyel vektör böcek türlerinde fitoplazmanın varlığı tespit edilmiş,

-biber bitkilerinin üretim alanlarında fitoplazmaların doğal konukçusu olan yabancı ot ve diğer kültür bitki türlerinde fitoplazma türleri belirlenmiş,

-karışık enfeksiyon oluşumları (Fitoplazma+fitoplazma ve/veya fitoplazma+virüs gibi) araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Korachevskiy ve Semenkova (1938), Solanacea familyasına ait patates bitkilerinde "stolbur" hastalığını ilk kez Rusya'da gözlemlemişlerdir.

Thomas ve Krishnaswami (1939), Madras eyaletinin birçok yerinde mahsulde önemli kayıplara neden olan, patlıcanın bulaşıcı bir hastalığını tespit etmişlerdir. Görüntü itibari ile bitkilerde farklı organizmaların olmaması (fungus püstülü vb.) hastalığın virüs kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Bulaşık bitkilerde generatif yapının tamamen bozulduğu ve ürün kayıplarının çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Hastalığın *Datura fastuosa*, domates, tütün ve yabani patlıcan, *S. xanthocarpum* ve *S. trilobatum*'a da bulaştığı bildirilmiştir.

Chiykowski (1965), Kanada'da 1960'lı yılların başında, '*Ca.* Phytoplasma trifolii'nin ilk kez, melez üçgül (*Trifolium hybridum*) bitkilerinin çiçeklerinde çoklu sürgün oluşumuna neden olan organizma olduğunu bildirmiştir.

Doi ve arkadaşları (1967), fitoplazmaları elektron mikroskobunda ilk kez görüntüleyip, önceleri virüs olarak bilinen etmenin mikoplazma benzeri organizma olduğunu bildirmişlerdir (mycoplasma-like organism=MLO).

Harrison ve Roberts (1969), Scottish witches' broom disease tarafından hastalandırılan patates bitkilerinin köklerinde ve sürgünlerin floem demetlerinde, ayrıca aşı yoluyla bulaştırılan domates sürgünlerinde, mikoplazma benzeri yapıları (MLO) elektron mikroskobu ile görüntülemişlerdir.

Çalı ve arkadaşları (1989) tarafından Ankara'nın Ayaş ilçesinde 1987 ve 1988 tarihlerinde domates bitkilerinde stolbur belirtilerine rastlanmış ve İtalya Bari Üniversitesi'ne gönderilen örneklerin stolbur olduğu teşhis edilmiştir. Ayrıca domates tarlalarında atrapla böcek toplanmış ve stolbur hastalığının bilinen vektörlerinden *Hyalesthes obsoletus* Sign. ve *Euscelis plebejus* (Fail.) türlerine rastlanmıştır.

Wu ve arkadaşları (1994), biber bitkilerinde cadısüpürgesi, küçük yapraklılık, yaprak sapları uzun ve ince, yeşillenmiş çiçekler ve phyllody belirtilerini gözlemlemişlerdir. Bu hastalığa neden olan etmenin MLO olduğunu bildirmişlerdir.

Singh ve Singh (2000), Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada biberde küçük yapraklılık, şekil bozuklukları, koltuklarda aşırı sürgün oluşumu belirtilerini gözlemlemişlerdir. Ayrıca aşağı yönde olması gereken biber tomurcuklarının yukarı

yönde olduğunu da fark etmişlerdir. Çiçeklerin meyve oluşturmadığını hatta erken enfekteli bitkilerde verim kaybının %100 olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmaları sonucunda bu belirtilerin fitoplazma kaynaklı olduğunu ve hastalığın aşı ile taşındığını bildirmişlerdir.

Gatineau ve arkadaşları (2001), Fransa'da şeker pancarı arazisinde *Pentastiridius beieri* (Cixiidae) vektör böceklerinin stolbur hastalığını taşıdığını, toplanan böceklerle yapılan taşıma denemelerinde hastalığın Cezayir menekşesi ve şeker pancarına taşındığını, bu böcek türünün taşıma denemelerinde kullanılabilceğini rapor etmişlerdir.

Castro ve Romero (2002), İspanya'da biberlerde stolbur hastalığını bildirmişlerdir. Hastalığın bitkide kısa yan dallar oluşturduğunu ve yeşil çiçek tomurcukları meydana getirdiğini söylemişlerdir. Yapılan PCR, sekanslama ve filogenetik analiz çalışmalarının sonucuna göre bulunan fitoplazmanın, 16SrXII stolbur grubundan tamamen farklı, 16SrVI clover proliferation grubunda sınıflandırılmasını tavsiye etmişlerdir.

Khan ve Raj (2006) tarafından Küba'da yapılan bir çalışmada chilli biberlerinin yapraklarında küçülme ve bitkinin genelinde cüceleşme belirtisi gözlemlemişlerdir. Moleküler çalışmalarda direct PCR için P1/P6, nested PCR için ise R16F2n/R16R2 evrensel primer çiftlerini kullanmışlardır. Çalışmalar sonucunda biber bitkilerinde 16SrI Aster yellows grubuna ait *Ca.* Phytoplasma asteris bildirilmiştir.

Choueiri ve arkadaşları (2007), Lübnan'da 2003-2004 yıllarında domates ve biber alanlarında fitoplazma belirtilerine rastlamışlardır. PTL olarak isimlendirdikleri etmenin "*Candidatus* Phytoplasma trifolii"nin bir ırkı olduğunu bildirmişlerdir.

Sertkaya ve arkadaşları (2007) tarafından 2002-2004 yılları arasında phyllody belirtili susam ve cezayir menekşesinde, stolbur belirtili biberde, sarı küçük yapraklı patlıcanda ve iri tomurcuk belirtili domateste, ayrıca *Orosius orientalis* vektör böceklerinde fitoplazma belirlenmiş, domates iri tomurcukla ilişkili belirtilerin stolbur fitoplazma grubu (16SrXII-A)'na ait olduğu bildirilmiştir.

Santos-Cervantes ve arkadaşları (2008), Meksika'da yaptıkları bir çalışmada biberde ve domateste hastalık oluşturan, bitkilerde cadısüpürgesi ve küçük yapraklılık belirtilerine neden olan '*Ca.* Phytoplasma asteris' ile ilişkili, biber küçük yapraklılık (PeLL), domates küçük yapraklılık (ToLL) fitoplazmalarını belirlemişlerdir.

Randall ve arkadaşları (2009), New Mexico ve Arizona'da chili biberlerde

çalılaşma ve normal çiçek yerine geniş yeşil taç yaprak oluşumlarını gözlemişler ve meyve oluşmadığını fark etmişlerdir. Bu belirtilerin domates iri tomurcuk fitoplazmasına benzemesinden dolayı bu belirtiye çiftçiler İspanyolca'da iri tomurcuk anlamına gelen "brote grande" adını vermişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda brote grande fitoplazma hastalığının 16Sr VI grubuna ait bir fitoplazma olduğu bildirilmiştir.

Arocha ve arkadaşları (2009), Bolivya'da biber, çilek, yalancı karabiber (*Schinus molle*) ve kereviz patatesi ya da beyaz havuç (*Arracacia xanthorrhiza*) olarak bilinen bitkilerinin yapraklarında küçülme ve sararma, çoklu sürgün, yan dalların kısalması, rozetleşme ve küçük meyve oluşumları gibi belirtiler gözlemlemişlerdir. Evrensel primer çiftleri, R16mF2/R1 ve fU5/rU3, ile yapılan direct ve nested PCR sonuçlarına göre 4 bitki türünde de 16SrIII (X-disease) grubuna ait fitoplazma belirlemişlerdir.

Raj ve arkadaşları (2009), Hindistan'da Solanaceae familyasına ait patlıcan tarlasının yakınlarında, yine aynı familyadan yaygın bir yabancı ot ve aynı zamanda tıbbi ilaç bitkisi olan *Datura inoxia* bitkilerinde küçük yapraklılık belirtilerini gözlemlemişlerdir. Hastalıklı bitkiler aynı zamanda çoklu sürgün ve kısa yan dal oluşumlarını da göstermiştir. Evrensel P1/P6 primerleri direct PCR için kullanılmış ve PCR ürünleri 1/10 oranında sulandırılarak evrensel R16F2n/R16R2 primerleri ile de nested PCR yapmışlardır. Yapılan analizler sonucunda, enfekteli bitkilerde, 16SrVI, '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' grubuna ait bir ırk little leaf fitoplazmasını belirlemişlerdir.

Harling ve arkadaşları (2009), Chili biberi ve ağaç domatesi (*Solanum* [*Cyphomandra*] *betaceum*) bitkilerinde cüceleşme, şiddetli yaprak beneklenmesi ve küçük benekli yaprakların demetleşmesi belirtilerini gözlemişlerdir. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri elekron mikroskopu ve pepper mild mottle virus, tobacco mosaic virüs, tomato mosaic virus, cucumber mosaic virus, impatiens necrotic spot virus, tomato spotted wilt virus, alfalfa mosaic virus ve genel potyviruses ve begomovirus üyelerini testleyen antiserumlar kullanılarak ELISA ile araştırılmıştır. Sonuçlar negatif bulunmuştur. Fitoplazmalar biberleri de etkileyen bir hastalık olduğu için örnekler moleküler olarak da incelenmiştir. Evrensel R16F2m/R1 ve fU5/rU3 primerleri ile yapılan çalışmalar sonucunda biber ve ağaç domatesi bitkilerinde 16SrII, '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' grubu fitoplazma tespit edilmiştir.

Çağlar ve arkadaşları (2010), Kayseri ve Sivas illerinde patates bitkilerinde

kızarıklık, morarma ve yaprak kıvrılması; Kahramanmaraş ve Adana illerinde domates bitkilerinde ise çiçek anormallikleri, iri tomurcuk belirtileri gözlemlemişlerdir. Evrensel R16F1/R16R0 ve R16F2n/R16R2 primerlerini kullanarak yaptıkları PCR çalışmaları sonucunda belirti gösteren bitkilerde fitoplazma tespit etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda "*Candidatus* Phytoplasma solani" (16SrXII-A) domates ve patates bitkilerinde tanılanmıştır. Ayrıca domates alanlarından toplanan *Cicadula inornata* (Cicadellidae)'da aynı etmeni teşhis etmişlerdir. Nested PCR ürünlerinin, izolatlar arasındaki farklılığı kontrol etmek için, endonükleaz enzimleri (EcoRI TaqI, HhaI, AluI, MseI, RsaI HpaII) ile kesimi yapılmış, RFLP çalışma sonuçları örneklerin *Candidatus* Phytoplasma solani (16SrXII-A) olduğu teyit edilmiştir.

Sertkaya ve arkadaşları (2013), Amik Ovası'nda fitoplazma hastalığına özgü belirtilerin patateste ilk kez 2004 yılında gözlendiğini, belirtilerin yıllar içerisinde artması nedeni ile 2010 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Adana, Hatay ve Osmaniye illerinde şüpheli patates ve yabancı ot türleri (*Convolvulus arvensis*: Convolvulaceae ve *Solanum nigrum*: Solanaceae) ile potansiyel vektör *Hyalesthes obsoletus* örneklerinde PCR/RFLP yöntemi ile yaptıkları çalışmada patates (7/43) ve *C. arvensis* (3/6) bitkilerinde stolbur (16SrXII-A) belirlediklerini, stolbur ile enfekteli *C. arvensis* bitkilerinde sararma, bodurlaşma, boğum aralarında kısalma, çoklu sürgün oluşumu (proliferation) gözlendiği, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde patates ve *C. arvensis* bitkilerinde stolbur fitoplazmasının ilk kez belirlendiği bildirilmiştir.

Zheng-Nan ve arkadaşlarının (2013), Çin'de yaptıkları bir çalışmada, biberde cadısüpürgesi belirtilerine rastlamışlar ve hastalığı mekanik bulaştırmaya çalışmışlardır. Ancak hastalık mekanik olarak bulaşmayınca bitki dokularından alınan oldukça ince kesitlerde fitoplazma benzeri yapılara rastlamışlardır. Yapılan analizler sonucunda hastalık etmeninin bitkide ve de araziden toplanan *Cicadella viridis* vektör böceğinde 16SrI-B alt grubuna ait pepper witches'broom fitoplazması olduğu bildirilmiştir.

Faghihi ve arkadaşları (2016), İran'da tatlı biberlerde fitoplazmalara özgü sarılık, iri tomurcuk, küçük yapraklılık ve virescence (taç yapraklarının yeşillenmesi) belirtilerini gözlemiştir. Evrensel primer çifti (P1/P7) ile yapılan PCR ürününden sekanslama yaptıkları 2 örnekte 16SrII (peanut witches broom group) grubuna ait bell pepper big bud (BPBB), BPBB1 ve BPBB2 izolatlarını bildirmişlerdir.

Trkulja ve arkadaşları (2016), Sırbistan'da dereotunda (*Anethum graveolens* L.)

önceleri yapraklarda ve çiçeklerde kızarıklıklara neden olan hastalığın daha sonraları bitkide bodurlaşma ve çiçek oluşumunun engellenmesi şeklindeki belirtileri meydana getiren etmenin stolbur fitoplazması (*Ca.* Phytoplasma solani) olduğunu ve hastalığın tamamen ürün kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Oksal ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları bir çalışmada, Malatya'da biberlerde fitoplazmalara özgü sararma, çiçek kısırlığı, nekroz, bodurlaşma ve küçük yapraklılık belirtileri gösteren biber bitkileri toplanmıştır. Belirtileri gösteren biberlerin yakınındaki tek yıllık yaygın yabancı otlar ile yaprak pireleri de örneklenmiştir. PCR çalışmaları sonucu 3 biber bitkisinde yaklaşık 1.2 kb büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ancak yabancı ot ve yaprak pirelerinde pozitif bant elde edilememiştir. İki örnek yeni nesil sekanslama yöntemi ile incelenmiş, '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'nin varlığı 16S rDNA ve RFLP çalışmaları ile onaylanmıştır. TR1 ve TR2 olarak (Genbank numarası: KY321932 ve KY568694) kodlanan her iki izolat 'clover proliferation Phytoplasma group' (subgroup 16SrVI-A) üyesi olarak tanımlanmıştır. MseI enzimi ile yapılan kesimde her iki izolatın da dünyada daha önce ortaya konan referans '*Ca.* Phytoplasma trifolii' izolatları ile arasında fark bulunmuş, TR1 ve referans '*Ca.* Phytoplasma trifolii' (AY390261) ile karşılaştırıldığında TR2 izolatı 1 nokta mutasyonu göstermiş, bu çalışma ile '*Ca.* Phytoplasma trifolii' Türkiye'de ilk kez bildirilmiştir.

Usta ve arkadaşları (2017), Van'da hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkilerinde cüceleşme, cadısüpürgesi, rozetleşme ve küçük yapraklılık gibi fitoplazmalara özgü belirtiler gözlemişlerdir. Bitki örneklerinde, R16mF2/R16mR1 ve R16F2n/R16R2 primer çiftleri ile PCR çalışması yapılmıştır. Çalışma yapılan 8 örneğin 4'ünde 1.25 kb uzunluğunda DNA fragmentleri elde etmişler, pozitif bulunan örneklerden iki tanesini plasmid vektörde klonlamışlardır. Plazmid DNA'ları saflaştırılmış, çift yönlü olarak dizilenmiş; 16S rDNA dizisinin BLAST analizleri ve RFLP çalışmaları yapılmıştır. Örneğin birinde '*Candidatus* Phytoplasma solani' (KX977570), diğerinde ise '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' (KR080212) saptamışlardır. İzolatlarının ilkine 'Van-solani' ikincisine ise 'Van-trifolii' izolatı isimlerini vermişlerdir.

Swisher ve arkadaşları (2017), Meksika'da Chili biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) fitoplazmalara özgü küçük, klorotik, kıvrılmış yaprak oluşumu, bodurlaşma, iri tomurcuk belirtileri gözlemişlerdir. Toplanan 156 örnekten 104'ünde pozitif bant elde etmişlerdir. Tüm pozitif örnekler 16SrVI-A (clover proliferation group) grubuna ait beet

leafhopper transmitted virescence agent (BLTVA) fitoplazması olarak belirlenmiştir. Ayrıca vektör böcek *Circulifer tenellus* (Baker) örneklerinde 23/52 oranında BLTVA bulunmuştur.

Askari Seyahooei ve arkadaşları (2017), İran'da *Suaeda aegyptiaca* (Amaranthaceae) bitkilerinde cadısüpürgesi, sararma ve küçük yapraklılık belirtileri gözlemlemiş, analizler sonucunda bitkide ve *Neoaliturus pulcher* vektör böcekte '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' ırkı olan Suaeda aegyptiaca witches' broom (SaWT) fitoplazmasının varlığını bildirmişlerdir.

Hemmati ve arkadaşları (2018), İran'da sarı papatya bitkilerinin sürgünlerinde kıvrılma, bitkide bodurlaşma, cadısüpürgesi ve küçükyapraklılık belirtileri gözlemlemişlerdir. Yapılan filogenetik analizler sonucu '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' ırkı olan Cota tinctoria witches' broom (CtWB) fitoplazmasını tespit etmişlerdir. Ayrıca vektör olarak *Orosius albicinctus* yaprak piresinde de aynı etmen tanılanmıştır.

Zamharir (2018), İran'da çoklu sürgün belirtilerini sergileyen beyaz söğüt (*Salix alba*) ağaçlarında '*Ca.* Phytoplasma trifolii' (16SrVI) fitoplazmasını bildirmiştir.

Shahryari ve Allahverdipour (2018) İran'da salkım söğütlerde (*Salix babylonica*) cadısüpürgesi belirtilerine rastlamışlar, 16SrVI-A altgrubuna ait fitoplazma 'the Phytoplasma associated with willow proliferation' tanılamışlardır.

Venkataravanappa ve arkadaşları (2018), Hindistan'da Hint leylağı (*Azadirachta indica*) ağaçlarında cadısüpürgesi belirtisi gösteren bitkilerde 16Sr VI-D altgrubuna ait NeWB fitoplazmasını bildirmişlerdir.

Usta ve arkadaşlarının (2018) Van'da yürüttükleri bir çalışmada, domates bitkilerinde şiddetli meyve şekil bozuklukları, çiçek kısırlığı (erkekleşme), havai köklenmeler, morarmış yapraklar ve yaprak kıvrılmaları belirtileri gözlemlemişlerdir. Toplam 100 örnekten 11'inde pozitif bant elde etmişler ve PCR ürünlerini pGEM T-Easy vektöründe klonladıktan sonra yeni nesil sekanslama (NGS) yapmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda 2 farklı gruba ait 2 fitoplazma türüne rastlamışlardır. Bunlardan biri 16Sr VI-A grubundan "*Candidatus* Phytoplasma trifolii", diğeri ise 16Sr XII-A grubuna ait "*Candidatus* Phytoplasma solani"dir.

Kılıç ve Sertkaya (2019) tarafından yapılan bir çalışmada Hatay'da Solanecae familyasına (biber, domates, patates ve patlıcan) ait türlerin yetiştirildiği alanlarda Cicadellidae ve Cixiidae familyasına bağlı türlerin varlığı araştırılmış, araştırma

sonucunda Agalliinae altfamilyasından *Austroagallia sinuata, Anaceratagallia ribauti*; Deltocephalinae altfamilyasından *Circulifer haematoceps, Macrosteles quadripunctulatus, Balclutha hebe, Cicadulina bipunctella, Cicadulina* sp., *Euscelidius mundus, Exitianus capicola, Euscelis alsius* Ribaut, *Euscelis incisus, Neoaliturus fenestratus, Phlepsius* sp., *Platymetopius cruentatus, Psammotettix provincialis, Platymetopius rostratus*; Typhlocybinae altfamilyasından *Empoasca decipiens, Asymmetrasca decedens, Zygina karatasa* Dlabola, *Asymmetrasca* sp., *Empoasca* sp., *Eupteryx* sp., *Zyginidia sohrab* Zachvatkin, *Zyginidia* sp., *Zygina* sp., olmak üzere Cicadellidae familyasına ait toplamda 18 cins ve 18 türün varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada Cixiidae famiyasına ait *Hyalesthes obsoletus* türü tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada Hatay ili Solanecae familyasına ait bitkilerin yetiştirildiği alanlarda *Empoasca decipiens, Asymmetrasca decedens* ve *Psammotettix provincialis* türleri en yoğun türler olarak tespit edilmiştir.

Yılmaz ve arkadaşları (2019) tarafından Adana, Kahramanmaraş, Mersin ve Şanlıurfa illerinde yürütülen bir çalışmada biberde sorun olan fitoplazma hastalıkları araştırılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda Şanlıurfa izolatı %99 benzerlik ile '*Ca.* Phytoplasma trifolii' olarak belirlenmiş, Mersin izolatı ise %96 benzerlik ile '*Ca*. Phytoplasma asteris' (16SrI) olarak tespit edilmiştir.

Oksal (2020), Malatya'da fitoplazma belirtili domates ve yabancı ot örneklerinde yaptığı bir çalışmada dünyada ilk kez *A. retroflexus*'un *Ca.* Phytoplasma trifolii'nin konukçusu olduğunu rapor etmiştir.

Sakalieva (2020), Bulgaristan'da yürüttüğü bir çalışmada stolbur belirtisi gösteren domates ve biber örneklerinde RFLP yöntemi ile fitoplazma varlığını tespit etmiş ve RFLP profillerinin, doğal bitki konakçılarında stolbur alt grubundaki (16SrXII-A) fitoplazmaları ayırt etmede yararlı bulduğunu bildirmiştir.

Rihne ve arkadaşları (2020), zinnia (*Zinnia elegans*) bitkisinde yapraklarda kıvrılma, küçük yapraklılık, bodurlaşma ve cadısüpürgesi belirtilerini gözlemlemişlerdir. Yapılan analizler sonucunda bitkilerin '*Ca.* Phytoplasma asteris' (16SrI-B subgroup) fitoplazması ve aynı anda domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (TYLCV) ile de enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma, 2015-2020 yılları arasında, Hatay ili Antakya, Reyhanlı, Kırıkhan, Samandağ, Arsuz ve Altınözü ilçelerinde önemli biber üretim alanlarında (Şekil 3.1), Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü sera, iklim odası ve laboratuvarlarında yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Hatay ilinde yoğun olarak biber üretimi yapılan ilçeler.

Çalışma süresince hastalık belirtisi gösteren toplamda 450 adet biber (*Capsicum annuum*), 35 adet susam (*Sesamum indicum*), 5 adet domates (*Solanum lycopersicum*),

18 adet patlıcan (*Solanum melongea*), 7 adet fesleğen (*Ocimum basilicum*), 20 adet tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*), 3 adet köpek üzümü (*Solanum nigrum, S. luteum*), 3 adet horoz ibiği (*Amaranthus retroflexus*), 3 adet sütleğen (*Euphorbia falcata*) ve 3 adet fener otu (*Physalis angulata*) alınmıştır. Belirtilerin yoğun olarak gözlemlendiği üretim sezonu sonlarında böcekler D-VAC aleti ile toplanmıştır (Şekil 3.2). Toplanan böcekler, nem dengesi sağlamak amacıyla içerisinde peçete ya da kağıt havlu bulunan, polietilen torbalara aktarılarak laboratuvara getirilmiştir. Bu böceklerin bir kısmı hastalıklı bitki kaynağı oluşturmak amacıyla taşıma denemelerinde bir kısmı da dondurularak fitoplazma varlığı araştırılmak üzere PCR çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Arazilerde D-VAC aleti ile böcek toplama işlemi.

Hatay ilinde Reyhanlı, Altınözü, Arsuz, Kırıkhan, Hassa ve Kumlu ilçelerinde genellikle salçalık acı ve tatlı biber, süs biberi, dolmalık biber yetiştirilirken, Samandağ ve Antakya ilçelerinde Samandağ biberi ve süs biberi daha yoğun yetiştirilmektedir (Şekil 3.3). Arazi çalışmaları sırasında bu alanlarda biberlerde ve diğer konukçu bitkilerde fitoplazmalara özgü belirtiler incelenmiş, bu tür belirti sergileyen bitki materyalleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'ne ait laboratuvar ve

iklim odalarında biyolojik, mikroskobik ve moleküler yöntemlerle, virüs hastalıkları ile enfekteli olup olmadığını araştırmak için ise serolojik (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: DAS-ELISA) yöntemlerle araştırılmıştır.



Şekil 3.3. Hatay ili açık alan (A-F) ve örtüaltı (G-H) biber üretim alanlarından genel görünümler.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

3.2.1.1. Biber Bitkilerinde Belirtilerin Değerlendirmesi

Çalışma süresince biber üretimi yapılan alanlarda fitoplazmalara ait belirti sergileyen biber bitkilerinde arazi koşullarında belirtilerin değerlendirmesi yapılmıştır. Özellikle salçalık biberin yoğun olarak üretiminin yapıldığı Reyhanlı, Kumlu, Arsuz, Antakya ve Altınözü ilçeleri başta olmak üzere, Samandağ ve İskenderun ilçelerinde, biber bitkilerinde aşırı sürgün vermiş, bodurlaşmış, çiçek kısırlığı (erkekleşme) belirtili bitkiler ve domatesteki iri tomurcuk gibi çiçek deformasyonları ile yapraklarda kaşıklaşma belirtisi gösteren bitkiler gözlenmiş ve arazideki yoğunlukları dönemlerine göre kaydedilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Biber bitkilerinin yapraklarında kaşıklanma belirtisi (A), aşırı sürgün oluşumu ve bodurlaşma belirtisi (B,C) ve çiçeklerin yeşillenmesi ile iri tomurcuk oluşumu (D).

3.2.1.2. Fitoplazmalara Konukçu Olan Diğer Türlerin Belirlenmesi

Ülkemizde özellikle sebze tarımı yapan çiftçiler, yetiştirdiği ana ürün yanında tarla içerisinde ya da kenar sıralarda ihtiyaçları olan diğer sebzeleri de yetiştirmektedir. Biber arazilerinde yetiştiriciliği yapılan patlıcan, domates, susam gibi bitkilerde de fitoplazma hastalıkları araştırılmıştır. Ayrıca tıbbi ve aromatik bitki olan fesleğen (*Ocimum basilicum*) bitkisine de arazi içerisinde sıklıkla rastlanmıştır (Şekil 3.5). Arazilerde yabancı ot türleri içerisinde ise tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*), köpek üzümü (*Solanum nigrum*), fener otu (*Physalis angulata*), horoz ibiği (*Amaranthus retroflexus*), sütleğen (*Euphorbia falcata*) gibi türlerden de örneklemeler yapılmıştır.



Şekil 3.5. Biber arazilerinin içerisinde ya da kenar sıralarında yetiştirilen diğer türler: A) Patlıcan, B) Susam, süpürge otu, zeytin, C) Tütün, D) Kabak ve E) Fesleğen.

Yabancı ot bitki türleri Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ (HMKÜ) tarafından teşhis edilmiştir. Patlıcanlarda boş kavuz oluşumu, domateslerde iri tomurcuk, morarma ve çalılaşma belirtileri, susam ve fesleğende phyllody, çalılaşma, sararma, çoklu sürgün oluşumu, tarla sarmaşığında çoklu sürgün oluşumu, sararma, yapraklarda kaşıklaşma, fener otunda, köpek üzümünde morarma, horoz ibiğinde başaklarda çalılaşma, sütleğende morarma, bodurluk, küçük yapraklılık gibi belirtiler gösteren bitki örnekleri toplanmıştır.

3.2.1.3. Vektör Böceklerin Toplanmasına Yönelik Çalışmalar

Biber arazilerinden böcek toplama aleti (D-VAC), atrap ve emgi tüpleri ile toplanan böcekler, içerisine kodları yazılan ve nem dengesi sağlanması için kurutma kağıtları eklenen polietilen torbalara boşaltılmış ve içerisinde buz kalıpları bulunan arazi termosuna bırakılmıştır. Araziden toplanan bu böcekler laboratuvara getirilerek bir süre +4 °C'lik dolaplarda tutularak hareketleri yavaşladıktan sonra torba içerisinden emgi tüpü ile çekilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hastalığın bulaşık olduğu arazilerden toplanan böceklerle hastalığı taşıma amacıyla Cicadellidae olduğu düşünülen türlerin canlı olarak alınması.

Emgi tüpleri ile hangi tür olduğuna bakılmaksızın fitoplazma taşıyabilecek olası vektör türlerin bir kısmı çekilmiş ve bu böcekler hastalıklı bitki elde etmek amacıyla sağlıklı bitkilere aktarılmış ve fitoplazma taşıma denemeleri yapılmıştır. Kalan kısmı ise -20 °C'de dondurulmuştur. Daha sonra bu türlerden benzer olanlar petri kaplarına aktarılarak ön sınıflandırma yapılmıştır (Şekil 3.7).

Böcek örnekleri teşhise gönderilmek ve DNA izolasyonunda kullanılmak için binokülerde ayrılarak gruplandırılmıştır. Ayrılan böceklerin bir kısmı DNA izolasyonu için kullanılmış, bir kısmı da eğer yeterince toplanabilmiş ise, her türden en az 3 erkek birey olacak şekilde teşhis için içerisinde alkol bulunan ependorf tüp içinde muhafaza edilmiştir. Böcekler teşhise gönderilmeden önce kameralı mikroskopta üstten, alttan, genital bölgeden olmak üzere çeşitli açılardan fotoğraflanmış ve böcekler teşhise gönderilmiştir. Fotoğraflama işleminden sonra böcekler, mümkün olduğunca en az 3 adet erkek birey (bazı böcek türlerinden sadece 1 adet yakalanmıştır) olacak şekilde, içerisinde %70'lik alkol bulunan tüplere doldurulmuştur. Bu türler Prof. Dr. Hüseyin BAŞPINAR (Adnan Menderes Üniversitesi) tarafından teşhis edilmiştir Şekil 3.8).



Şekil 3.7. D-VAC ile toplanan böceklerin dondurulduktan sonra ön sınıflandırılması.

3.2.1.4. Fitoplazmaların Arazide Doğal Taşınmasına Yönelik Çalışmalar

Hastalığın doğal koşullarda test bitkilerine bulaştırılması amacıyla özellikle belirti gösteren bitkilerin etrafına ya da arazinin içerisine dağınık halde sağlıklı Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) gibi test bitkileri yerleştirilmiştir. Avsuyu, Bohşin, Hacıpaşa mahallelerinde belirlenen bazı biber arazilerine susam ve fesleğen tohumları ekilerek (Şekil 3.8) bu bitkiler de test bitkisi olarak değerlendirilmiş, doğal taşınmanın olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tohumlar arazi içerisinde belli bir sırada olmadan dağınık halde ekilerek hastalığın bulaşma ihtimalini artırmak amaçlanmıştır. Böylece biber alanlarında fitoplazmaların farklı türlere doğal taşınma durumu çalışılmıştır. En az

5-6 hafta arazi koşullarında doğal ortamda test bitkisi olarak kalan Cezayir menekşesi bitkileri arazide yapılan gözlemler dışında iklim odasına getirilerek belirti gözlemi, doku veya böcekle taşıma çalışmaları, moleküler analizler gibi diğer çalışmalarda da kullanılmıştır. Susam bitkileri ise sezon sonuna kadar arazide bırakılmış, bulaşma oranı takip edilmiş ve bulaşık bitkilerden de laboratuvar çalışmaları için örneklemeler yapılmıştır.



Şekil 3.8. Biber üretim alanlarında fitoplazmaların doğal taşınmasını araştırmak amacıyla biber tarlasına yerleştirilen susam ve Cezayir menekşesi bitkileri.

3.2.2. Kontrollü İklim Odası ve Sera Çalışmaları

3.2.2.1. Sağlıklı Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Kontrollü iklim odası koşullarında (24±2 °C, 16: 8 ışık: karanlık) sağlıklı biber

(*Capsicum annuum*), domates (*Solanum lycopersicum*), patlıcan (*Solanum melongena*), tütün (*Nicotiana tabacum, N. glutinosa*) tohumları ile Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) gibi süs bitkisi tohumları viyollere ekilmiştir. Sağlıklı olan fideler 2 L'lik saksılara torf ve perlit karışımına dikilmiştir (Şekil 3.9). Sağlıklı olarak yetiştirilen bu bitkiler, arazide belirti gösteren bitkilerden hastalığın bulaştırılması amacıyla aşılama ve taşıma denemelerinde, ayrıca Cezayir menekşesi bitkileri, hastalığın doğada taşınmasının araştırılması amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Kontrollü koşullarda ve arazi çalışmalarında fitoplazma taşıma denemelerinde kullanılan farklı bitki türleri: A) Biber (*Capsicum annuum*), B) Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*) ve C-D) Tütün (*Nicotiana glutinosa, N. tabacum*) bitkileri.

3.2.2.2. Şüpheli Bulunan Bitkilerin Kontrollü Koşullarda Kültüre Alınması

Arazide hastalık belirtisi gösteren biber, domates, patlıcan, fesleğen gibi türlere ait şüpheli bitkiler köklü olarak alınarak, kontrollü iklim odası ve/veya sera koşullarında saksılara dikilmiştir (Şekil 3.10). Bitkilerin çoğunun kontrollü koşullarda yaklaşık 6-8 hafta canlı kalması sağlanabilmiş ve diğer çalışmalarda (belirti gözlemi, doku, küsküt veya böcekle taşıma çalışmaları, moleküler analiz gibi) bitki kaynağı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.10. Biber alanlarında fitoplazma belirtisi gösteren, tarladan sökülerek saksılara dikilen ve kontrollü iklim odalarında gözlenen biber bitkileri.

3.2.2.3. Doku Aşılaması ile Fitoplazmaların Sağlıklı Bitkilere Taşınması Çalışmaları

Arazi koşullarında fitoplazma belirtisi gösteren biber, domates, patlıcan, fesleğen ve susam bitkilerinden alınan ve de sökülerek sera koşullarında canlı tutulmaya çalışılan bitkilerden aşılama için yetiştirilmiş sağlıklı test bitkilerine doku aşılaması yapılmıştır. Enfekteli bitkilerden sağlıklı test bitkilerine aşılamada göz aşıları (T ve yonga göz aşısı) ve kalem aşıları kullanılmış ve hastalığı taşıma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda aynı türlere (biberden bibere) ve de türler arasında (susamdan ve fesleğenden bibere ve Cezayir menekşesine) aşılamalar denenmiştir. Enfekteli bitkilerden bazıları seçilerek kodlanmış ve o bitkilerden doku parçaları alınıp tür içi ve türler arası olmak üzere test bitkilerinden en az 5'er bitkiye aşılamalar yapılmıştır. Çalışma süresince farklı türlerden toplam 105 adet bitkiye hastalıklı biti doku aşılaması yapılmıştır.

3.2.2.4. Tohumla Taşıma Çalışmaları

Fitoplazmalar erken enfeksiyonda çiçek oluşumunu ve meyve tutumunu engellemektedir ancak geç enfeksiyonlarda, hastalık bulaşmadan önce oluşmuş meyvelerin tohumlarına fitoplazmaların geçip geçmediği belirlenmeye çalışılmıştır. Şüpheli bitkilerden elde edilen tohumlar ekilmiş ancak ekilen tohumların tamamı çimlendirilememiştir. Çimlenen bitkicikler zayıf gelişme göstermiş ancak fitoplazma bu bitkilerde tespit edilememiştir.

3.2.3. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.3.1. DAPI ile DNA Boyama ve Floresan Mikroskopi Görüntülemesi

Fitoplazma ile enfekteli bitkilerde sararma, normal boyutundan daha küçük ve zayıf yaprak oluşumu, çalılaşma, çiçeklerin yeşillenmesi ve iri tomurcuk gibi belirtiler gözlenen bitki örneklerinde DNA boyama yöntemiyle fitoplazmaların varlığı araştırılmıştır. Elde edilen şüpheli bitki örneklerinde DNA boyama (DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole) sonrası floresan mikroskopi çalışmaları ile fitoplazmalara özgü yapılar belirlenmeye çalışılmıştır. Toplanan örneklerin DAPI boyaması Seemüller ve Kirkpatrick (1996)'e göre yapılmıştır. Bitki örneklerinin floem dokularını içeren sürgünlerden 2-3µm kalınlığında yatay ve dikey kesitler alınarak, 0.1M, pH:7 fosfat tapon çözeltisi içinde süspanse edilmiş %5' lik gluteraldehyde ile 2 saat süreyle fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra dokular 0.1M, pH:7 fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkanan dokular 0.1M pH:7 fosfat tampon çözeltisi içinde hazırlanmış 1µg/ml' lik DAPI (Sigma) solüsyonuna alınarak 20 dakika oda sıcaklığında DNA boyanması için bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler yine fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmış ve bir lam üzerine yerleştirilip üzeri lamelle kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DM 4000) "A" filtre ile 360nm dalga boyunda incelenmiştir. Negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerin yaprak damarları kullanılmıştır.

3.2.3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.2.1 Bitki ve Böcek Örneklerinde DNA İzolasyonu

Araziden toplanan örneklerden aşılama çalışmalarının yanı sıra yaprak orta damarları ve çiçek kısımları alınarak sıvı azotta ezildikten sonra bir miktarı daha sonraları tekrar kullanabilmek için steril ependorf tüplere doldurulup -80 °C'de saklanmıştır.Sıvı azotta ezilen 0,1 g'lık doku örneğinden toplam DNA elde etmek için Doyle ve Doyle (1990)'a göre (%2'lik CTAB metodu) DNA izolasyonu yapılmış, ayrıca Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti ile de bir grup testlenerek karşılaştırma yapılmıştır. CTAB metodu daha başarılı sonuç verdiği için diğer tüm çalışmalarda

CTAB metodu kullanılmıştır. Böcekten DNA izole edebilmek için ise %10'luk CTAB (Marzachi ve ark., 1998) yöntemi kullanılmış ancak herhangi bir sonuç alınamayınca MN (Macherey- Nagel) böcekten DNA izolasyon kiti ile kalan böceklerde DNA izole edilmiştir. Bitkiden nükleik asit izolasyonu için yaprak orta damarları ve çiçek yapıları ayrı ayrı alınıp sıvı azot yardımıyla ezilmiştir. Bitki örneklerinden izole edilen DNA'lar spektrofotometre (Thermo Sci. A.B.D) ile ölçülerek miktar ve kalite analizleri yapılmıştır ve PCR analizlerinde kullanılıncaya kadar -20 ºC' de saklanmıştır.

Doyle ve Doyle (1990) yöntemine göre DNA İzolasyonu

1. Bitkilerin yaprak orta damarları veya çiçek kısımlarından alınan 0.1 g bitki dokusu sıvı azot yardımıyla ezilmiştir.
2. Havanlar oda sıcaklığında örnek çözününceye kadar bekletilip üzerine 2 ml ‰2 CTAB solüsyonu eklenmiştir ve 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
3. Örnek 60°C'de 30 dk bekletildikten (örnekler her 10 dakikada hafifçe çalkalanmıştır) sonra 25°C'de 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Örneklerden 1 ml üst faz sıvısı yeni 2 ml'lik tüplere alınıp üzerine 1 ml chloroform isoamilalkol (24:1) eklenmiştir ve 25°C'de 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Örnek içerisinden 750 µl üst faz sıvısı yeni 2 ml'lik tüplere alınıp üzerine 750 µl chloroform isoamilalkol (24:1) eklenmiştir ve 25°C'de 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
6. Örnek içerisinden 500 µl üst faz sıvısı yeni 1.5 ml'lik tüplere alınıp üzerine 800 µl soğuk izopropanol eklenip -20°C'de 1,5-2 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 4°C'de 14000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
7. Örnekten izopropanol uzaklaştırılıp çökelti 2 kez ‰70'lik 1 ml soğuk ethanol ile yıkanmıştır ve 4°C'de 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek tüm etanol pipetle çekilmiştir.
8. Tüpler temiz bir peçete üzerinde alkol uzaklaşana kadar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra çökeltinin üzerine 80 µl TE buffer eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir.
9. DNA'lar PCR işleminde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti (DNeasy Plant Mini Kit) ile DNA İzolasyonu

1. Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0.1 gr alınıp 1.5 ml'lik tüplere

aktarılmıştır.

2. Tüplerin üzerine 400 µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A eklendikten sonra karıştırıcıda karıştırılmıştır ve 65°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında tüpler 10'ar dakika arayla 2 kez ters-düz edilmiştir.
3. İnkübasyondan sonra tüplerin üzerine 130 µl P3 buffer eklenip karıştırılmış ve buz üzerinde 5-10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Karışım mor renkli kolona pipetle aktarılmış ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Sıvı kısım çökelti hareket ettirilmeden yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1.5 hacim AW1 buffer eklenip pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.
6. Hazırlanmış olan beyaz renkli kolona 650 µl karışım aktarılmış ve 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip sıvı kısım atılmıştır. Bu adım arta kalan örnek karışımı ile tekrar edilmiştir.
7. Yıkama aşamasında beyaz renkli spin kolonu 2 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirilmiş ve üzerine 500 µl AW2 buffer eklenmiştir. Tüpler 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
8. Sıvı kısım atılmıştır, kolon üzerine tekrar 500 µl AW2 buffer eklenmiş ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
9. Daha sonra beyaz spin kolonu 1.5 ml'lik ependorf tüplerine transfer edilmiş ve üzerine 25 µl AE solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
10. Daha sonra bir önceki adım tekrar edilerek izolasyon sona erdirilmiştir.

MN (Macherey- Nagel) Kiti İle Böcekten DNA İzolasyonu

1. Türlerine ayrılarak saklanan böcek örnekleri kurutularak NucleoSpin Bead Tube'lere konulup 100 µl Elüsyon Buffer BE eklenmiştir.
2. Tüplere 40 µl Buffer MG ardından da 10 µl Liquid Proteinase K eklenerek türler kapatılmıştır.
3. Örnekler 10 dk vortekslenmiştir.
4. Örnekler 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
5. Tüplere 600 µl Buffer MG eklenerek tüpler 3 sn vortekslenmiştir. Ardından 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.

6. Üst fazdan 500-600 µl sıvıdan 2 ml'lik tüplere yerleştirilen NucleoSpin DNA insect column tüplerine konulmuş ve 30 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Alttaki 2 ml'lik toplama tüpü atılarak yerine yenisi konulmuştur.
8. İlk yıkama için 500 µl Buffer BW eklenerek 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak tüpler yeniden yerlerine konulmuş ve ikinci yıkama için 500 µl Buffer B5 eklenerek yine aynı değerde santrifüj edilmiştir.
9. Toplama tüpünde biriken sıvı yine boşaltılarak tüpler yine yerlerine konulmuştur.
10. Tüpler 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.
11. Filtreli Spin Column tüpleri 1.5'lik tüplere yerleştirilmiş, üzerlerine 100 µl Elution Buffer BE eklenmiştir.
12. Örnekler oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmişitir.
13. Üstte bulunan filtreli tüpler atılarak DNA'nın toplantığı tüplerin kapakları kapatılarak örnekler PCR çalışmaları için – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Böcekten DNA izolasyonu (Marzachi ve ark., 1998'den modifiye edilmiştir)

1. Böcekler 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisinde 60°C'de ısıtılan 500 µl%10'luk CTAB buffer (CTAB %2 w/v, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl, pH: 8.0) ile ezilmiştir (Buffer kullanılmadan önce çeker ocakta içerisine %0,2'lik mercaptoethanol ilave edilmiştir).
2. Eppendorf tüpler vortex edildikten sonra 60°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
3. Tüpler oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatant (üst sıvı faz) yeni tüpe alınmıştır.
5. Üzerine 1 hacim (500 µl) kloroform-isoamil alkol ilave edilerek 15-20 sn karıştırılmıştır.
6. Oda sıcaklığında 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
7. Sıvı kısım yeni tüpe alınmıştır ve üzerine isopropanol (1-1 oranda, 400µl-400µl) eklenerek hafifçe karıştırılmıştır.
8. 13000 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilmiştir.
9. İsopropanol uzaklaştırılıp pellet %70'lik 0.3 ml soğuk ethanol ile yıkanmıştır.
10. 13000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
11. Alkol uzaklaştırılmıştır ve pellet kurumaya bırakılmıştır.

12. Pellet 20-50 µl TE buffer ile sulandırılmıştır.

13. DNA örnekleri PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de bekletilmiştir.

3.2.3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

Bitki örneklerinden elde edilen DNA'lar 1/30 oranında sulandırılmıştır. Böcekten elde edilen DNA'lar ise sulandırma yapılmadan kullanılmıştır. PCR çalışmalarında kullanılan malzeme miktarları (master mix) Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) işlemi iki aşamada yapılmıştır. Bunlar Direk-PCR ve Nested-PCR'dir. Direct ve Nested PCR için Termal Cylcle döngüleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Direk-PCR'de 1.8 kbp ürün veren evrensel R16F1/R16R0 ve P1/P7 primer çiftleri, Nested-PCR için ise 1,250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 ve 880 bp büyüklüğünde ürün veren fU5/rU3 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Çalışma sırasında P1/P7 PCR ürünü kullanılarak F2n/R2 primer çiftleriyle yapılan Nested PCR çalışmaları sağlıklı sonuç elde edilemediğinden P1/P7 üzerinden fU5/rU3 kullanılmış, F1/R0 üzerinden F2n/R2 primerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR girdileri

PCR Girdileri (1 örnek)	**Direct-PCR**	**Nested-PCR**
Distile su	16,34 µl	16,34 µl
10X buffer	2,5 µl	2,5 µl
$MgCl_2$	2 µl	2 µl
dNTP	0,5µl	0,5 µl
P1	1 µl	1 µl
P2	1 µl	1 µl
Taq	0,16 µl	0,16 µl
Toplam	23.5 µl	23,5 µl
Genomik DNA	1,5 µl	1,5 µl

Çizelge 3.2. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan PCR döngüleri

PCR Döngüleri					
DIRECT-PCR			**NESTED-PCR**		
94 ºC	3 dk		94 ºC	3 dk	
94 ºC	1 dk		94 ºC	30 sn	
50 ºC	2 dk	35 döngü	58 ºC	30 sn	35 döngü
72 ºC	3 dk		72 ºC	1 dk	
72 ºC	10 dk		72 ºC	10 dk	

Çizelge 3.3. Direct ve Nested PCR çalışmalarında kullanılan pirimer çiftleri

Pirimer dizilimleri		Referans
F1	5'-AAGACGAGGATAACAGTTGG-3'	Lee ve ark., 1994
R0	5'- GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC-3'	Lee ve ark., 1994
P1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A-3'	Deng ve Hiruki,1991
P7	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	Schneider ve ark.,1995
F2n	5'-CGACTGCTAAGACTGG-3'	Gunderson ve Lee, 1996
R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	Gunderson ve Lee, 1996
U5	5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3'	Lee ve ark., 1995
U3	5' TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA 3'	Lee ve ark., 1995

PCR ürünleri DNA leader ile boyanmıştır ve 10 µl DNA leader ile boyalı PCR ürünü, %1,2'lik agaroz jelde 1xTAE bufer (67 mM Tris-HCl, 22 mM boric acid, 10 mM EDTA, pH 0.8) içerisinde elektroforez cihazında koşturulmuştur. Çalışmada 1 kb DNA marker kullanılmıştır. Elektroforez işleminden sonra jel ethidium bromide'le boyanıp görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

3.2.3.2.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

Biber bitkilerinden ve biber arazilerinden toplanan susam, fesleğen, tarla sarmaşığı gibi hastalığın diğer konukçuları ile vektör böceklerden elde edilen DNA'lardan PCR ürünleri elde edilmiştir. Nested PCR ürünleri enzim kesimleri için yeterli miktarda çoğaltılmıştır. Enzim kesimi için her bir örnekten 13 µl nested PCR ürünü, 0,5 µl kesim enzimi, 1,5 µl enzim solüsyonu (enzim buffer) eklenmiş ve örnekler 4 saat süre ile 37ºC'de enzim kesimi için bekletilmiştir. Nested PCR ürünleri *Eco*RI, *Taq*I, *Hha*I, *Alu*I, *Mse*I, *Rsa*I ve *Hpa*II enzimleri ile kesilmiş, koşturma işlemi %2'lik agarose jelde yapılmış, ethidium bromide ile boyanıp UV ışık altında görüntülenip fotoğraflanmıştır. Ayrıca örnekler MEGA-X programında dizilenerek, *i*PhyClassifier (Zhao ve ark, 2009) programında enzim kesimleri yapılmıştır.

3.2.3.2.4 DNA Dizi Analizi (Sekanslama)

Çalışmada DNA dizilimi için çalışma süresince pozitif bant elde edilen örneklerden seçilen 9 adet biber, 5 adet susam, 2 adet domates, 2 adet fesleğen, 3 adet tarla sarmaşığı bitkisinden ve de farklı tür ve familyadan 12 adet böcekten elde edilen

yaklaşık 1250 bp büyüklüğündeki Nested-PCR ürünleri BM Yazilim Danis. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. firmasına gönderilmiştir. Gönderilen PCR ürünlerinin saflaştırılması firma tarafından sağlanmış ve çift yönlü okumaları yapılmıştır. Sekans sonuçları ChromasPro 2.1.8 programında contig yapılmış, MEGA X programında akrabalık düzeylerine bakılmış, Genbankası'na yüklenebilecek veri haline getirilmiş ve Genbankası'na kaydedilerek kodları alınmıştır.

3.2.3.2.5 Filogenetik Analizler

Sekans analizi yapılan, Genbankası'na yüklenerek kodları alınan örneklerin Genbankasına kayıtlı BLAST sonucunda akrabalık düzeyleri birbirine yakın olan (%99 ve üzeri) örneklerle akrabalık düzeylerini belirlemek amacıyla MEGA X programı kullanılarak soy ağacı elde edilmiştir. Elde edilen dizilerin birbiri ile farklılaşmaları ve benzerlikleri böylece belirlenmiş ve filogenetik olarak akrabalık düzeyleri ortaya konmuştur. Soy ağacı oluşturmada kullanılan ağaç Neighbor-Joining, istatistik yöntem ise Maximum Likelihood olarak belirlenmiştir.

3.2.3.3. Serolojik Çalışmalar

Fitoplazma ile enfekteli olduğu belirlenen ve/veya şüphelenilen bitki örnekleri Solanacea familyasına ait türlerde enfeksiyon oluşturduğu bilinen AMV (Alfalfa mosaic virus), PVY (potato virus Y), PLRV (potato leaf-roll virus), PVX (potato virüs X), BCTV (beet curly top virus) ve TSWV (tomato spotted wilt virus) gibi önemli virüslerin ve de fitoplazmaların araziden alınan belirti gösteren bitkilerde karışık enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı DAS-ELISA (Double antibody sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmalarda BIOREBA, LEOWE ve AGDİA firmalarına ait antiserumlar kullanılmıştır.

DAS-ELISA yönteminde şu aşamalar uygulanmıştır:

Bitki örneklerinin testlenmesi Clark ve Adams (1977)'ın geliştirdiği standart "Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)" yöntemine göre yapılmıştır.

1. Kaplama tampon çözeltisi içinde Immunogamma globulinleri (IgG), ilgili

firmanın göndermiş olduğu prosedüre göre sulandırılarak ELISA plakalarının her bir çukuruna 100 µL konulmuştur. Plakalar üzeri kapatılmak suretiyle nemli bir ortamda 37°C'de 4 saat bekletilmiştir.

2. İnkubasyon süresi tamamlandığında plakalar yıkama tamponu ile üçer kez yıkanarak her yıkama sırasında 3 dakika beklenmiştir. Bu işlem bitince plakalar ters çevrilerek boşaltılmıştır ve birkaç kat kağıt havlu üzerinde hızlıca vurularak kuruması sağlanmıştır.

3. Özsu halinde elde edilen her bir örnek plakalar üzerinde önceden çıkarılmış olan testleme planı esas alınarak çift çukur olacak şekilde uygun kuyucuklara 100 µL konulmuştur. Bu aşamada plakalara yine çift kuyucuk olarak pozitif ve negatif kontroller de konularak plakalar nemli ortamda +4°C' de gece boyunca inkube edilmiştir.

4. İnkubasyondan sonra plakalar önce bekletilmeden iki kez arka arkaya, sonra 2. adımda açıklandığı gibi 3 kez yıkanmış ve kurutulmuştur.

5. Plakalara konjugat tamponu içerisinde sulandırılan konjugatlar her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde konularak 37°C'de 4 saat inkube edilmiştir.

6. İnkubasyon süresi tamamlandığında plakalar tekrar 3 kez yıkanarak kurutulmuştur.

7. Substrat tamponu içerisinde 1 mg/1 ml oranında taze olarak hazırlanmış substrattan (P-Nitrophenylphosphate) her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde konularak plakalar 15 dk oda sıcaklığında (+25°C) karanlık bir ortamda ve sonra 37°C'de reaksiyon gelişmesi için bırakılmıştır.

Renk gelişmesine göre 30 dk, 1 saat ve 2 saat sonra plakalar optik okuyucuda 405nm dalga boyunda Absorbans (A_{405} nm) değerleri okunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları Hatay ili salçalık biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı Altınözü, Reyhanlı, Kırıkhan, Kumlu, Antakya ve Arsuz ilçe ve mahalleleri ile Samandağ biberinin yoğun üretildiği Samandağ ilçesi ve mahallelerinde ve de sivri biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı Antakya ilçe ve mahallelerinde yürütülmüştür. Hatay'da Samandağ biberi üretimi genellikle örtüaltında iken (Şekil 4.1), diğer biber çeşitleri açık alanda yetiştirilmektedir.



Şekil 4.1. Cicadellidae, Aphididae ve Aleyrodidae gibi familyalara ait böcek türlerini yakalamak amacıyla sarı yapışkan (A) ve Domates güvesi (*Tuta absoluta*) gibi zararlıları yakalamak amacıyla feromon (B) tuzaklar kullanılanılarak seralarda Samandağ biberi yetiştiriciliği.

Arazi çalışmaları sırasında belirti yoğunluğunun salçalık biberlerde diğer biber çeşitlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Açık alanda yetiştirilen süs biberlerinde belirgin bir belirtiye rastlanmazken şüpheli bulunan bitkilerde de fitoplazma tespit edilememiştir. Ancak arazi içerisindeki diğer türlerde fitoplazma tespit edilebilmiş ve vektör böceklere rastlanmıştır. Samandağ ilçesinde seralarda kontrollü koşullarda yetiştirilen Samandağ biberlerinde hastalıkla bulaşık bitki bulunamazken Samandağ Çevlik mahallesinde açık alanda yetiştirilen kapya biberlerde belirti gösteren biber bitkilerine rastlanmış ve testlemelerde pozitif sonuç alınmıştır. Bunun sebebinin ise sera koşullarında yetiştiricilik genellikle kış mevsiminde yapıldığından vektör böcek popülasyonunun düşük olması, sarı yapışkan tuzak ve feromon tuzaklarla ve de düzenli ilaçlamalarla böceklerin kontrol altına alınması, sera içerisinde fitoplazmalara konukçu olabilecek yabancı otlarla yapılan mücadelelerin olumlu sonuçları olduğu düşünülmektedir.

4.1.1. Konukçu Bitkilerde Belirtilerin Değerlendirmesi

Fitoplazma ile bulaşık olduğu düşünülen biber bitkilerinde arazi koşullarında fitoplazmalara özgü belirtiler gözlenmiştir. Genel sarılık, bodurlaşma, çiçek oluşumunun engellenmesi, çiçek yapılarının yukarı yönelmesi, çiçek taç yapraklarının yeşillenmesi (virescence), phyllody, iri tomurcuk oluşumu, çoklu yan sürgün oluşumuna bağlı olarak çalılaşma, küçük yapraklılık, yapraklarda kaşık benzeri yukarı doğru kıvrılmalar gibi fitoplazmalara özgü belirtiler bulaşık olan her biber bitkisinde gözlenmiştir(Şekil 4.2).

Arazi koşullarında tarla içerisinde ya da kenarlarında bulunan diğer bitki türlerinde gözlenen belirtiler ise patlıcan bitkilerinde içi boş, aşırı büyümüş, iri mevye sapı ve çanak yaprak oluşumu; fesleğen bitkilerinde başaklarda çiçek saplarının uzamış ve çiçeklerin yeşillenmesi belirtileri; domates bitkilerinde iri tomurcuk ve yeşillenmiş çiçek yapıları, çiçeklerin yukarı yönelmesi ve yapraklarda ve çiçeklerde morarmalar; susam bitkilerinde hem yapraklarda küçülme hem de çiçek yapılarının yeşillenmesi ve yaprak şeklini alması ve kapsül oluşumunun engellenmesi, bazı kapsüllerin çatlaması ve susam tohumlarının çimlenmesi; tarla sarmaşığı bitkilerinde yapraklarda küçülme, sarılık, çoklu sürgün oluşumları; köpek üzümü ve sütleğen bitkilerinde ise genel

morarma şeklinde olmuştur. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde susam alanlarında yapılan bir çalışmada fitoplazmalarla enfekteli bitkilerde, bu çalışmada gözlenen belirtilere benzer iri kapsül oluşumu, kapsül çatlaması, tohumların kapsül içerisinde çimlenmesi belirtileri gözlenmiştir (Şaş-Sertkaya ve Çınar, 1999).



Şekil 4.2. Biber bitkilerinde fitoplazma enfeksiyonu ile ilişkili yaprakların kaşık şeklini alması, yaprakların ve çiçeklerin yukarı yönelmesi, çiçek yapılarının dumura uğraması şeklindeki belirtiler.

Yapılan belirtiye dayalı gözlemlere göre biber bitkilerinde belirtiler en çok 2016 yılında yoğun olarak gözlenmiş (%0,5-3), 2017 ve 2018 yıllarında ise biberlerde belirti nadiren gözlenmiş ancak biber arazilerindeki susam ve fesleğen bitkilerinde her 3 yılda da belirti oranı yüksek bulunmuştur (%30). Bu gözlemlere göre hastalığın böcekler tarafından önce susam bitkilerine bulaştırıldığı daha sonraları biber bitkilerine taşındığı düşünülmektedir. Bu durum, vektör böceklerin, beslenmek için susamı bibere göre daha çok tercih edebileceğini de düşündürmektedir. Dolayısıyla susam bitkilerinden çekilen böceklerden *Empoasca* sp. ve *Cicadulina* sp. olduğu tahmin edilen canlı türler kontrollü koşullarda Cezayir menekşesi bitkilerine salınmış ve salım yapılan 4 bitki de yapılan moleküler çalışmalar sonucu bitkilerin fitoplazma ile bulaşık bulunmuştur.

4.1.2. Fitoplazmalara Konukçu Olan Diğer Türlerin Belirlenmesi

Hatay ilinde de sebze üreticisi biber arazisinin belirli bir alanını yetiştiriciliğini yaptığı ana ürün yanında evsel tüketimleri için ihtiyaçları olduğu diğer ürünleri yetiştirmek için kullanmaktadır. Ayrıca böceklere karşı uzaklaştırıcı etkisi olduğu

düşünülen ve aromatik bitki olan fesleğen de arazi içerisinde dağınık halde sıklıkla rastlanan bitkiler arasındadır. Fesleğenin böceklere karşı uzaklaştırıcı etkisi olduğu düşünülerek organoponik üretim yapılan yerlerde bariyer bitki olarak kullanılmaktadır ancak Küba'da yapılan bir çalışmada 27 adet fesleğen (*Ocimum basilicum*) bitkisinde 16SrI gruba ait (Aster Yellows; *Candidatus* Phytoplasma asteris) Basil little leaf fitoplazması bildirilmiştir (Arocha ve ark., 2006). Üreticiler biber üretiminin yanında arazilerin bir kısımında ihtiyaçları olan domates, patlıcan, acur (hıtta), hıyar, kabak, susam gibi sebzeleri de yetiştirmektedir. Ancak ihtiyacı karşılaması amacıyla yetiştirilen bu türler çeşitli hastalık ve zararlı türlere konukçu olabileceği için bu tür entansif üretimler özellikle açık alanda risk oluşturabilmektedir. Nitekim yapılan surveylerde özellikle fitoplazma hastalıklarının en yoğun olduğu bitkilerin susam ve fesleğen olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hastalığı taşıyan vektör böceklerin (*Cicadulina bipunctata*) arazi içerisindeki susam bitkilerinde daha yoğun popülasyonda olduğu fark edilmiştir. Bu da vektör böceğin hastalığı bu bitkilerden kazanıp diğer kültür bitkilerine taşıdığını düşündürmektedir.

Hatay'da kloroz, bodurluk, yaz sonlarında çiçek yapılarının tohum bağlamaması ve yeşil yaprak yapılarına dönüşmesi (virescence ve phyllody) gibi belirtiler gösteren *O. basilicum* bitkilerinde moleküler ve DAPI boyama tekniği ile fitoplazma enfeksiyonunun varlığı ülkemizde ilk kez bildirilmiştir. Erken sonbaharda solgunluk, kahverengi lekeler ve nekroz oluşumu ile *Cicadulina bipunctella ve Empoasca* sp., gibi potansiyel vektör türlerin fesleğen bitkilerinde yaygın olarak gözlendiği bildirilmiştir (Sertkaya ve Sertkaya, 2017).

Tarla içerisindeki yabancı otlar hem hastalık hem de zararlılara konukçu olmaktadır. Özellikle çok yıllık olan tarla sarmaşığının fitoplazma hastalıklarının sonraki yıllarda yetiştiriciliği yapılan kültür bitkilerine aktarılmasında önemli rolü bulunmaktadır. Bu bakımdan tarla içerisinde yabancı ot mücadelesi de son derece önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda tarla içerisinde sararma, çoklu sürgün oluşumu gibi belirti gösteren tarla sarmaşığı bitkilerinde biberde de sorun olabilecek fitoplazma hastalıklarının tespit edilmiş olması bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Biber arazilerinden fitoplazma belirtisi gösteren (Şekil 4.3) toplamda 35 adet susam, 20 adet tarla sarmaşığı, 5 adet domates, 18 adet patlıcan, 7 adet fesleğen bitkisi araştırılmak üzere laboratuvara getirilmiştir. Bu bitki örneklerinden 25 susam, 5 tarla

sarmaşığı, 5 domates, 3 fesleğen bitkisinin laboratuvar çalışmalarında pozitif bantlar elde edilmiştir. İrileşmiş boş kavuz bulunduran patlıcanlarda bant elde edilememiştir. Ayrıca arazilerde şüpheli bulunan fener otu (*Physalis angulata*), köpek üzümü (*Solanum nigrum*), sütleğen (*Euphorbia falcata*) bitkilerinden de örnekler alınmış ancak herhangi bir pozitif bitki bulunamamıştır.



Şekil 4.3. Biber alanı içerisinde yetiştirilen diğer kültür bitkisi türlerinde görülen belirtiler. *Ca.* Phytoplasma tirfolii tespit edilen fesleğen (A), susam (B) ve domates (C) bitkileri ile *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilen domates (D) bitkisindeki fillodi (phyllody) ve cadısüpürgesi (witch's broom) belirtileri.

Ca. Phytoplasma trifolii ilk kez Kanada'da melez üçgülde (*Trifolium hybridum*) tespit edilmiş (Chiykowski, 1965), etmenin sarılık yapan bir virüs olduğu düşünülmüştür. Ancak sonraları sebep olan etmenin mikoplazma benzeri organizma olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraları, ABD, Meksika, Avrupa ve Asya'daki birçok

ülkede aynı gruptan (alt grup 16SrVI-A) fitoplazmalar bulunmuş ve önemli verim kayıpları ve kalite düşüşlerinden sorumlu olan, çeşitli baklagiller ve sebzelerde hastalıklara neden olan etmen olarak bildirilmiştir. Aynı gruptan fitoplazmalar, ABD'deki karaağaç ağaçlarında da hastalığa neden olmuştur (Flower ve ark., 2018). Şimdilerde 16SrVI gruptan fitoplazmalar dünya çapında geniş dağılımlara sahiptir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda susam, Cezayir menekşesi, biber, patlıcan ve vektör böcek *Orosius orientalis*'te *Ca.* Phytoplasma trifolii tespit edilmiştir (Sertkaya ve ark., 2007; Özdemir, 2017). Yapılan bu çalışmada da fesleğen ve susam örneklerinde 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii tespit edilirken tarla sarmaşığı bitkilerinde 16SrXII'nci gruba ait *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilmiştir. İri tomurcuk belirtisi gösteren domates bitkilerinde '*Ca.* Phytoplasma solani' beklenirken 1 örnekte 16SrXII'nci gruba ait *Ca.* Phytoplasma solani, diğer bir örnek ise 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Nitekim yapılan çalışmalarda domateslerdeki iri tomurcuk hastalığına farklı coğrafyalarda farklı gruba ait fitoplazmaların neden olduğu bildirilmiştir. Bu fitoplazmalar, İran'da aster yellows (16SrI), Çin ve Hindistan'da paenut witches' broom (16SrII), Mauritius'da elm yellows (16SrV), Amerika'da clover proliferation (16SrVI) ve Rusya'da stolbur (16SrXII) olarak rapor edilmiştir (Gungoosingh-Bunwaree ve ark., 2007; Ember ve ark., 2011; Xu ve ark., 2013; Sichani ve ark., 2014; Kumari ve ark., 2018).

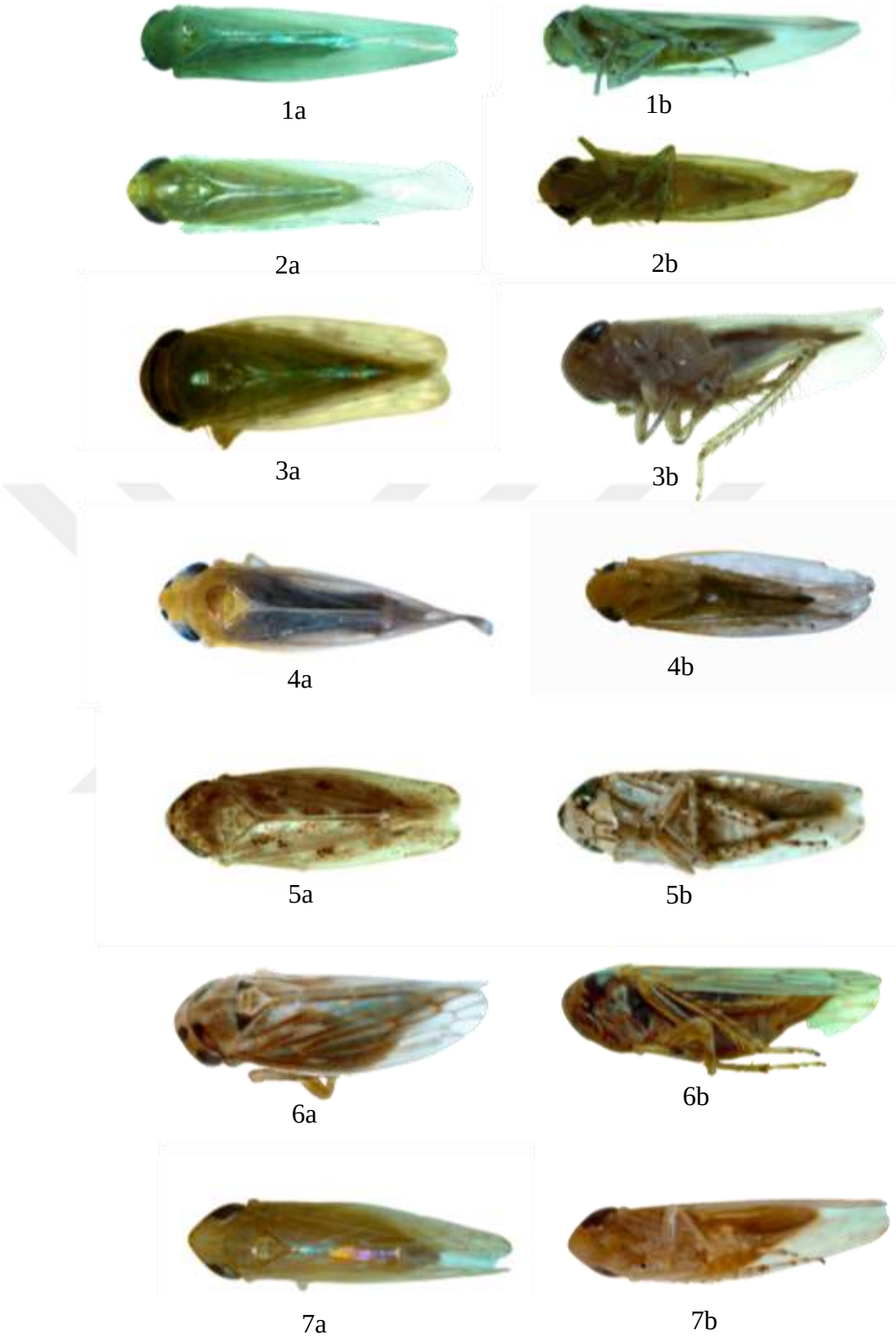
Çizelge 4.1. Biber alanlarında diğer bitki türlerinde belirlenen fitoplazmalar

Bitki türü	**Belirlenen Fitoplazma/lar**	**Grubu**	**Gözlenen belirtiler**
Domates (*Solanum lycopersicum*)	*Ca.* Phytoplasma solani, *Ca.* Phytoplasma trifolii	16SrVI, 16SrXII	Bitkide çalı görünümü, tomurcukların irileşmesi ve yukarı yönelmesi,
Fesleğen (*Ocimum basilicum*)	*Ca.* Phytoplasma trifolii	16SrVI	Çiçek kısırlığı (erkekleşme), çiçek saplarının uzaması, çiçeklerin içinden yaprak şeklinde yapıların gelişmesi
Tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*)	*Ca.* Phytoplasma solani	16SrXII	Çoklu sürgün oluşumu, yaprakların küçülmesi ve kaşık şeklini alması, sarılık
Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*)	*Ca.* Phytoplasma trifolii	16SrVI	Çiçeklerde phyllodi, bitkide çoklu sürgün oluşumu

4.1.3. Vektör Böceklerin Toplanmasına Yönelik Çalışmalar

Bilinen böcek vektörleri, Cicadellidae, Fulgoromorpha ve Psyllidae grubu içerisindeki yaprak pireleri, bitki pireleri ve psyllidlerdir. Ancak hastalığın taşınmasında sorumlu en geniş grup Cicadellidae familyasına aittir. Fransa'da şeker pancarı ve Cezayir menekşesine taşıma denemelerinde başarılı bulunan *Pentastiridius beieri* (Cixiidae)'nin stolbur hastalığını taşıdığını bildirilmiştir (Gatineau ve ark., 2001).

İran'da *Suaeda aegyptiaca* bitkilerindeki fitoplazma hastalığının araştırılmasına yönelik bir çalışmada, Cicadellidae familyasına ait *Neoalitrus pulcher, Jacobiasca lybica, Exitianus fasciolatus, Opsius versicolor* ve *Stirellus bicolour* türler toplanmış ve *Neoalitrus pulcher*'un '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' ile ilişkili bir ırk olan Suaeda aegyptiaca witches' broom (SaWT) fitoplazmasının vektörü olduğu bildirilmiştir (Askari Seyahooei ve ark., 2017). İran'da yapılan başka bir çalışmada da sarı papatya (*Cota tinctoria*) ve *Orosius albicinctus* vektör böceğinde '*Ca.* Phytoplasma trifolii' ile ilişkili *Cota tinctoria* witches' broom (CtWB) ırkı tespit edilmiştir. Hatay ilinde biber alanlarında yürütülen bu çalışma sırasında özellikle üretim sezonu sonunda ilaçlamaların son bulmasıyla Cicadellidae familyasına ait böcek popülasyonlarında ciddi artış gözlenmiştir. D-VAC aleti ile toplanan böcek türleri arasında en fazla bulunan tür *Empoasca* sp. türleri olurken, bunu *Cicadulina bipunctata, Psammotettix confinis* ve *Psammotettix* sp. türleri takip etmiştir. Diğer belirlenen türler arasında *Exitianus capicola, Euscelidius* sp. ve *Balclutha hebe* bulunmakla beraber Delphacidae olduğu düşünülen türler teşhis edilememiş, Delphacidae olarak kaydedilmiştir. Hatay'da Solanaceae familyasına ait önemli türlerin (patates, domates, biber, patlıcan) yetiştiriciliği yapılan alanlarda *Empoasca decipiens, Asymmetrasca decedens* ve *Psammotettix provincialis* türlerinin yoğun olarak bulunduğu Kılıç ve Sertkaya (2019) tarafından bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada bu alanlarda varlığı bildirilen ve birçok bitkide önemli kayıplara neden olan stolbur hastalığının önemli vektörü olan *Hyalesthes obsoletus* (Çalı ve ark., 1989; Berger ve ark., 2009; Safarova ve ark., 2011; Landi ve ark., 2015) türleri teşhis edilememiş, Cixiidae olarak kaydedilmiştir. Üretim sezonu sonunda ise diğer vektör türlerinin, arazi ilaçlamalarının sona erdirilmesiyle, popülasyonlarında artış görülmüştür. Özellikle *Empoasca* sp. ve *Cicadulina bipunctata* türlerinde ciddi artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Biber arazilerinde yoğun olarak bulunan ve teşhis edilebilen bazı türlerin dorsal ve ventral görüntüleri (1.*Balclutha hebe*, 2.*Empoasca* sp., 3.*Exitianus capicola*, 4.*Cicadulina bipunctata*, 5.*Euscelidius* sp., 6.*Anaceratagallia laevis*, 7.*Psammotettix* sp.).

4.1.4. Şüpheli Bulunan Bitkilerin Kontrollü Koşullarda Kültüre Alınması

Arazi çalışmaları sırasında belirtili bitkilerden köklü olarak alınarak saksılara dikilmek üzere iklim seraya ve iklim odalarına getirilmiştir. Çalışma boyunca enfekteli 50 adet biber, 2 adet fesleğen ve 1 adet domates bitkisi köklü olarak getirilmiş ve saksılara dikilmiştir. Bitkiler yaklaşık 2 ay canlı tutulabilmiştir. Bu bitkiler kodlanmış ve yaprak orta damarları alınmıştır. Aynı bitkilerden sağlıklı test bitkilerine de aşılamalar yapılmıştır. Aşılamada T ve yonga göz aşıları tercih edilmiştir. Aşılama çalışmalarında en başarılı sonucu, Cezayir menekşesi üzerine yapılan susam ve fesleğen aşılarında elde edilmiştir. Susamla aşılanan 4 adet, fesleğenle aşılanan 1 adet Cezayir menekşesi bitkisinde belirti gözlenmiş ve bitkilerden pozitif bant elde edilmiştir.

4.1.5. Fitoplazmaların Arazide Doğal Taşınmasına Yönelik Çalışmalar

Fitoplazma hastalıklarının doğada yayılmasında böcekler etkin rol oynamaktadır. Bölgemizde hastalık taşıyan vektör böceklerin varlığı bilinmektedir. Hastalığı sağlıklı test bitkilerine arazi şartlarında bulaştırmak amacıyla 2016-2018 yılları arasında her yıl ortalama 150 adet Cezayir menekşesi bitkisi biber alanlarına yerleştirilmiştir. Özellikle salçalık biber üretiminin yoğun olduğu Antakya ilçesi Avsuyu, Bohşin ile Altınözü ilçesi Hacıpaşa mahallelerindeki biber üretim alanları deneme için tercih edilmiştir. Bu mahallelerden de Bohşin ve Hacıpaşa Suriye'ye sınır mahalleler olup Asi nehri ile ayrılmışlardır. Suriye tarafında da sınır boyunca sebze ve meyve üretimi yapılmakta ve böcekler bu iki ülkenin üretim deseninde dolaşarak hastalığı her iki taraftan da kazanıp taşıma olasılığı oldukça yüksektir. Bohşin Mahallesi'nde özellikle 3 sınır arazisine 10'ar adet Cezayir menekşesi test bitkisi olarak yerleştirilmiştir. Bohşin Hacıpaşa mahalleleri arası tesadüfi seçilen biber arazilerine ise 10-20 adet Cezayir menekşesi yerleştirilmiştir. Bitkiler arazi kontrolleri sırasında belirti gelişimi kontrol edilmiştir. Sezon sonunda arzilere dikilen bitkilerin sadece 150 tanesi geri alınabilmiştir (bir kısmı kurumuş bazıları ise işçiler tarafından sökülüp alınmış). Alınan bitkiler ilaçlanarak iklim odalarına alınmış ve burada canlı kalabildikleri süre boyunca yapraklarda sararma ve küçülme gibi belirti gelişimi gözlenmiş ve PCR çalışmaları için yaprak örnekleri alınmıştır. Yapılan çalışmalarda geri alınabilen bitkilerde herhangi bir bulaşmanın

olmadığı tespit edilmiştir.

Cezayir menekşesi önemli bir tıbbi bitki olmasının yanında, fitoplazma, spiroplazma ve virüs hastalıkları için doğal bir konukçudur. Aynı zamanda bu hastalıkları deneysel olarak bulaştırmak için duyarlı bir indikatör bitkidir. Bu hastalıklar doğada vektör böceklerle bulaşabileceği gibi deneysel olarak da küsküt ya da aşı yoluyla da bulaşabilmektedir. (Marcone ve ark., 1997a; Chang, 1998; Şaş-Sertkaya, 1999; Favali ve ark.,2008).

4.2. Kontrollü İklim Odası ve Sera Çalışmaları

4.2.1. Doku Aşılaması ve Böcek Vektörler ile Fitoplazmaların Sağlıklı Bitkilere Bulaştırılması Çalışmaları

Fitoplazma hastalıkları, hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere başarılı bir şekilde, aşılama ile parazitik bitki olan küsküt ile ve de vektör böceklerle taşınabilmektedir (Çıtır, 1985, McCoy ve ark.,1989; Lee ve ark., 2000; Singh ve Singh 2000; Seemüller ve ark.,2002; Pracros ve ark., 2006; Weintraub ve Beanland, 2006; Bertaccini, 2007; El-Banna ve ark., 2007; Tohidi ve ark., 2015). Sararma, bodurlaşma, çalılaşma, phyllody, virescence, iri tomurcuk gibi fitoplazmalara özgü belirti sergileyen bitkilerden alınan doku parçaları yonga veya T göz aşısı tekniği ile sağlıklı bitkilere hastalık aktarılmaya çalışılmıştır. Çalışmada tür içinde (biberden bibere) aşılama yapıldığı gibi türler arası da (biber, susam ve fesleğenden Cezayir menekşesine) aşılamalar yapılmıştır. Yapılan aşılamalarda hastalığın aktarılabilmesi amacıyla aşılanan doku parçaları daha uzun süre canlı kalabilmesi için bitkilere naylon torbalar giydirilmiş yaklaşık 10 gün sonra naylonlar çıkartılmıştır. Ancak torba içerisinde oluşan fazla nem bazı bitkilerde doku parçalarında küflenmelere neden olmuştur. Dolayısıyla daha sonraki çalışmalarda naylon torba kullanılmamıştır. Hastalık hem susamdan hem de fesleğenden yapılan aşılamalarda 5/11 oranında başarılı bir şekilde bulaştırılabilmiştir. Fitoplazma taşımalarında küsküt (*Cuscuta* sp.) de önemli bir vektördür. Arazi gözlemleri sırasında hastalık belirtisi gösteren ve köklü olarak alınan ve iklim odalarında saksılara şaşırtılan bitkilere taşıma denemesi yapmak için küsküt bırakılmış ancak küsküt bitkilere tutunamadığı için küskütle taşıma yapılamamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.5. Enfekteli fesleğen bitkisinden Cezayir menekşesine sürgün aşılaması (A, F, G, H); enfekteli susamdan Cezayir menekşesine sürgün aşılaması (D); enfekteli susamdan tütün (B) ve susamdan biber (C, E) bitkilerine sürgün aşılaması. Enfekteli biber bitkisine küsküt (*Cuscuta* sp.) tutundurma çalışması.

Yapılan gözlem ve de aşılama sonuçlarına göre tür içinde özellikle enfekteli

Cezayir menekşesinden sağlıklılarına bulaştırma oranı neredeyse %100 iken türler arasında ise enfekteli susamdan Cezayir menekşesine ya da enfekteli fesleğenden Cezayir menekşesine yapılan aşılamalarda doku parçaları yaklaşık 1 hafta içerisinde kurumasına rağmen, hastalığın aktarılma oranı yaklaşık %50 bulunmuştur. Ancak enfekteli biberden alınan doku parçalarıyla yapılan aşılamalarda ne kendi türüne ne de diğer türlere hastalık aktarılabilmiştir. Aynı şekilde domates, tütün, patlıcan bitkilerine yapılan aşılamalarda da başarı sağlanamamıştır. Dolayısıyla aşılamada hastalığın farklı türlenden de olsa aktarılmasında en başarılı bitki Cezayir menekşesinin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Doku aşılaması yoluyla *Ca*. Phytoplasma trifolii fitoplazmasının bulaşma oranları

Aşılanan bitkiler[1]	Başarılı taşıma sayısı[2]/ Doku aşılaması yapılan bitki sayısı[3]				
	Biber	Susam	Cezayir menekşesi	Fesleğen	Toplam bulaşma oranı
Biber	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40
Tütün	0/10	0/5	0/5	0/5	0/25
Cezayir menekşesi	0/10	3/10	9/10	3/10	15/40
Toplam bitki sayısı	0/30	3/25	9/25	3/25	15/105

1) Enfekteli bitkilerden doku aşılanan-alıcı bitki türleri,
2) Başarılı taşıma: Moleküler çalışmalar sonucu doku aşılaması ile hastalık bulaştırılan bitki sayısı,
3) Enfekteli biber, susam, Cezayir menekşesi ve fesleğen bitkilerinden doku parçası alınarak aşılama yapılan test bitkisi sayısı.

4.2.2. Tohumla Taşıma Çalışmaları

Fitoplazma hastalıklarının tohumla taşınmadığı yıllarca tartışma konusu olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda kolza, domates ve kanola gibi bitkilerde fitoplazmaların tohumla taşınabildiği bildirilmiştir (Calari ve ark., 2011; Satta ve ark., 2019). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise stolbur fitoplazması ile bulaşık bir bitkiden alınan meyvelerden tohumlar çıkarılmış ve ekimi yapılmış ancak fidelerde fitoplazma tespit edilememiştir (Özdemir ve Saygılı, 2012). Hastalığın erken dönemde (fide dönemi) bulaşmalarında çiçek ve meyve oluşumu tamamen engellenmektedir. Ancak belirli miktarda meyve meyda geldikten sonraki bulaşmalarda etmenin meydana gelmiş meyvelere geçerek taşınması mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada da,

tohum oluşturmuş fakat sonradan hastalık bulaşmış Cezayir menekşesi bitkilerinden elde edilen tohumlar kontrollü koşullarda ekilmiştir. Elde edilen fideler sağlıklı görünümde olup ekilen tohumdan daha az çimlenme görülmüştür. Gelişen fidelerden yapılan PCR sonuçlarına göre tohumdan gelişen bitkilerde fitoplazma enfeksiyonu tespit edilememiştir.

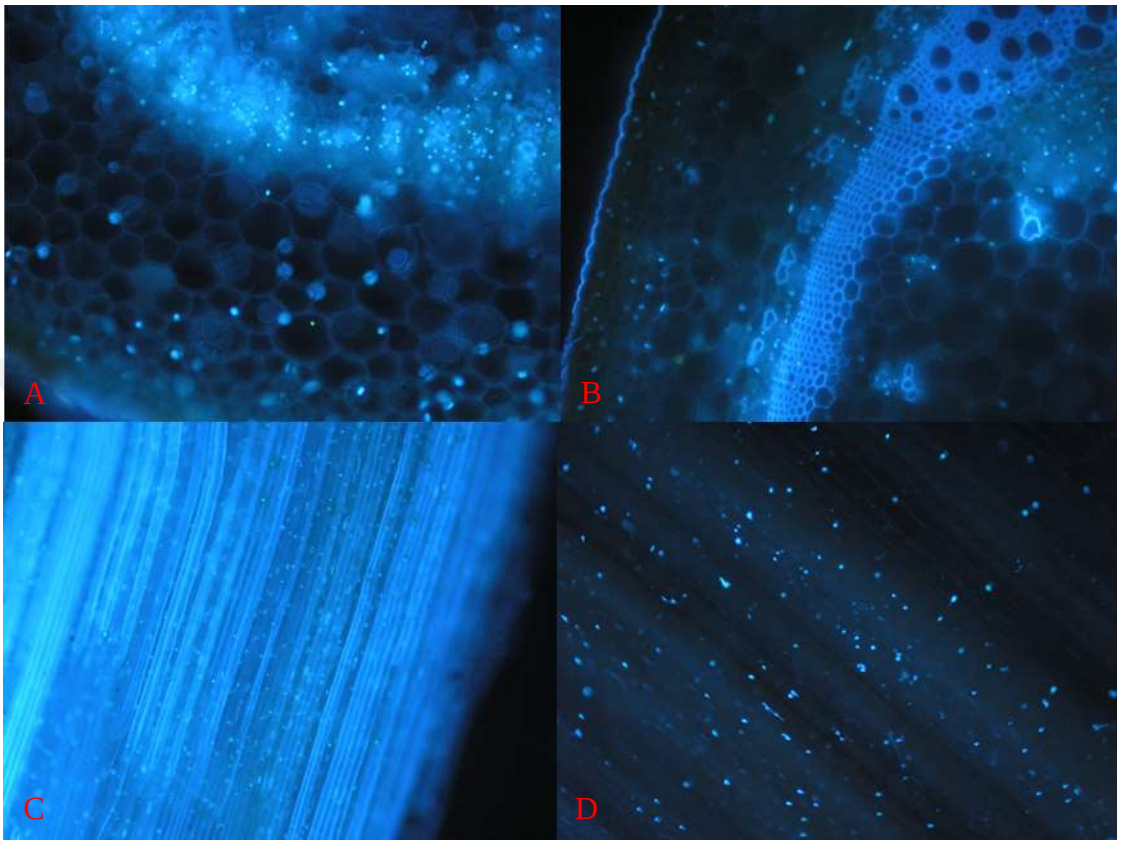
4.3. Laboratuvar Çalışmaları

4.3.1. DAPI ile DNA Boyama ve Floresan Mikroskopi Görüntülemesi

DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole, ilk kez Dann ve arkadaşları (1971) tarafından sentezlenmiştir. Fitoplazmaların ön tespiti olarak kullanılan ve elektron mikroskobuna bağımlılığı azaltan DNA boyama (DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole) yöntemi ile floresan mikroskopta, küçük yapraklılık hastalığı ile bulaşık patlıcan bitkisinin floem demetlerinde fitoplazmalar, Das ve Mitra (2004) tarafından görüntülenmişlerdir. Ayrıca Andrade ve Arismendi (2013), DAPI boyama tekniğinin, enfektelenmiş dokuların elle kesilmiş veya dondurucu mikrotom kesitlerinde fitoplazmaların varlığını tespit etmek için geliştirilmiş basit bir yöntem olduğunu, ayrıca DAPI'nin, AT bakımından zengin olan DNA'yı bağladığını, böylece floem hücreleri arasında lokalize olan fitoplazmaların, bir floresan mikroskobunda görselleştirilebileceğini bildirmişlerdir. Prosedürünün hızlı, kullanımının kolay, ucuz ve enfekte olmuş bitkilerde fitoplazma benzeri cisimleri saptamak veya ölçmek için bir ön veya kantitatif yöntem olarak kullanılabileceğini de eklemişlerdir. Bu çalışmada da fitoplazma ile enfekteli olduğu düşünülen, sararma, normal boyutundan daha küçük ve zayıf yaprak oluşumu, çalılaşma, çiçeklerin yeşillenmesi ve iri tomurcuk gibi belirtiler gözlenen biber örneklerinde DNA boyama yöntemiyle fitoplazmaların varlığı araştırılmıştır (Şekil 4.6).

Elde edilen şüpheli bitki örneklerinde DNA boyama sonrası floresan mikroskopi çalışmaları ile fitoplazmalara özgü yapılar belirlenmiştir. Toplanan örneklerin DAPI boyaması Seemüller ve Kirkpatrick (1996)'e göre yapılmıştır. Negatif kontrol olarak sağlıklı bitkilerin kabuk altı floem yapıları kullanılmıştır. DAPI ile yapılan çalışmalarda enfekteli bitkilerin dokularında benzer yapıların varlığından söz edilmiş ve floresan

parlamaların enfekteli dokularda gözlendiği ancak sağlıklı dokularda parlamaların meydana gelmediği bildirilmiştir (Jarausch ve ark., 1998; Cordova ve ark., 2003; Bricker ve Stutz, 2004; Canik ve Ertunc, 2007; Arismendi ve ark., 2010).



Şekil 4.6. Enfekteli olduğu düşünülen (A,B,C) ve sağlıklı biber (*Capsicum annuum*) bitkilerinde (D), dikey (A, B) ve yatay (C,D) kesitlerle yapılan DAPI boyama görüntüleri.

4.3.2. Moleküler Çalışmalar

4.3.2.1. Bitki ve Böcek Numunelerinden DNA İzolasyonu

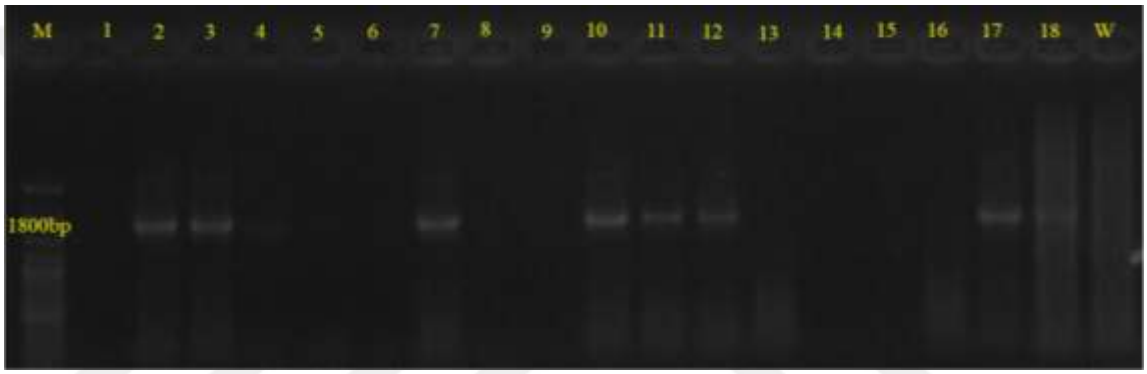
Araziden toplanan ve iklim odasında yetiştirilen, bulaştırma yapılan bitki örneklerden yaprak orta damarları ve çiçek kısımları alınarak sıvı azotta ezildikten sonra bir miktarı daha sonraları tekrar kullanabilmek için steril ependorf tüplere doldurulup -80 °C'de saklanmıştır. Sıvı azotta ezilen yaklaşık 0,1 g'lık doku örneğinden toplam DNA elde etmek için Doyle ve Doyle (1990)'a göre (%2'lik CTAB metodu) DNA izolasyonu yapılmış, ayrıca Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti ile de bir grup testlenerek

karşılaştırma yapılmıştır. İzolasyonu yapılan 24 örneklik karşılaştırmalı çalışmada CTAB metodu hazır kite göre daha başarılı sonuç verdiği için diğer tüm çalışmalarda CTAB metodu kullanılmıştır. Bitkiden toplam nükleik asit izolasyonu için yaprak orta damarları ve çiçek yapıları ayrı ayrı alınıp sıvı azot yardımıyla ezilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biber bitkilerinin çiçeklerinden daha kaliteli DNA elde edilebilmiş, susam bitkilerinin özsuyunun yoğun kıvamlı olmasından dolayı yaprak saplarınından DNA daha kolay elde edilebilmiştir. Diğer bitki türlerinde ise yaprak orta damarları DNA elde etmede yeterli bulunmuştur. Araziden toplanan, laboratuvarda gruplandırılan, fotoğraflanan ve teşhise giden böceklerden MN izolasyon kiti ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışmada 90 adet *Empoasca* sp., 85 adet *Cicadulina bipunctata*, 65 adet *Psammotettix* sp., 35 adet *Balclutha hebe*, 25 adet *Euscelidius* sp., 4 adet *Anaceratagallia laevis*, 3 adet *Exitianus capicola* türlerinden toplam DNA izole edilmiştir. DNA izolasyonu popülasyonu yüksek türlerde (*Empoasca* sp., *Balclutha hebe*, *Euscelidius* sp., *Cicadulina bipunctata*, *Psammotettix* sp.) her tüpte 5 örnek olacak şekilde, nadir bulunan türlerde (*Anaceratagallia laevis*, *Exitianus capicola*) ise her tüpte bir örnek olacak şekilde yapılmıştır. *Exitianus capicola*'nın *Ca.* Phytoplasma cynodontis'in vektörü olduğu bildirilmiştir (Salehi ve ark., 2009). *Ca.* Phytoplasma trifolii ile enfekleti süs biberlerinde 1 hafta beslenmesi sağlanan *Ceratagallia nitidula* ve *Empoasca abrupta* (Hemiptera: Cicadellidae) türleri ile yapılan taşıma çalışmalarında '*Ca.* Phytoplasma trifolii' başarılı bir şekilde taşınabilmiş ve bu türlerin vektör oldukları rapor edilmiştir (Salas- Muñoz ve ark., 2018).

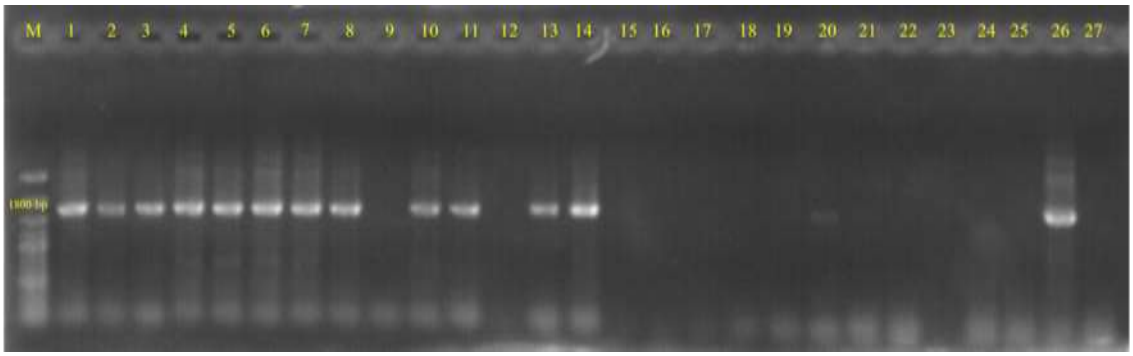
4.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Direk PCR ve Nested-PCR) Çalışma Sonuçları

Çalışma boyunca fitoplazma belirtisi gösteren ve de şüpheli tüm bitki örneklerinin yaprak orta damarları ve çiçek yapıları -80°C'de tutulmuştur ve DNA'ları CTAB yöntemi ile elde edilmiştir. Elde edilen DNA ve PCR ürünleri çalışma süresince -20°C'de muhafaza edilmiştir. PCR çalışmaları sırasında bitkilerden elde edilen DNA'lar 1/30 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. PCR için hazırlanan karışıma 1,5 µl sulandırılmış DNA eklenmiştir. Böcekten elde edilen DNA'lar ise sulandırma yapılmadan 5 µl kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) işlemi iki aşamada

yapılmıştır. Bunlar Direk-PCR ve Nested-PCR'dir. Direk-PCR'de 1.8 kbp ürün veren evrensel R16F1/R16R0 ve P1/P7 primer çiftleri, Nested-PCR için ise 1,250 bp ürün veren R16F2n/R16R2 ve 880 bp büyüklüğünde ürün veren U5/U3 primerleri kullanılmıştır. İlk aşamada P1/P7 primer çifti ile yapılan Direct PCR üzerinden, R16F2n/R16R2 primerleri kullanılarak Nested PCR yapılmış, P1/P7 primerleri ile pozitif bantlar elde edilmesine rağmen (Şekil 4.7-8), Nested PCR'da bant elde edilememiştir (Şekil 4.9). Daha sonra P1/P7 üzerinden fU5/rU3 primerleri kullanılmış ve tüm hastalık belirtili bitkilerden pozitif bant elde edilmiştir. Sonraki çalışmaların tamamında F1/R0 ve F2n/R2 pirimer çiftleri kullanılmıştır.

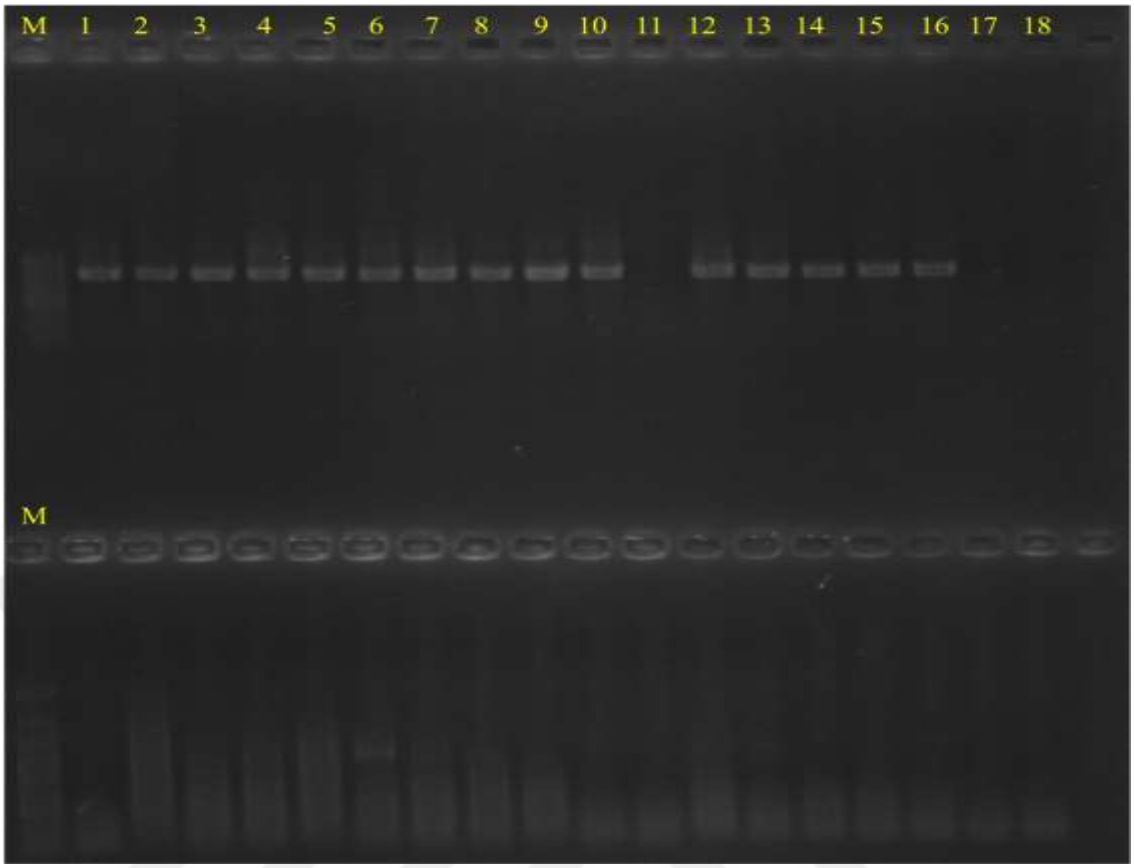


Şekil 4.7. P1/P7 primer çifti ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen pozitif bantlar (1-5 biber, 6-9domates, 10-14 susam, 15,16 fesleğen, 17-18 pozitif kontrol, W:su, M: marker, 100bp plus).



Şekil 4.8. Belirti gösteren biber örneklerinin P1/P7 primer çifti ile yapılan PCR çalışması sonucu elde edilen pozitif bantlar (1-25 biber, 26 pozitif kontrol, 27: su, M: marker, 100bp plus).

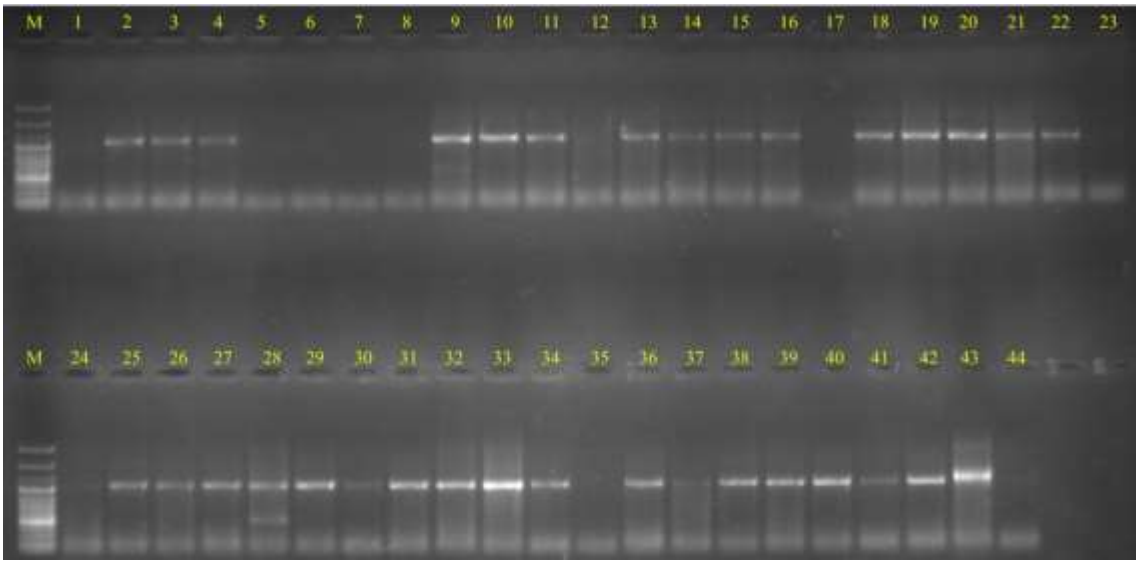
Swisher ve arkadaşları (2017) da biberlerde yaptıkları bir çalışmada P1/P7 üzerinden fU5/rU3 primerleri kullanmış, ancak R16F2n/R16R2 primerleri ile de teyit etmişlerdir.



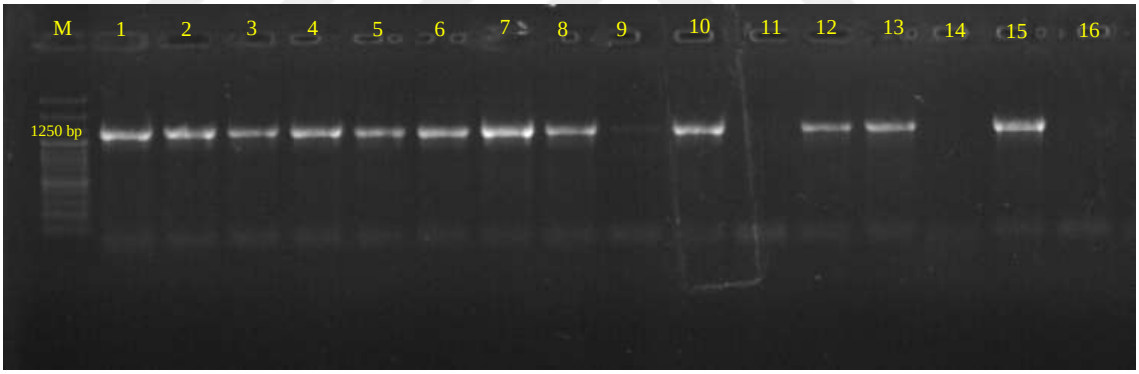
Şekil 4.9. PCR çalışmalarında P1/P7 üzerinden fU5/rU3 ile Nested PCR sonucu (A), P1/P7 üzerinden F2n/R2 primer çiftleriyle yapılan Nested PCR sonucu (B), 1-4 biber, 5-7 domates, 8-11 susam, 12-14 fesleğen, 15-16 pozitif kontrol, 17 su, 18 buffer (alttaki örnekler aynı sıra ile F2n/R2 primerleri ile Nested PCR yapılmıştır).

Yapılan çalışmalarda genellikle Nested PCR aşamasında R16F2n/R16R2 primer çiftleri kullanıldığından Direct PCR için R16F1/R16R0 primerleri sentezletilmiş ve onun üzerinden R16F2n/R16R2 primerleri ile Nested PCR yapılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak tüm bitki ve böcek örnekleri ile yapılan PCR çalışmalarında, R16F1/R16R0 ve R16F2n/R16R2 primer çiftleri ile başarılı sonuçlar alınmıştır (Şekil 4.10-11).

Çağlar ve arkadaşları (2010) Kayseri, Sivas, Kahramanmaraş ve Adana illerinde domates ve patates alanlarında yaptıkları çalışmada R16F1/R16R0 ve R16F2n/R16R2 primer çiftlerini kullanmış ve başarılı sonuçlar almışlardır.



Şekil 4.10. Tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis*) örnekleri (1-7), fener otu (*Physalis angulata*) örneği (8), *Empoasca* sp türleri (9-16), Delphacideae türleri (17-19), *Exitianus capicola* (20), *Euscelidius* sp. örnekleri (21-22, 24-26), biber (*Capsicum annuum*) örnekleri (27-34), susam (*Sesamum indicum*) örnekleri (35-37), fesleğen (*Ocimum basilicum*) örnekleri (38-40) pozitif kontrol (41-43), su kontrol (23,44). Marker (M), Hibrigen 100 bp plus.



Şekil 4.11. F1/R0 primerleri ile Direct PCR aşamasından sonra F2n/R2 primerleri ile Nested PCR aşaması sonuçları. (1-2 biber, 3-4 domates, 5-6 susam, 7-8 fesleğen, 9-10 tarla sarmaşığı, 11-15 *Empoasca* sp., 16 su) (Marker (M): Hibrigen 100 bp plus).

4.3.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

Biber bitkilerinden ve biber arazilerinden toplanan susam, fesleğen, tarla sarmaşığı gibi hastalığın diğer konukçuları ile vektör böceklerden elde edilen DNA'lardan PCR ürünleri elde edilmiştir. İlk enzim kesimi (RFLP) çalışmaları, pozitif olarak tespit edilen bazı örneklerde RsaI, AluI ve MseI enzimleri ile klasik yöntemle yapılmıştır (Şekil 4.12). Sonraki çalışmalarda ise gen dizisi yapılan toplam 35 bitki ve

böcek örneği MEGA-X programında analiz edilmiş, her türden 1 örnek seçilerek NCBI Genbankası'na yüklenmiştir. Genbankasına yüklenen biber (MT993358), domates (MT992754), susam (MT994434), fesleğen (MT994432), *Empoasca* sp. (MT994430), *Exitianus capicola* (MT994433) ve *Euscelidius* sp. (MT994431) örneklerinden elde edilen fitoplazma *Ca.* Phytoplasma trifolii (16SrVI) olarak tespit edildiğinden iPhyClassifier (Zhao ve ark, 2009) programında AluI, EcoRI, HaeIII, HhaI, MseI, RsaI, SspI ve TaqI ezimleri 16SrVI grubu seçilerek (Şekil4.13); *Ca.* Phytoplasma solani (16SrXII) olarak tespit edilen domates (MT992796) ve tarla sarmaşığından (MT993422) elde edilen izolatlar da aynı ezimler ve 16SrXII. grup seçilerek enzim kesimleri yapılmıştır (Şekil 4.14). Bu çalışmada biber alanlarından toplanan ve teşhise gönderilen böcek türlerinde belirlenen fitoplazmalar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Potansiyel vektör böcek türlerinde belirlenen fitoplazmalar

Böcek türleri	**Belirlenen Fitoplazma**		**Fitoplazma grubu**	**Pozitif örnek sayısı/ Testlenen örnek sayısı (toplam böcek sayısı-adet)**
Empoasca sp.	*Ca.* trifolii	Phytoplasma	16SrVI	9/18 (90)
Exitianus capicola	*Ca.* trifolii	Phytoplasma	16SrVI	1/3 (3)
Euscelidius sp.	*Ca.* trifolii	Phytoplasma	16SrVI	4/5 (25)
Delphacide (tanımlanamamış tür)	*Ca.* trifolii	Phytoplasma	16SrVI	2/2 (2)

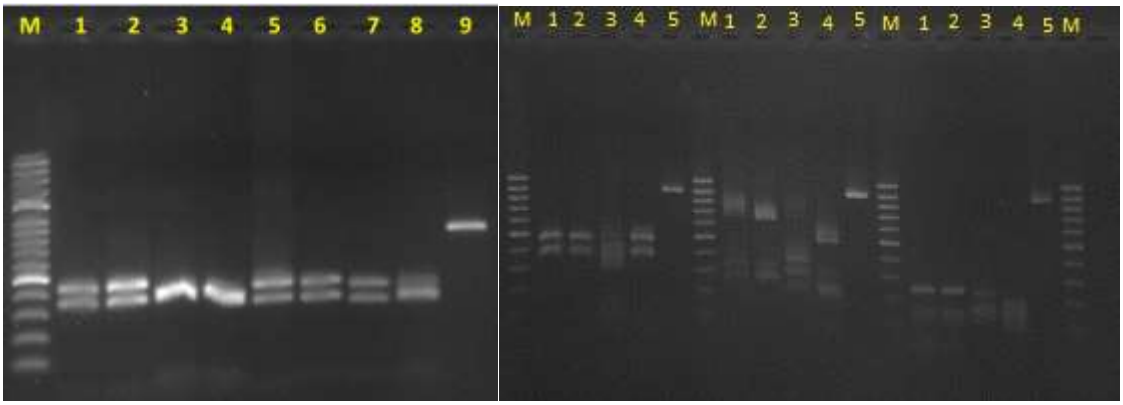
Çalışmada 90 adet *Empoasca* sp., 85 adet *Cicadulina bipunctata*, 65 adet *Psammotettix* sp., 35 adet *Balclutha hebe*, 25 adet *Euscelidius* sp., 4 adet *Anaceratagallia laevis*, 3 adet *Exitianus capicola* türlerinden toplam DNA izole edilmiştir. Testlenen böcek örneklerinden sayıca fazla olan türler (*Empoasca* sp., *Cicadulina bipunctata*, *Psammotettix* sp., *Balclutha hebe* ve *Euscelidius* sp.,) 5 bireylik gruplar halinde, sayıca az bulunan türler (*Anaceratagallia laevis*, *Exitianus capicola*) her bir birey bir örnek olacak şekilde incelenmiştir. Böcek örnekleri için en iyi sonuç MN kitleri ile yapılan DNA izolasyonu çalışmalarında elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada mevcut literatür bilgilerine göre *Empoasca* sp., ve *Euscelidius* sp. türlerinde ülkemizde, *Exitianus capicola* böcek türünde ise dünyada ilk defa *Ca*. Phytoplasma

trifolii tespit edilmiştir. Dünya genelinde *Ca.* Phytoplasma trifolii fitoplazması tespit edilen türler Çizelge 4.4'de verilmiştir.

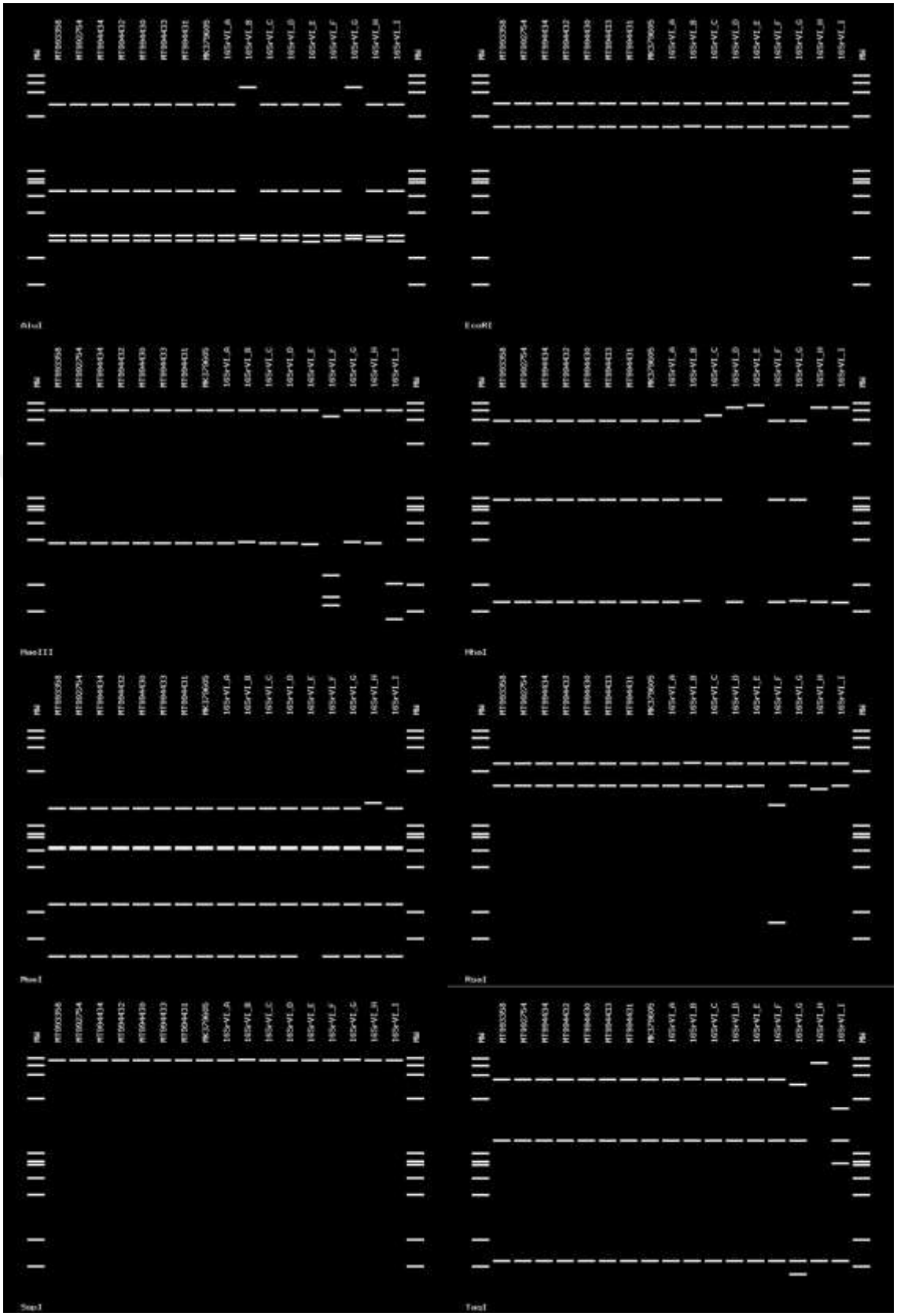
Çizelge 4.4. *Ca*. Pytoplasma trifolii taşıdığı bildirilen vektör böcek türleri

Vektör	**Dağılımı**	**Referans**
Aphrodes bicinctus	Rusya	Girsova ve ark., 2017.
Batracomorphus punctatus	Avustralya	Weintraub ve Beanland, 2006.
Ceratagallia nitidula	Meksika	Salas-Muñoz ve ark., 2018.
Circulifer tenellus	Amerika	Munyaneza ve ark., 2007; Golino ve ark., 1989; Murphy ve ark., 2014.
Empoasca abrupta	Meksika	Salas-Muñoz ve ark., 2018.
Euscelis incisa	İngiltere	Weintraub ve Beanland, 2006.
Hishimonus phycitis	Hindistan	Gopala ve ark., 2018.
Macrosteles fascifrons	Amerika	Hiruki ve Wang, 2004
Neoaliturus haematoceps	İran	Salehi ve ark., 2017
Neoaliturus pulcher	İran	Seyahooei ve ark., 2017
Orosius argentatus	Avustralya	Weintraub ve Beanland, 2006
Orosius orientalis	Türkiye	Sertkaya ve ark., 2007; Özdemir., 2017
Empoasca sp.*	Türkiye	Bu çalışma
*Exitianus capicola***	Türkiye	Bu çalışma
Euscelidius sp.*	Türkiye	Bu çalışma

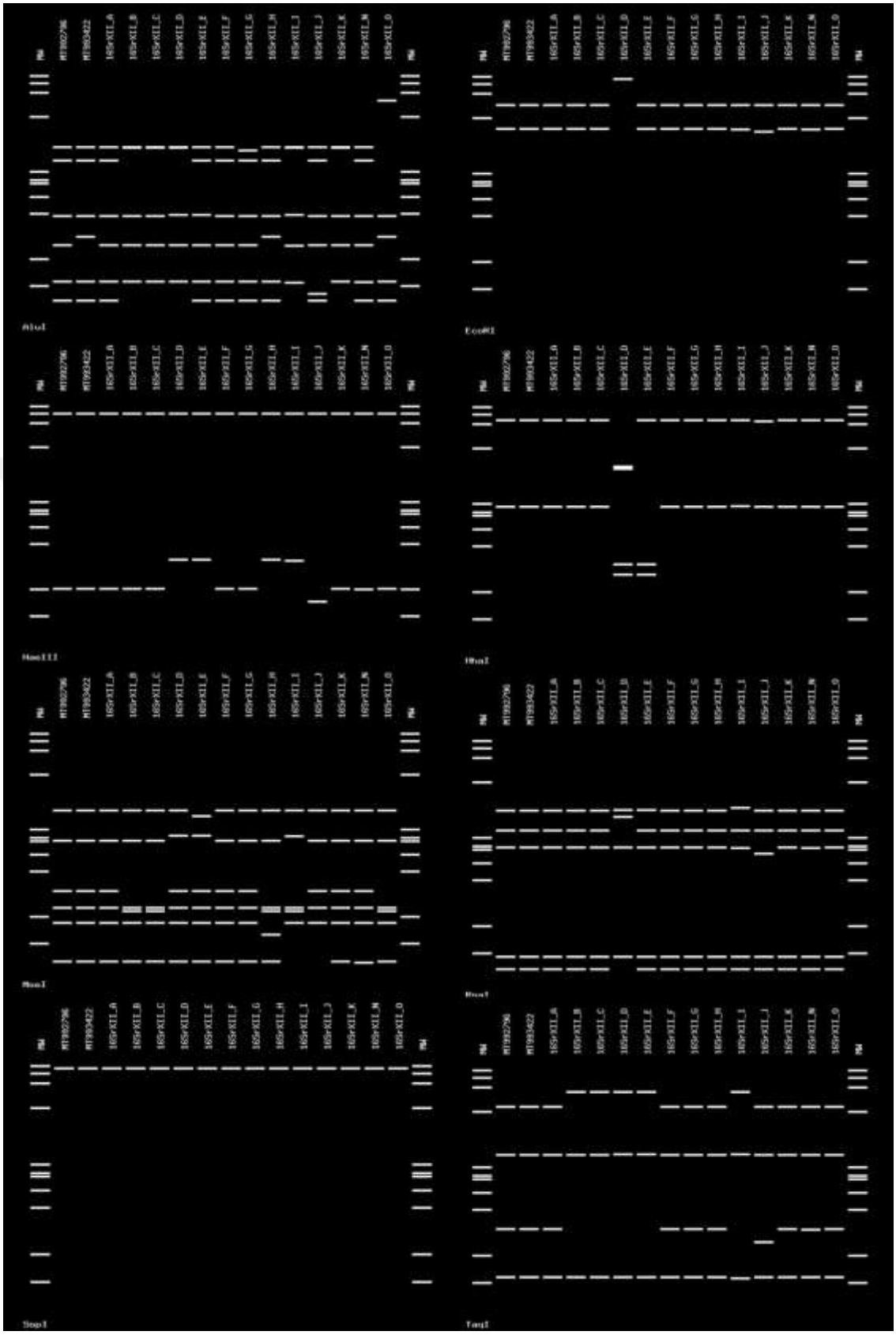
*Ülkemizde ilk kez bu çalışmada *Ca*. Phytoplasma trifolii tespit edilen türler.
** Dünyada ilk kez bu çalışmada Ca. Phytoplasma trifolii tespit edilen türler.



Şekil 4.12. RsaI enzimi ile biber (1), domates (2), fesleğen (3), susam (4), *Empoasca* sp. (5), *Exitianus capicola* (6), *Euscelidius* sp. (7), Delphacide (tanımlananmış tür-8) ve negatif kontrol (9) örnekleri ile RFLP çalışması (A); RsaI, AluI ve MseI enzimleri ile biber örneklerinde (1,2,3,4) RFLP çalışması (B). M: Marker: Hibrigen, 100 bp plus.



Şekil 4.13. Genbankasına yüklenen *Ca.* Phytoplasma trifolii (16SrVI) olarak tespit edilen örneklerin iPhyClassifier programında endonükleaz enzimleriyle kesimleri.



Şekil 4.14. Genbankasına yüklenen *Ca.* Phytoplasma solani (16SrXII) olarak tespit edilen örneklerin iPhyClassifier programında endonükleaz enzimleriyle kesimleri.

4.3.2.4. DNA Dizi Analizi (Sekans)

Çalışmada toplanan örneklerden F1/R0 ve F2n/R2 primer çiftleri kullanılarak pozitif bant elde edilen seçili 35 bitki ve böcek DNA'larına, BM Yazilim Danis. ve Lab. Sis. Ltd. Şti tarafından gen dizileme işlemi yapılmıştır. Dizileme yapılan örneklerden hem Chromas Pro 2.1.8 programında nükleotidler elde edilmiş hem de MEGA-X programı kullanılarak aynı örneğin forward, reverse ve baz dizilimleri karşılaştırılarak en doğru dizi analizi elde edilmiştir. Chromas Pro 2.1.8 programının kullanılmasıyla, programda forward ve reverse okumaları birleştirilerek uzun ve tek parça bir nükleotid dizisi oluşturulmuştur (Şekil 4.15).

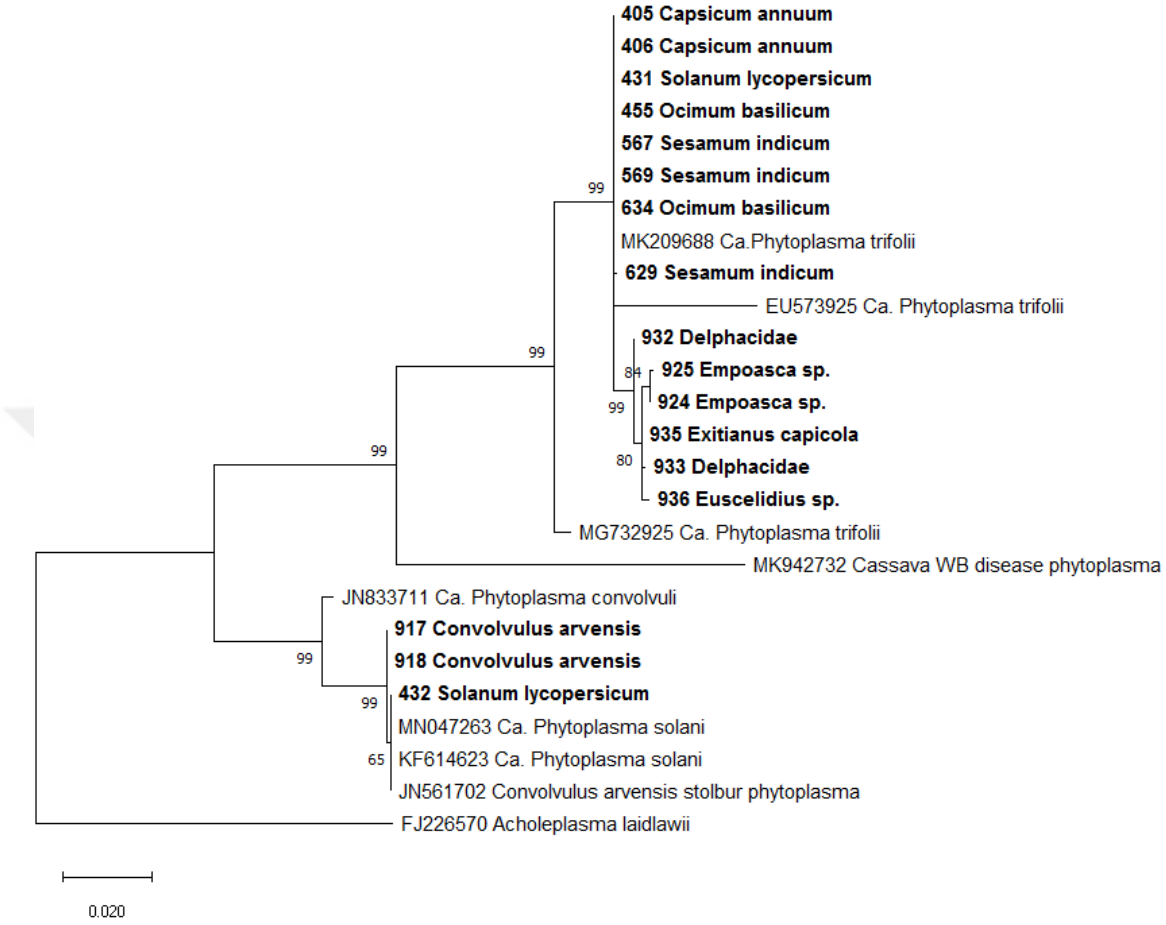


Şekil 4.15. ChromasPro 2.1.8 programında forward ve reverse okumalarının görüntüsü.

4.3.2.5. Filogenetik Analizler

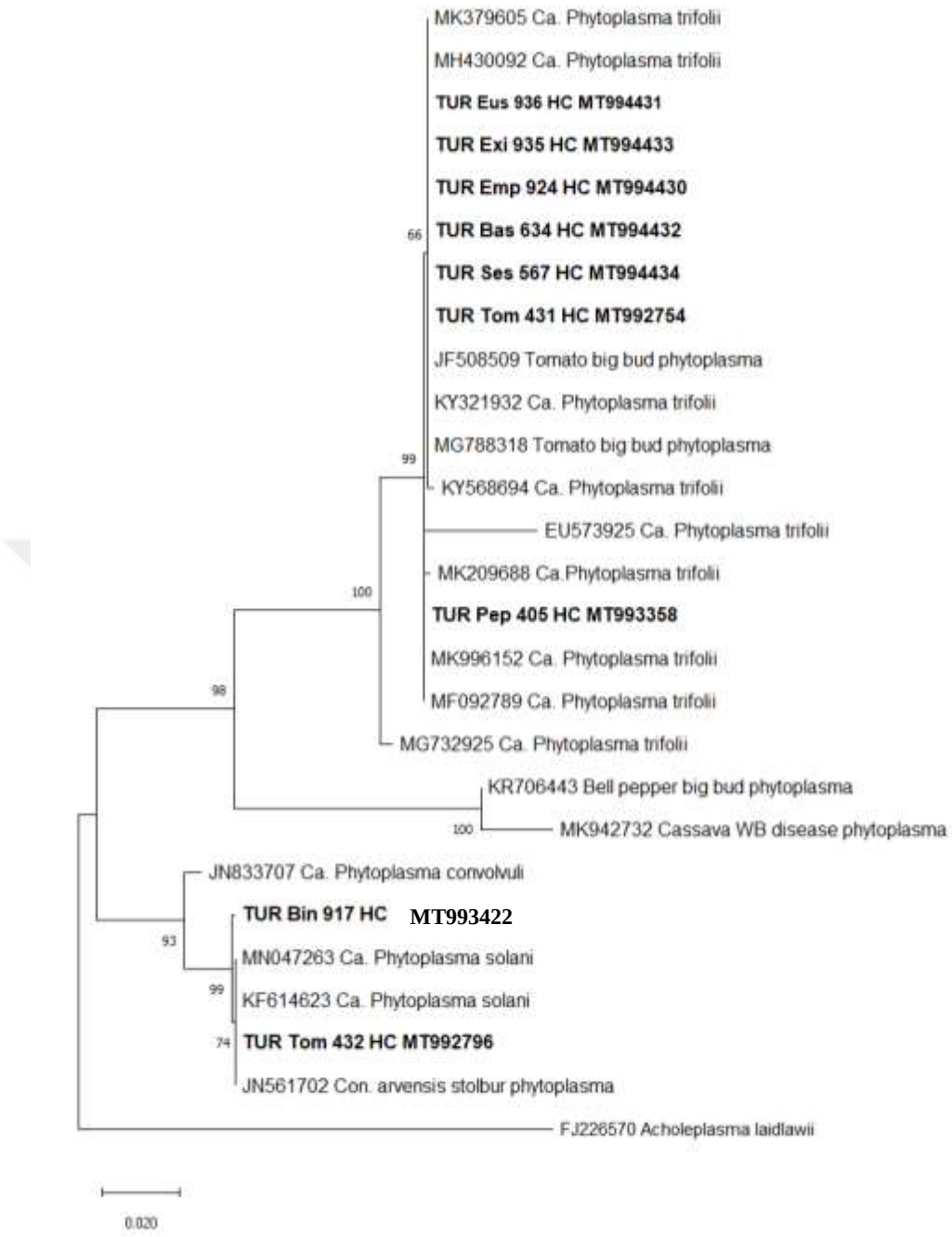
Gen dizisi yaptırılan 35 bitki ve böcek örneğin ChromasPro 2.1.8 ve MEGA X programı kullanılarak gen dizileri düzenlenmiştir. Örneklerin gen dizilimleri referans dizilerle de kıyaslanmıştır. Filogenetik analizde, *Candidatus* Phytoplasma trifolii (MG732925; MK209688; EU573925), Cassava witches'-broom disease Phytoplasma (MK942732), *Candidatus* Phytoplasma solani (MN047263; KF614623), *Candidatus* Phytoplasma convolvuli (JN833711), 'Convolvulus arvensis' stolbur Phytoplasma (JN561702) referans olarak kullanılmıştır. Tip dışı kontrol olarak *Acholeplasma laidlawii* (FJ226570) referans alınmıştır (Şekil 4.16). Yapılan bu çalışmada pozitif bulunan ve sekansa gönderilen örnekler Mega X programında temizlenenerek soy ağacı

elde etmede kullanılmıştır. Ayrıca bu örneklerden 1'er adet seçilerek Genbankası'na yüklenmiş ve yeniden soy ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Seçili bitki ve böcek örneklerinden elde edilen fitoplazma hastalıkları ile referans örneklerin MEGA-X programında elde edilen filogenetik ağacı. MK209688 (Yılmaz ve ark., 2019); EU573925 (Raj ve ark., 2009); MG732925 (Usta ve ark.,2018); MK942732 (Moonjuntha ve ark., 2019); JN833711 (Martini ve ark., 2012); MN047263 (Jakovljević ve ark., 2019); KF614623 (Adamovic ve ark., 2013); JN561702 (Bobev ve ark., 2013); FJ226570 (Volokhov, 2008).

Genbankası'na yüklenen biber (MT993358), susam (MT994434), domates (MT992754), fesleğen (MT994432), *Empoasca* sp. (MT994430), *Exitianus capicola* (MT994433), *Euscelidius* sp. (MT994431) türlerinde *Ca.* Phytoplasma trifolii; tarla sarmaşığı (MT993422) ve domates (MT992796) türlerinde *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.17. Seçili bitki ve böcek örneklerinden elde edilen ve Genbank kodları alınan örneklerle referans örneklerinin MEGA-X programında oluşturulmuş filogenetik ağacı.

Avrupa ve İsrail'de tarla sarmaşığında sarılık (Bindweed yellows) hastalığı yapan birçok fitoplazma etmeni (16SrI, 16SrII, l6SrX, l6SrIX, l6SrXII-A) bildirilmiştir (Marcone ve ark., 1997b; Seemüller ve ark., 1998; Langer ve Maixner, 2004; Bellardi ve Bertaccini, 2005; Fialová ve ark., 2009; Murolo ve ark., 2010; Dafny Yelin ve ark., 2015; Marchi ve ark., 2015; Mori ve ark., 2015). Son yıllarda İtalya, Sırbistan, Bosna-

Hersek ve Almanya gibi Avrupa ülkelerinde *Candidatus* Phytoplasma convolvuli olarak (l6SrXII-H) ifade edilen yeni bir fitoplazmanın tarla sarmaşığı sarılık hastalığının etmeni olarak rapor edilmiştir (Martini ve ark., 2012). Hatay'da da benzer belirtiler gösteren tarla sarmaşığı örneklerinde fitoplazma enfeksiyonu belirlenmiştir (Sertkaya ve ark., 2013). Yapılan bu çalışmada ise tarla sarmaşığı bitkilerinde *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilmiş olup Genbankası'na (Genbank no: MT993422) kaydı yapılmıştır.

Çizelge 4.5. Fitoplazma tespit edilen ve Genbank'a yüklenen türler ve Genbank kodları

Fitoplazmaların tespit edildiği materyal	**Genbank numaraları**	**Tespit edilen fitoplazma türü**
Biber	MT993358	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Domates	MT992754	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Domates	MT992796	*Ca.* Phytoplasma solani
Tarla sarmaşığı	MT993422	*Ca.* Phytoplasma solani
Fesleğen	MT994432	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Susam	MT994434	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Empoasca sp.	MT994430	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Euscelidius sp.	MT994431	*Ca.* Phytoplasma trifolii
Exitianus capicola	MT994433	*Ca.* Phytoplasma trifolii

4.3.3. Serolojik Çalışmalar

Sebzelerde fitoplazma hastalıklarının neden olduğu belirtiler virüslerin neden olduğu belirtilerle karıştırılabilmektedir. Sarılık, cadısüpürgesi, bodurluk ve yapraklarda şekil bozukluğu gibi belirtilerin çoğuna fitoplazmalar ve virüsler sebep olabilmektedir. Her iki etmenin de aynı bitkide birlikte bulaşık olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Biberlerde karışık enfeksiyon olarak 16SrIII gruba ait fitoplama ile tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) ve tomato Chino la Paz virus (ToChLPV) Meksika'da bulunmuştur. Enfekteli bitkilerin tipik olarak yapraklarında sarılık, yaprakların üzerinde nekrotik alanlar, kısa boğumaraları, renk açılmaları, yaprakların kalınlaşması gibi belirtileri sergilediği bildirilmiştir (Lebsky ve ark., 2011). Hatay ilinde biber alanlarında 2013-2015 yıllarında biber sarılığı hastalığı (yellowing disease)'na neden olan virüslerin araştırıldığı bir çalışmada birden fazla etmenin bu hastalığa neden olduğu, pancar tepe kıvırcıklık virüsü (beet curly top virus: BCTV), begomovirusler ve fitoplazmaların biberde bu hastalığa neden olabileceği bildirilmiştir (Özdağ ve Sertkaya,

2017). Hindistan'da, yapraklarda kıvrılma, küçük yapraklılık, bodurlaşma ve cadısüpürgesi belirtileri gösteren zinnia (*Zinnia elegans*) bitkilerinde karışık enfeksiyon olarak '*Ca.* Phytoplasma asteris' (16SrI-B subgroup) fitoplazması ve domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (TYLCV) rapor edilmiştir (Rihne ve ark. 2020).

Yapılan bu çalışmada fitoplazma ile enfekteli olduğu düşünülen bitki örnekleri Solanacea familyasına ait türlerde enfeksiyon oluşturduğu bilinen AMV (alfalfa mosaic virus), PVY (potato virus Y), PLRV (potato leaf-roll virus), PVX (potato virüs X), BCTV (beet curly top virus) ve TSWV (tomato spotted wilt virus) gibi önemli virüslere karşı DAS-ELISA (Double antibody sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile test edilmiştir. Testleme yapılan 48 örnekten 2 tanesi hem CMV hem de 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii karışık enfeksiyon olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, ülkemizde biberde fitoplazma (*Ca.* Phytoplasma trifolii) ve virüs (CMV) karışık enfeksiyonu ilk kez belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hatay ilinde biber, hem tarlada hem de serada üretilmektedir. Örtüaltı yetiştiricilik, tarla koşullarına göre daha iyi kontrol edilebilir olduğu için biber bitkilerinde seralarda hastalık ve zararlıların yönetimi daha etkili yapıldığından açık alan yetiştiriciliği pek çok hastalık ve zararlının hedefi halindedir.

Fitoplazma ve virüs hastalıkları ile bulaşık olduğu düşünülen biber bitkilerinde her iki hastalığın da meydana getirdiği belirtilere benzer belirtiler gözlenmiştir. Virüs hastalıkları fitoplazma hastalıklarından farklı olarak yapraklarda kırışıklık, mozaik lekeler gibi belirtilere neden olurken fitoplazma hastalıkları biber bitkilerinde genel sarılık, bodurlaşma, çalı görünümü, yaprakların kaşık şeklini alması ve yukarı doğru yönelmesi, çiçek oluşumlarının engellenmesi, tomurcukların irileşmesi ve yeşillenmesi ile yukarı yönelmesi gibi belirtilere neden olmaktadır. Arazi içerisinde ya da kenarlarında bulunan diğer türlerde gözlenen belirtiler ise patlıcan bitkilerinde içi boş, kocaman mevye sap ve çanak yaprak oluşumu; fesleğen bitkilerinde başaklarda çiçek saplarının uzaması ve çiçeklerin yeşillenmesi belirtileri; domates bitkilerinde iri tomurcuk ve yeşillenmiş çiçek yapıları, çiçeklerin yukarı yönelmesi ile çalı görünümünü alması, yapraklarda ve çiçeklerde morarmalar; susam bitkilerinde hem yapraklarda küçülme hem de çiçek yapılarının yeşillenmesi ile yaprak şeklini alması ve kapsül oluşumunun engellenmesi; tarla sarmaşığı bitkilerinde yapraklarda küçülme, sarılık, çoklu sürgün oluşumları; köpek üzümü ve sütleğen bitkilerinde ise genel morarma şeklinde olmuştur.

Yapılan belirtiye dayalı gözlemlere göre biber bitkilerinde belirtiler en çok 2016 yılında yoğun olarak gözlenmiş (%0,5-3), 2017 ve 2018 yıllarında ise biberlerde belirti nadiren gözlenmiş ancak biber arazilerindeki susam ve fesleğen bitkilerinde her 3 yılda da belirti oranı yüksek bulunmuştur (%30). Bu gözlemlere göre hastalığın böcekler tarafından önce susam bitkilerine bulaştırıldığı daha sonraları hastalığı biber bitkilerine taşındığı düşünülmektedir. Bu durum, vektör böceklerin, beslenmek için susamı bibere göre daha çok tercih edebileceğini de düşündürmektedir. Dolayısıyla susam bitkilerinden çekilen böceklerden *Empoasca* sp. ve *Cicadulina* sp. olduğu tahmin edilen canlı türler kontrollü koşullarda Cezayir menekşesi bitkilerine salınmış ve salım yapılan 4 bitkide fitoplazmalara özgü belirtiler gözlenmiş, yapılan moleküler çalışmalar sonucu

bitkiler fitoplazma ile bulaşık bulunmuştur.

Hatay'da biber üreticileri evsel ihtiyaçlarının karşılanması amacıyla arazinin bir kısmında domates, patlıcan, acur (hıtta), hıyar, kabak, susam gibi sebzeleri de yetiştirmektedirler. Ancak bu türler çeşitli hastalık ve zararlı türlere konukçu olabilmektedir. Nitekim yapılan surveylerde özellikle fitoplazma hastalık belirtilerinin en çok görüldüğü bitkilerin susam ve fesleğen olduğu görülmüştür. Ayrıca hastalığı taşıyan vektör böceklerin arazi içerisindeki susam bitkilerinde daha yoğun popülasyonda olduğu fark edilmiştir. Susam bitkilerinde ise biber bitkilerinde tespit edilen fitoplazma hastalığının varlığı ve enfeksiyon oranının yüksek bulunması vektör türlerin hastalığı enfekteli susam bitkilerinden kazanıp diğer kültür bitkilerine taşıdığını düşündürmektedir. Biber arazilerindeki yabancı otlar da hem hastalık hem de zararlılara konukçu olmaktadır. Özellikle çok yıllık olan tarla sarmaşığının fitoplazma hastalıklarının sonraki yıllara aktarılmasında rolü büyüktür. Bu bakımdan tarla sarmaşığı ile mücadele, hastalığın yayılmasını önlemede son derece önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda tarla sarmaşığı bitkilerinde, biberde ve de diğer sebze türlerinde de sorun olabilecek fitoplazma hastalıklarının tespit edilmiş olması biber üretimi ve sebze yetiştiriciliği açısından üretimi tehdit eden bir unsur olarak düşünülmektedir.

Çalışma süresince hastalık berlitisi gösteren 145 adet biber, 25 adet susam, 5 adet tarla sarmaşığı, 5 adet domates, 3 adet fesleğen bitkisinde pozitif bantlar elde edilmiştir. Patlıcan, köpek üzümü, horoz ibiği, sütleğen bitkilerinde ise hastalık tespit edilememiştir.

Çalışmada fesleğen ve susam örneklerinde 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii tespit edilirken tarla sarmaşığı bitkilerinde 16SrXII'nci gruba ait *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilmiştir. İri tomurcuk belirtisi gösteren domates bitkilerden alınan ve tesadüfi seçilerek sekansa gönderilen 2 örnekten 1'inde 16SrXII'nci gruba ait *Ca.* Phytoplasma solani, diğerinde ise 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii tespit edilmiştir. Nitekim yapılan çalışmalarda domateslerdeki iri tomurcuk hastalığına farklı coğrafyalarda farklı gruba ait fitoplazmaların neden olduğu bildirilmiştir. Bunlar, İran'da aster yellows (16SrI), Çin ve Hindistan'da paenut witches' broom (16SrII), Mauritius'da elm yellows (16SrV), Amerika'da clover proliferation (16SrVI) ve Rusya'da stolbur (16SrXII) olarak rapor edilmiştir (Gungoosingh-Bunwaree ve ark.,

2007; Ember ve ark., 2011; Xu ve ark., 2013; Sichani ve ark., 2014; Kumari ve ark., 2018).

Fitoplazma hastalıklarının dünya genelinde, patlıcanda %40, domateste %60, biberde %93, patateste %30-80 ve hıyarda %100 verim kaybına neden olduğu bildirilmektedir (Bogoutdinov ve ark., 2008; Navratil ve ark., 2009; Rao ve Kumar, 2017). Hastalığın taşınmasında önemli etken ise Cicadellidae, Fulgoromorpha ve Psyllidae grubu içerisindeki yaprak pireleri, bitki pireleri ve psyllid vektör böcekleridir. Hastalığın taşınmasında sorumlu en geniş grup ise Cicadellidae familyasına aittir. Arazi gözlemlerine göre Cicadellidae familyasına ait böcek türlerinin popülasyonlarının üretim sezonu sonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. D-VAC böcek toplama aleti ile toplanan böcek türleri arasında en fazla bulunan tür *Empoasca* sp. türleri olurken, bunu *Cicadulina bipunctata* ve *Psammotettix* sp. türleri takip etmiştir. Diğer belirlenen türler arasında *Exitianus capicola*, *Euscelidius* sp. ve *Balclutha hebe* bulunmakla beraber Delphacidae olduğu düşünülen türler teşhis edilememiştir.

Arazi çalışmaları sırasında hastalık belirtili bitkilerden 50 adet biber, 2 adet fesleğen ve 1 adet domates bitkisi köklü olarak getirilmiş ve saksılara dikilmiştir. Bitkiler yaklaşık 2 ay canlı tutulabilmiştir. Bu bitkiler doku aşılaması, küskütle taşıma çalışmaları ve diğer laboratuvar çalışmaları için kullanılmıştır. Aşılamalarda T ve yonga göz aşıları tercih edilmiş ve hastalığı taşımada başarılı bulunmuştur. Aşılama çalışmalarında en başarılı sonuç, Cezayir menekşesi üzerine yapılan susam ve fesleğen aşılarında elde edilmiştir. Susamla aşılanan 4 adet, fesleğenle aşılanan 1 adet Cezayir menekşesi bitkisinde belirti gözlenmiş ve pozitif bant elde edilmiştir.

Fitoplazma hastalıklarının test bitkilerine doğada bulaşmasını sağlamak amacıyla 2016-2018 yılları arasında her yıl ortalama 150 adet Cezayir menekşesi biber alanlarına yerleştirilmiştir. Sezon sonunda arazilere dikilen bitkilerin sadece 150 tanesi geri alınabilmiş olup yapılan çalışmalarda geri alınabilen bitkilerde herhangi bir bulaşmanın olmadığı görülmüştür.

Fitoplazma hastalıklarının tohumla taşınmadığı yıllarca tartışma konusu olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda kolza, domates ve kanola gibi bitkilerde fitoplazmaların tohumla taşınabildiği bildirilmiştir (Calari ve ark., 2011; Satta ve ark., 2019). Bu çalışmada da, tohum oluşturmuş fakat sonradan hastalık bulaşmış Cezayir menekşesi bitkilerinden elde edilen tohumlar kontrollü koşullarda ekilmiştir. Elde

edilen fideler sağlıklı görünümde olup ekilen tohumdan daha az çimlenme görülmüştür. Gelişen fidelerden yapılan PCR sonuçlarına göre fitoplazma tohumdan gelişen bitkilerde tespit edilememiştir.

Fitoplazmaların ön tespiti olarak kullanılan DNA boyama (DAPI: 4'-6-diamidino-2-phenylindole) yöntemi ile bu çalışmada fitoplazma ile enfekteli olduğu düşünülen, sararma, normal boyutundan daha küçük ve zayıf yaprak oluşumu, çalılaşma, çiçeklerin yeşillenmesi ve iri tomurcuk gibi belirtiler gözlenen bitki örneklerinde DNA boyama yöntemiyle fitoplazmaların varlığı araştırılmıştır. Elde edilen şüpheli bitki örneklerinde DNA boyama sonrası floresan mikroskopi çalışmaları ile fitoplazmalara özgü yapılar belirlenmiştir.

Nükleotid dizisi yapılan biber, domates, susam, fesleğen, tarla sarmaşığı gibi bitki örneklerinden ve *Empoasca* sp., *Exitianus capicola*, *Euscelidius* sp. ve türü tespit edilememiş Delphacidae familyasına ait böcek örnekleri MEGA-X programında analiz edilmiş, NCBI Genbank'asına yüklenmiş ve iPhyClassifier (Zhao ve ark, 2009) programında enzim kesimleri yapılmıştır.

Çalışmada hastalık tespit edilen örneklerin nükleotid dizilimleri referans dizilerle kıyaslanmıştır. Soy ağacını belirlemede, *Candidatus* Phytoplasma trifolii (MG732925; MK209688; EU573925), Cassava witches'-broom disease Phytoplasma (MK942732), *Candidatus* Phytoplasma solani (MN047263; KF614623), *Candidatus* Phytoplasma convolvuli (JN833711), 'Convolvulus arvensis' stolbur Phytoplasma (JN561702) referans olarak kullanılmıştır. Tip dışı kontrol olarak Acholeplasma laidlawii (FJ226570) referans alınmıştır. Genbankası'na yüklenen biber (MT993358), susam (MT994434), domates (MT992754), fesleğen (MT994432), *Empoasca* sp. (MT994430), *Exitianus capicola* (MT994433), *Euscelidius* sp. (MT994431) türlerinde *Ca.* Phytoplasma trifolii; tarla sarmaşığı (MT993422) ve domates (MT992796) türlerinde *Ca.* Phytoplasma solani tespit edilmiştir.

Sebzelerde fitoplazma hastalıklarının neden olduğu belirtiler virüslerin neden olduğu belirtilerle karıştırılabilmektedir. Sarılık, cadısüpürgesi, bodurluk ve yapraklarda şekil bozukluğu gibi belirtilerin çoğuna fitoplazmalar ve virüsler sebep olabilmektedir. Her iki etmenin de aynı bitkide birlikte bulaşık olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Lebsky ve ark., 2011; Özdağ ve Sertkaya, 2017; Rihne ve ark. 2020). Yapılan bu çalışmada da fitoplazma ile enfekteli olduğu düşünülen bitki örnekleri

Solanacea familyasına ait türlerde enfeksiyon oluşturduğu bilinen AMV (alfalfa mosaic virus), PVY (potato virus Y), PLRV (potato leaf-roll virus), PVX (potato virüs X), BCTV (beet curly top virus) ve TSWV (tomato spotted wilt virus) gibi önemli virüslere karşı DAS-ELISA (Double antibody sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile test edilmiştir. Testleme yapılan 48 örnekten 2 tanesi hem CMV hem de 16SrVI grubuna ait *Ca.* Phytoplasma trifolii karışık enfeksiyon olarak belirlenmiştir.

Fitoplazmaların mücadelesine yönelik birçok farklı yaklaşımlar bulunmakla birlikte hastalıkla mücadelede tek başına etkili olabilecek bir mücedele yöntemi ne yazıkki bulunamamıştır. Vektör böceklerle mücadele hastalığın yayılmasını azaltabilmektedir. Ancak arazi koşullarında tüm vektör böceklerin elemine edilmesi mümkün olamamakla birlikte aşırı ilaçlama da hem ekonomik hem de sağlıklı olmayacaktır. Arazi koşullarında hastalık belirtisi gösteren bitkilerin eradike edilmesi hastalığın yayılmasını önemli ölçüde azaltabilmektedir. Bölgemizde biber fidelerinin üretimi maalesef kontrollü koşullarda yapılmamakta, tarla kenarlarında oluşturulan fideliklerde fide üretimi yapılmaktadır. Bu da patojeni bünyesinde barındıran vektör böceklerin beslenmeleri sırasında hastalığı sağlıklı bitkilere henüz fide döneminde iken bulaştırmalarına olanak sağlamaktadır. Hastalık ayrıca çok yıllık yabancı otlarda da uzun yıllar kalabilmekte ve bu otlar tarla koşullarında ilk hastalık kaynağı olarak rol oynamaktadır.

Bu çalışma ile;

-Hatay ili biber alanlarında *Ca.* Phytoplasma trifolii ve *Ca.* Phytoplasma solani fitoplazmaların varlığı belirlenmiştir.

-Susam, domates, fesleğen türlerinin *Ca.* Phytoplasma trifolii fitoplazmasının, tarla sarmaşığı ve domates bitkilerinin *Ca.* Phytoplasma solani fitoplazmasının doğal konukçusu olduğu hastalığın yayılmasında rol oynadığı,

-Biber bitkilerinde fitoplazma ve virüs enfeksiyonlarının aynı biber bitkisini birlikte hastalandırabileceği anlaşılmıştır.

-Biber arazilerinden yakalanan *Exitianus capicola, Cicadulina bipunctata, Euscelidius* sp., *Anaceratagallia laevis, Psammotettix* sp. *Empoasca* sp., *Balclutha hebe* gibi böcek türlerinin fitoplazmaları tarla içerisinde bitkiden bitkiye taşıdığı gibi diğer biber alanlarına ve farklı türlere taşınmasında önemli olabileceğini düşündürmüş, *Euscelidius* sp. ve *Empoasca* sp., türlerinde ülkemizde, *Exitianus capicola* böcek türünde dünyada

ilk kez *Ca.* Phytoplasma trifolii belirlenmiştir. Ayrıca Hatay ilinde domates bitkilerinde de *Ca.* Phytoplasma trifolii ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

-Susam ve fesleğen bitkilerinde *Ca.* Phytoplasma trifolii ilk kez bu çalışmada tanısı yapılarak Genbankası'na kaydedilmiştir.

Sonuç olarak fitoplazma hastalıkları ile mücadele edebilmek için tek bir yol izlemenin başarılı olmayacağı kabul edilmeli ve tüm önlemler alınarak hastalığın bulaşması engellenmelidir. Bu bağlamda alınabilecek bazı pratik önlemler şu şekilde sıralanabilir;

-Hastalık etmeninin tohumla taşınabileceği düşünülerek hastalıktan ari sertifikalı tohumluk kullanılması,

-Fide üretiminin böcek girişini engelleyen kontrollü fideliklerde yapılması,

-Fidelerin araziye dikimini takiben vektör mücadelesinin üretim sezonu boyunca düzenli olarak sürdürülmesi,

-Arazide enfekteli olduğu düşünülen bitkilerin eradikasyonu,

-Yabancı otların da hastalıklara konukçu olduğu unutulmayıp yabancı ot mücadelesinin mutlaka yapılması,

-Özellikle iç içe geçmiş ya da birbirini takiben yapılan sebze üretimlerinden vazgeçilip münavebe olabilecek türlerin yetiştiriciliğinin yapılması hastalığın türden türe, bitkiden böceğe, böcekten bitkiye aktarılmasının önünü kesebileceği düşünülmekte ve bu hususların dikkate alınması tavsiye edilmektedir.

Fitoplazma hastalıklarının yayılmasını engelleyecek önlemler virüs hastalıkları için de geçerlidir. Virüs hastalıkları da hem tohumla hem de vektör böcek ve küskütle bitkiden bitkiye taşınabilmektedir. Hatay ilinde yetiştiriciliği yapılan Samandağ biberi, Hatay biberi gibi bölgede önemli derecede tercih edilen bu türlerde virüs ve fitoplazma hastalıkları gün geçtikçe artmaktadır. Bunun başlıca nedeni ise tohumların her yıl bölgeden hasat edilen ürünlerden kontrolsüz olarak alındığı kanısıdır. Son olarak virüs ve fitoplazma hastalıkları ile mücadelede için, temiz ve sertifikalı tohumlukların kullanılması ve fidelerin kontrollü koşullarda üretilerek üreticilere dağıtılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Adamovic, D., Djalovic, I., Mitrovic, P., Kojic, S., Pivic, R. and Josic, D., 2014. First Report on Natural Infection of Paeonia tenuifolia by '*Candidatus* Phytoplasma solani' in Serbia. **Plant Dis.** 98 (4): 565.

Al-Subhi, A. M., Al-Saady, N. A., Khan. A. J., and Deadman, M. L., 2011. First Report of a Group 16SrII Phytoplasma Associated with Witches'-Broom of Eggplant in Oman. **Plant Disease** 95(3):360-360.

Amaral- Mello A.P., Eckstein, B., Flores, D., Kreyci, P.F., Bedendo, I.P., 2011. Identification by computer-simulated RFLP of Phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. **Int J Syst Evol Microbiol**. 61(Pt 6):1454-61.

Andrade, N.M. and Arismendi, N.L., 2013. DAPI staining and fluorescence microscopy techniques for Phytoplasmas. **Methods Mol Biol**., 938:115-21.

Anonim, 2015. Hatay ili tarım alanlarıyla ilgili T.C Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hatay İl Müdürlüğü 2013 yılı yılsonu brifingi. http://hatay.tarim.gov.tr/Belgeler/Kutu%20Men%C3%BCs%C3%BC/2013%20y%C4%B1lsonu%20Brifingi.pdf (Erişim tarihi: 30.10.2015)

Anonim, 2020. https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr (Erişim tarihi: 03.12.2020).

Anonimous, 2017. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize (Erişim tarihi: 26.12.2019).

Anonymous, 1996. EPPO/CABI. Potato purple-top wilt Phytoplasma, In:, Quarantine pests for Europe(Smıth I. M., Mcnamara D. G., Scott P. R,Holddernessm., Eds).- **CABI**, Wallingford, UK. pp. 1-5.

Anonymous, 2013. http://faostat3.fao.org/home/E (Erişim tarihi: 13.07.2015).

Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R. and Carrillo, R., 2010. Presence Of A Phytoplasma Associated With Witches' Broom Disease In Ugni Molinae Turcz. And Gaultheria Phillyreifolia (Pers.) Sleumer Determined By Dapı, Pcr, And Dna Sequencıng. **Chilean Journal Of Agricultural Research** 70(1):26-33.

Arocha, Y., Plata , G., Franco , J., Maín , G., Veramendi , S., Lazcano , F., Crespo , J.L., Lino , V., Calderón , C., Llerena , R., Andrew , R., Antezana , O., Gutiérrez , A., Coca M. and Boa, E., 2009. First report of a 16SrIII Phytoplasma (X-disease group) affecting bell pepper, strawberry (frutilla), Schinus molle and Arracacia xanthorrhiza in Cochabamba, Bolivia. **New Disease Reports**, 20:2.

Arocha, Y., Piñol, B., Picornell, B., Almeida, R., Jones, P. and Boa, E., 2006. Basil little leaf: a new disease associated with a Phytoplasma of the 16SrI (Aster Yellows) group in Cuba. **Plant Pathology**, 55: 822.

Askari Seyahooei, M., Hemmati, C., Faghihi, MM. and Bagheri, A., 2017. First report of a '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'-related strain associated with Suaeda aegyptiaca and its potential vector in Iran. **Australas Plant Dis. Notes** 12(1):24.

Bellardi, M.G. and Bertaccini, A., 2004. **Malattia delle piante officinali- Virosi e fitoplasmosi.** Edizioni I'Informatore Agrario, Verona, Italia.

Berger, J., Schweıgkofler, W., Kerschbamer, C., Roschatt, C., Dalla-Vıa J. and Baric S., 2009. Occurrence of Stolbur Phytoplasma in the vector Hyalesthes obsoletus, herbaceous host plants and grapevine in South Tyrol (Northern Italy). Vitis 48 (4): 185–192.

Bertaccini, A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. **Frontiers in Bioscience,** 12: 673-689.

Bertaccini, A., and Lee, I.-M., 2018. "Phytoplasmas: an update,". in: Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I, in Characterization and Epidemiology of Phytoplasma-Associated Diseases. Phytoplasma**s: Plant Pathogenic Bacteria-I,** 1-29.

Bobev, S. G., De Jonghe K., and Maes, M.,2013. First Report of *Candidatus* Phytoplasma solani on Blackberry (Rubus fruticosus) in Bulgaria. **Disease Notes,** 97 (2):282.

Bogoutdinov, D. Z., Valyunas, D., Navalinskene, M. and Samuitene, M., 2008. About specific identification of Phytoplasmas in solanaceae crops. **Agric. Biol.** 1: 77–80.

Bosland, P.W., (1994). **Chiles: History, Cultivation and Uses Spices**. (Ed.

G.Charalambous). Herbs and Edible Fungi, Elseiver Science, B.V. New Mexico.

Březíková, M., Linhartová, S., 2007. First report of potato stolbur Phytoplasma in hemipterans in southern Moravia. **Plant Protect Sci.,** 43(2): 73–76.

Bricker, J.S. and Stutz, J.C., 2004. Phytoplasmas associated with ash decline. **J. Arboric**. 30:193-199.

Calari A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Sakalieva, D., Mori, N., Duduk, B., Bertaccini, A., 2011. Molecular evidence of Phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. **Bulletin of Insectology** 64: 157-158.

Canik, D. and Ertunc, F., 2007. Distribution and molecular characterization of apple proliferation Phytoplasma in Turkey. **Bulletin of Insectology,** 60: 335-336.

Castro, S., and Romero, J., 2002. The association of clover proliferation Phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. **Journal of Phytopathology**, 150: 25–29.

Chang, C.J., 1998. Pathogenicity of aster yellows Phytoplasma and Spiroplasma citri on periwinkle. **Phytopathology**, 88:1347-1350.

Chiykowski, L.N., 1965. A yellows-type virus of Alsike Clover in Alberta. **Canadian Journal of Botany**, 43(5), 527-536. doi: 10.1139/b65-058.

Choueiri, E., Salar, P., Jreijiri, F., El Zammar, S., Massaad, R., Abdul-Nour, H., Bové, J-M., Jean-Luc Danet, J-L. and Foissac, X. (2007). Occurrence and distribution of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. **European Journal of Plant Pathology**, 118: 411–416.

Clark, M.F., and Adams, A.M., 1977. Characteristics of the 8 16 2microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol**. 34: 475-483.

Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. and Oropeza, C., 2003. In situ PCR detection of Phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. **Mol. Plant Pathol**. 4: 99-108.

Çağlar, B. K., Elbeaino, T., Küsek, M., Pehlivan, D., Fidan, H. and Portakaldalı, M., 2010. Stolbur Phytoplasma Infections in Potato and Tomato Plants from Different Locations in Turkey. **J. Turk. Phytopath.,** 39 (1-3): 1-8.

Çalı, S., Özdemir, Y. ve Kalkandelen, A., 1989. Ankara'da Domateslerde Görülen Stolbur Hastalığı Üzerinde Araştırmalar. **Bitki Koruma Bülteni**. 29 (1-2): 85-108.

Çıtır, A., 1985. Preliminary investigation of potato diseases caused by MLOs in Erzurum region. **Journal of Turkish Phytopathology**, 14: 53-63.

Dafny Yelin, M., Orbach, D., Zahavi, T., Sharon, R., Brudoley, R., Shachar Barkai, R., Tomer, M., Sofer-Arad, C., Weintraub, P., Mawassi, M., and Naor, V., 2015. The source plant for Phytoplasmas in the Israeli vineyards is still a mystery. **Phytopathogenic Mollicutes**, 5(1-Supplement): 73-74.

Dann, O., Bergen, G., Demant, E. and Volz, G., 1971.Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. **Ann. Chem**., 749, 68.

Das, A.K. and Mitra, D.K., 2004. Detection of brinjal little leaf Phytoplasma in situ by light and fluorescence microscopy. **Ind. Phytopathol.,** 57: 242–244.

Deng, S. and Hiruki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from ulturable and nonculturable Mollicutes. **J Microbiol Methods**, 14: 53–61.

Deng, S. and Hiruki, C., 1991. Localisation of Pathogenic Mykoplasmalike Organisms in Plant Tissue Using in situ Hybridization. **Proc. Japan Acad**. 67, 197-202.

DeWitt, D. and Gerlach, N., 1990. **The whole chile pepper book**.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H., 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn,** 33: 259–266.

Doyle, J.J. and Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: p.13-15.

Eken, N.İ. and Mavi, K., 2016. Çan Biberinde (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) Meyve Olgunluk Dönemleri ile Tohum Gelişimi ve Kalitesi Arasındaki İlişkilerin Belirlenmesi. **Tarım Bilimleri Dergisi**, 22: 69-76.

El-Banna, O.H.M., Mikhail, M.S., Farag, A.G. and Mohammed, A.M.S., 2007. Detection of Phytoplasma in tomato and pepper plants by electron microscopy and molecular biology based methods. **Egypt J. Virol.**, 4: 93–

111.

Ember, I., Acs, Z., Munyaneza, J.E., Crosslin, J.M. and Kolber, M., 2011. Survey and molecular detection of Phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. **Eur. J. Plant Pathol.**, 130: 367–377.

Faghihi M.M., Taghavi, S.M., Safaei, A., Siampour , M. and Modarres-Najafabadi, S.S.,2016. First report of a Phytoplasma associated with bell pepper big bud disease in Iran. **New Disease Reports.**, 33: 15.

Favali, MA., Fossati, F., Toppi, LS., and Musetti, R., 2008. Catharanthus roseus Phytoplasmas. In: Harrison NA, Rao GP, Marcone C (Eds.) **Characterization, Diagnosis and Management of** Phytoplasma**s**. Houston, Texas. Studium Press LLC. pp. 195-218.

Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J.L.,Šafárová, D., Foissac, X., and Navrátil, M., 2009.Genetic variability of stolbur Phytoplasma in annualcrop and wild plant species in south Moravia. **Journal of Plant Pathology**, 91: 411–416.

Flower, C.E., Hayes-Plazolles, N., Slavicek, J.M. and Rosa, C., 2018. First Report of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'-Related Strain of 16SrVI-A Phytoplasma Subgroup, Associated with Elm Yellows Disease in American Elm (Ulmus americana L.) in Ohio, U.S.A. **Plant Disease**, 102(2): 438.

Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, M. and Boudon-Padieu, E., 2001. A new natural planthopper vector of stolbur Phytoplasma in the genus Pentastiridius (Hemiptera: Cixiidae) **European Journal of Plant Pathology** 107: 263–271.

Girsova, N. V., Bottner-Parker, K. D., Bogoutdinov, D. Z., Kastalyeva, T. B., Meshkov, Y. I., Mozhaeva, K. A., Lee IngMing, 2017. Diverse Phytoplasmas associated with leguminous crops in Russia. **European Journal of Plant Pathology,** 149(3), 599-610.

Golino, D. A., Oldfield, G. N., Gumpf, D. J., 1989. Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. **Plant Disease,** 73(10), 850-854.

Gopala, Ekta Khasa, Ashutosh Rao, Madhupriya, Rao, G. P., 2018. Molecular characterization of 'Clover proliferation' Phytoplasma subgroup-D (16SrVI-

D) associated with vegetables crops in India. **Physiology and Molecular Biology of Plants,** 24(2), 203-210.

Green, M.J., Thompson, D.A. and MacKenzie D.J., 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of Phytoplasmas by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, 83: 482-485.

Gundersen, D.E. and Lee, I.M., 1996. Ultrasensitive detection of Phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathol Mediterr**., 35:144–151.

Gungoosingh-Bunwaree, A., Bertaccini, A. and Benimadhu, S.P., 2007. Presence of Phytoplasma infections in tomato plants in Mauritius. **Bull. Insectol.,** 60: 151–152.

Harling, R., Arocha, Y., Harju, V., Tobing, C., Boa, E., Kelly, P. and Reeder, R., 2009. First report of 16SrII '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' infecting chilli and tamarillo in Indonesia. **Plant Pathology**, 58 (4): 791.

Harrison, B.D. and Roberts, I.M., 1969. Association of mycoplasma-like bodies with potato witches' broom disease from Scotland. **Ann. Appl. Biol.**, 63: 347–349.

Hemmati, C., Nikooei, M. and Pasalari, H., 2018. Cota tinctoria and Orosius albicinctus: A new plant host and potential insect vector of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'. **Australasian Plant Disease Notes** 13, 13. https://doi.org/10.1007/s13314-018-0298-1

Hiruki, C., Wang Keri, 2004. Clover proliferation Phytoplasma: '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54(4), 1349-1353.

Hogenhout, A.S. and Music, M.S., 2010. Phytoplasma Genomics, from Sequencing to Comparative and Functional Genomics- What Have We Learnt? Phytoplasma**s Genoms, Plant Hosts and Vectors**, 19-37.

Hosseini, P., Bahar, M., Madani, G. and Zirak, L. 2011. Molecular characterization of Phytoplasmas associated with potato purple top disease in Iran. **J. Phytopathol.**, 159 (4): 241–246.
https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/full_html/2020/02/bioconf_vizr2020_00025/bioconf_vizr2020_00025.html

IRPCM, 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1243–1255.

Ishiie, T., Doi, Y., Yora, K. and Asuyama, H., 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn,** 33: 267–275.

Jakovljević, M., Jović, J., Krstić, O., Mitrović, M., Marinković, S., Toševski , I. and Cvrković ., T, 2019. Diversity of Phytoplasmas identified in the polyphagous leafhopper Euscelis incisus (Cicadellidae, Deltocephalinae) in Serbia: pathogen inventory, epidemiological significance and vectoring potential. **European Journal of Plant Pathology**, 156: 201–221.

Jarausch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J.M. and Dosba, F., 1998. PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows Phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. **Eur. J. Plant Pathol**. 104:17-27.

Jović, J., Ember, I., Mitrović, M., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Acs, Z., Kölber, M., Toševski, I., 2011. Molecular detection of potato stolbur Phytoplasma in Serbia. **Bulletin of Insectology**, 64: 83-84.

Khan, M.S. and Raj, S.K., 2006. First report of molecular detection of an Aster yellows Phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma asteris) isolate infecting chilli (Capsicum annuum) in India. **Plant Pathology**, 55: 822.

Kılıç, M. ve Sertkaya, E., 2019. Hatay ilinde yetiştirilen Solanaceae familyasına ait sebzelerde zararlı Cicadellidae, Cixiidae ve Delphacidae (Hemiptera) türleri, **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**.

Korachevskiy, I.K. and Semenkova, A.V., 1938. On the susceptibility of solanaceae and convolvulaceae plants to big bud disease. **Plant Virus Dis.**, 2: 118–124.

Kumari, D.A., Vennila, D.S., Bhat, M.N. and Rao, G.P., 2018. Increasing incidence of tomato big bud Phytoplasma in Ranga Reddy District of Telangana State, India. **Ind. Phytopathol.,** 71: 207–211.

Kunkel, L.O., 1926. Studies on aster yellows. **Am. J. Bot**. 23: 646–705.

Landi, L., Riolo, P., Murolo, S., Romanazzi, G., Nardi, S. and Isidoro, N., 2015. Genetic Variability of Stolbur Phytoplasma in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) and its Main Host Plants in Vineyard

Agroecosystems. **J. Econ. Entomol.** 108(4): 1506–1515.

Langer M. and Maixner, M., 2004. Molecular characterization of grapevine yellows associated Phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. **Vitis**, 43 (4): 191-200.

Lebsky, V., Hernandez-Gonalez, J., Arguello-Astorga, G., Cardenasconejo, Y. and Poghosyan, A., 2011. Detection of Phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. **Bull. Insectol.,** 64: 55–56.

Lee, I.M. and Davis, R.E., 1992. Mycoplasmas which infect plant and insects. In: Mycoplasmas: **Molecular Biology and Pathogenesis** (Maniloff J., editor; , McElhansey R.N., editor; , Finch L.R., editor; and Baseman J.B., editor. , eds), pp. 379–390. Washington, DC: American Society of Microbiology.

Lee, I.M., Bertaccini, A., Vibio, M. and David E. Gundersen, D.E., 1995. Detection of Multiple Phytoplasmas in Perennial Fruit Trees with Decline Symptoms in Italy. **Phytopathology,** 85: 728.

Lee, I.M., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annu. Rev. Microbiol.**, 54: 221–255.

Lee, I.-M., Gundersen, D. E., Hammond, R. W. and Davis, R. E., 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed- MLO infections in a single host plant. **Phytopathology**, 84 (6): 559-566.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E. and Bertaccini, A., 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. **Phytopathology**, 88: 1359–1366.

Lee, I.-M., R.E. Davis, and C. Hiruki. 1991. Genetic interrelatedness among clover proliferation mycoplasmalike organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 3565–3569.

Lee, I-M., Bottner, K.D., Secor, G. and Rivera, V. Varas, 2006. '*Candidatus* Phytoplasma americanum' a Phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56, 1593–1597.

Marchi, G., Cinelli, T., Rizzo, D., Stefani, L., Goti, E., Della-Bartola, M., Luvisi, A., Panattoni, A. and Materazzi, A., 2015. Occurance of different Phytoplasma infections in wild herbaceous dicots growing in vineyards affected by bois noir in Tuscany (Italy). **Phytopathologia Mediterranea**, 54: 504-515.

Marcone C., Ragozzino A. and Seemüller E., 1997a. Detectionand identification of Phytoplasmas infecting vegetable, or-namental, and forage crops in southern Italy. **Journal of Plant Pathology,** 79: 211-217.

Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E., 1997b. Detectionand identification of Phytoplasmas in yellows-diseasedweeds in Italy. **Plant Pathology** 46: 530-537.

Martini M., Marcone C., Mitrovic J., Maixner M., Delie D., Myrta A., Ermacora P., Bertaccini A., Duduk B., 2012. *Candidatus* Phytoplasma convolvuli', a new Phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European coun- tries. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 62: 2910-2915.

Marzachì C., F. Veratti and D. Bosco, 1998. Direct PCRdetection of Phytoplasmas in experimentally infectedinsects. **Annals of Applied Biology**, 133, 45–54.

McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., De Leeuw, G. T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M., Seemüller, E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. pp. 546-640. In: The Mycoplasmas. Vol. 5 (Whitcomb R. F., TULLY J. G., Eds).- **Academic Press**, New York, USA.

Mitrović, J. and Duduk, B., 2011. Occurrence of a new stolbur strain in tobacco in Serbia. **Bulletin of Insectology** 64 (Supplement): s.107-108.

Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, 306: 47606, 1-5.

Moonjuntha,P., Srean,P., Sophary,K. and Natsuaki,K.T., 2019. First report of '*Ca.* Phytoplasmaaurantifolia' related Phytoplasma associated with cassava witches' broom disease in Cambodia. Unpublished, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK942732.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=MTBR88WG016

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. **Annuals of Applied Biology,** 166: 75-89.

Munyaneza J E, Crosslin J M, Lee I M, 2007. Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific northwest of the United States. **Bulletin of Insectology.** 60 (2), 181-182.

Munyaneza, J. E., J. M. Crosslin, and J. E. Upton., 2006. The beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top Phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. **J. Econ. Entomol.**, 99: 268–272.

Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., and Romanazzi, G., 2010. Genetic variability of thestolbur Phytoplasma vmp1 gene in grapevines, bind-weeds and vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, 109: 2049–2059.

Navratil, M., Valova, P., Fialova, R., Lauterer, P., Safarova, D. and Stary, M., 2009. The incidence of "stolbur" disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). **Crop Prot.** 28: 898–904.

Oksal, H.D., Kaya Apak, F., Oksal, E., Tursun, T., ve Sipahioglu, H.M., 2017. Detection and Molecular Characterization of two '*Candidatus* Phytoplasma Trifolii' Isolates Infecting Peppers at the Same Ecological Niche. **International Journal Of Agriculture & Biology**, 19–6–1372–1378.

Oksal, H.D., 2020. Natural Phytoplasma infections on fruit, vegetable and weed plants at the same agroecosystem and their molecular properties. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca** 48(2):615-625. DOI:10.15835/nbha48211940

Okuda, S., 1972. Occurrence of diseases caused by mycoplasma-like organisms in Japan. **Plant protection,** 26: 180-183.

Olivier, C. Y., Galka, B. and Sèguin-Swartz, G., 2010. Detection of "aster yellows" Phytoplasma DNA in seed and seedlings of canola (Brassica napus and B. rapa) and AY strain identification. **Can. J. Plant Pathol.**, 32: 298–305.

Özdağ, Y. and Sertkaya, G., 2017. Investigation on Viruses Causing Yellowing Disease

in Pepper in Hatay-Turkey. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi.** 22: 16-22.

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.

Özdemir, N. ve Saygılı H., 2012. Batı Anadolu Bölgesi Domates Üretim Alanlarında Görülen Stolbur Hastalığının Tohumla Taşınıp Taşınmadığı ile İlgili Bir Araştırma. **U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 26: 1, s. 63-72.

Özdemir, N., Saygili, H., Sahin, F., Karsavuran, Y., Bayrak, O.F., Oral, B., 2009. Host Range and Genetic Characterization of a Phytoplasma Causing Tomato Stolbur Disease in Turkey. **Acta Hortic.**, 808.39.

Paltrinieri, S., and A. Bertaccini. 2007. Detection of Phytoplasmas in plantlets grown from different batches of seed-potatoes. **Bulletin of Insectology**, 60: 379–380.

Perry, L., Dickau, R. Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. C., Rademaker, K., Ranere, A. J., Raymond, J. S., Sandweiss, D. H., Scaramelli, F., Tarble, K. and Zeidler, J. A., 2007. Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (Capsicum spp. L.) in the Americas. **Science**, 315, 986-988.

Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard , S., Mouras A. and Hernould, M., 2006. Tomato flower abnormalities induced by stolbur Phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes.- **Molecular Plant Microbe Interactions**, 19: 62-68.

Raj, S. K. , Snehi, S. K., Kumar S. and Khan M. S., 2009. First finding of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' (16SrVI group) associated with little leaf disease of Datura inoxia in India. **Plant Pathology**, 58: 791.

Randall JJ, Bosland PW, Hanson SF, 2009. Brote grande, a new Phytoplasma associated disease of chile peppers. **Plant Disease** 93: 968.

Rao, G.P. and Kumar, M., 2017. World status of Phytoplasma diseases associated with eggplant. **Crop protection**, 96: 22-29.

Rihne, T., Mitra, S., Bahadur, A., Panda, P., Banyal, N. and Rao, G. P., 2020. Mixed infection of Phytoplasma and begomovirus associated with leaf curling and

witches' broom disease of Zinnia elegans in India. **Indian Phytopathology**, 73: 527–532.

Safarova, D., Lauterer, P., Korbasova, Z., Stary, M., Valova, P. and Navratıl M., 2011. Hyalesthes obsoletus, a vector of stolbur Phytoplasma: current situation in South Moravia, Czech Republic. **Bulletin of Insectology** 64: 127-128.

Sakalieva, D., 2020. Molecular characterization of stolbur Phytoplasmas in pepper and tomato from Bulgaria. **BIO Web of Conferences 18**, 00025. IV All-Russian Plant Protection Congress with international participation "Phytosanitary Technologies in Ensuring Independence and Competitiveness of the Agricultural Sector of Russia"

Salas-Muñoz, S., Mauricio-Castillo, J. A., Dietrich, C. H., Creamer, R. and Reveles-Torres, L. R., 2018. First report of the leafhoppers Ceratagallia nitidula and Empoasca abrupta (Hemiptera: Cicadellidae) as vectors of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'. **Plant Disease**. 102 (12): 2636-2637.

Salehi, M., Hosseini, S. A. E., Salehi, E., Bertaccini, A., 2017. Genetic diversity and vector transmission of Phytoplasmas associated with sesame phyllody in Iran. Folia Microbiologica, 62(2), 99-109. Murphy, A. F., Rondon, S. I., Marchosky, R., Buchman, J., Munyaneza, J., 2014. Evaluation of beet leafhopper transmitted virescence agent damage in the Columbia Basin. **American Journal of Potato Research**, 91(1), 101-108.

Salehi, M., Izadpanah, K., Nejat, N. and Siampour, M., 2007. Partial characterization of Phytoplasmas associated with lettuce and wild lettuce phyllodies in Iran. **Plant Pathol.**, 56: 669–676.

Salehi, M., Siampour, M., Alireza, S., Hosseini, E. and Bertaccini, A., 2015. Characterization and vector identification of Phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. **Bull. Insectol.,** 68: 311–319.

Salehi, M.T., Izadpanah, K., Siampour, M. and Taghizadeh, M., 2009. Molecular characterization and transmission of bermuda grass white leaf Phytoplasma in Iran. **Journal of Plant Pathology**. 91(3):655-661.

Santos-Cervantes, M.E., Chávez-Medina, J.A., Méndez-Lozano, J. and Leyva-López, N. E., 2008. Detection and Molecular Characterization of Two Little Leaf Phytoplasma Strains Associated with Pepper and Tomato Diseases in

Guanajuato and Sinaloa, Mexico. **Plant Disease,** 92(7): 1007-1011.

Satta, E., Paltrinieri and S., Bertaccini, A., 2019. "Phytoplasma transmission by seed," in Phytoplasmas: **Plant Pathogenic Bacteria-II Transmission and Management of Phytoplasma Associated Diseases**, eds Bertaccini A., Weintraub P., Rao G. P., Mori N. (Singapore: Springer;), 131–147.

Schneider B., Seemüller E., Smart, C.D. and Kirkpatrick, B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or Phytoplasmas, **Academic Press**, In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology,1: 369-380.

Seemüller, E. and Kirkpatrick, B.C., 1996. Detection of Phytoplasma infections in plants. **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology**, 2: 299-311.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and Göeschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the Phytoplasmas. **J. of Plant Pathol**. 80: 3–26.

Seemüller, E., Garnier, M. and Schneider, B., 2002. Mycoplasmas of Plants and Insects. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**, 91-115.

Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.H., Firrao, G., Avinent, L., B. Sears, B. and Stackebrandt, E., 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. **Int J Syst Bacteriol,** 44: 440–446.

Sertkaya G, Sertkaya E and Kılıç M, 2013. Investigation on Phytoplasma Diseases in Potato Fields in Eastern Mediterranean Region of Turkey. **15th Triennial Meeting of the Virology Section of the European Association of Potato Research – EAPR**. p.35. 28-31 May 2013. Antalya, Turkey.

Sertkaya G., and Çarpar, H., 2017. Investigation on Viruses of Small Hot Peppers (*Capsicum Annuum*) in Hatay-Turkey. **AGROSYM 2017**.

Sertkaya G., Sertkaya E and Daplan N, 2003. Black nightshade (Solanum nigrum L.) as a host of Cucumber mosaic virus (CMV) in pepper crop in Hatay province of Turkey. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 22(1): 16-22.

Sertkaya G., Sertkaya E., 2017. Investigation on some pests and diseases of basil (*Ocimum basilicum*) in Hatay-Turkey. 3rd International Symposium For Agriculture And Food, **ISAF 2017**, Section 9. Plant Protection – Phytomedicine, 18-20 October 2017 Ohrid, Republic of Macedonia. p. 352.

Sertkaya, G., 2008. Hatay biberi "Geyik Boynuzu" Kırmızı biber tiplerinde tohumla ve mekanik olarak taşınabilen bazı virüslerin araştırılması. **VII. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildiriler.**

Sertkaya, G., 2012. Hatay ili kırmızı biber alanlarında domates mozaik virüsü (ToMV)' nün araştırılması. **9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu**, 223-228.

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.

Seyahooei, M. A., Hemmati, C., Faghihi, M. M., Bagheri, A., 2017. First report of a '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'-related strain associated with Suaeda aegyptiaca and its potential vector in Iran. **Australasian Plant Disease Notes**, 12(1): 24.

Shahryari, F. and Allahverdipour, T., 2018. "*Candidatus* Phytoplasma trifolii" related strain affecting Salix babylonica in Iran. **Australasian Plant Disease Notes** 13 (1), 40.

Sichani, F.V., Bahar, M. and Zirak, L., 2014. Characterization of Phytoplasmas related to aster yellows group infecting annual plants in Iran, based on the studies of 16S rRNA and rp genes. **J. Plant Prot. Res.,** 54: 1–8.

Singh, D. and Singh, S.J., 2000. Chilli little leaf - a new Phytoplasma disease in India. **Indian Phytopathology**, 53: 309-310.

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. **Appl Environ Microbiol,** 62: 2988–2993.

Swisher, K. D., Munyaneza, J. E., Velásquez-Valle, R. and J. Mena-Covarrubias, 2017. First Report of Beet Leafhopper Transmitted Virescence Agent Phytoplasma in Capsicum annuum and Circulifer tenellus in Mexico. **Disease Notes**, https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1723-PDN.

Şaş-Sertkaya G, 1999. Transmission of *Spiroplasma citri* and sesame phyllody to test plants by grafting, dodder and insect vector. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes. **J. Plant Pathology**, 82(1):73.p.75.

Şaş-Sertkaya, G. ve Çınar, A., 1999. Doğu Akdeniz Bölgesi Susam Alanlarında *Circulifer haematoceps* (M.-R.) (Homoptera: Cicadellidae) Vektörü İle Taşınan *Spiroplasma citri* Saglio et al. ve Susam Phyllody Fitoplazmasının Epidemiyolojisi Üzerinde Araştırmalar. **Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi** (15-20 Kasım, Adana, 1999), 189-194.

Thomas, K.M. ve Krishnaswami, C.S., 1939. Little leaf a transmissible disease of brinjal. **Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 10: 201–202.

Tohidi, Z., Salehi, M., Ghasemi, S., Khanchezar, A. and Shahamiri, S.M., 2015. Association of a 16SrIX-C Phytoplasma with eggplant phyllody in Iran. **J. Crop Protect.,** 4(2): 247–256.

Tran-Nguyen, L. T., Persley, D. M. and Gibb, K. S. 2003. First report of Phytoplasma disease in capsicum, celery and chicory in Queensland. **Aus. Plant Pathol.,** 32: 559–560.

Trkulja, V., Adamović, D., Đalović, I., Mitrović, P., Kovačić-Jošić, D., Lukač, Z. and Komić, J., 2016. First Report of Stolbur Phytoplasma Associated With Anethum graveolens in Serbia. **Disease Notes,** 100(2): 516.

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. **YYÜ TAR BİL DERG** (YYU J AGR SCI), 27(3): 299-308.

Usta, M., Güller, A. and Sipahioğlu, H.M., 2018. Molecular analysis of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' and '*Candidatus* Phytoplasma solani' associated with Phytoplasma diseases of tomato (PDT) in Turkey. **International Journal of Agriculture and Biology** 20(9):1991-1996.

Venkataravanappa, V., Ashwathappa, K.V., Hemachandra Reddy, P., Lakshminarayana Reddy, C.N., Jalali, S. and Krishna Reddy, M., 2018. '*Candidatus* Phytoplasma' belonging to the 16SrVI Phytoplasma group, is associated with witches broom disease of *Azadirachta indica* in India. **Australasian Plant Disease Notes**, 13(1),28.

Volokhov, D.V., 2008. Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/FJ226570.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=MTMNTYB6016

Weintraub, P.G. and Beanland, L., 2006. Insect vector of Phytoplasmas. **Annual review of Entomology,** 51: 91-111.

Wu, G., Chen, Z., Zhang, M., Zhang, S., and Wu, Y., 1994. A new pepper disease caused by mycoplasma-like organism (MLO). **Acta Phytopathologica** Sinica, 24,49–53.

Xu, X., Mou, H.Q., Zhu, S.F., Liao, X.L. and Zhao, W.J. 2013. Detection and characterization of Phytoplasma associated with big bud disease of tomato in China. **J. Phytopathol.**, 161: 430–433.

Yılmaz, S., Çağlar, B.K. and Djelouah, K., 2019. Molecular characterization of Phytoplasma diseases of pepper in Turkey. **Journal of Phytopathology**. 167: 479-483.

Zamharir, M.G., 2018. Association of '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' related strain with white willow proliferation in Iran. **Australasian Plant Disease Notes** 13(1): 17.

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X. and Davis, R. E., 2009. Construction of an interactive online Phytoplasma classification tool, i PhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease Phytoplasma group (16SrIII). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,** 59: 2582–2593.

Zheng-Nan, L., Zhang, L., Song, J.G. and Wu, Y.F., 2013. Molecular detection and identification of Phytoplasma associated with pepper witches' broom in China. **Phytoparasitica**, 41: 429–434.

EKLER

EK 1

Doyle ve Doyle (1990) yöntemine göre DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

%2'lik CTAB Çözeltisi pH 8.0 (1000ml)

Kimyasal	**Miktar**
CTAB (%2)	20 g/l (%2w/v)
NaCl (1,4M)	81.8 g/l
EDTA (20mM)	7g
Tris-HCl (500mM)	60g
*ß-mercaptoethanol	%0, 2

*ß-mercaptoethanol, bitki örnekleri ezilmeden hemen önce karışıma taze olarak eklenir. Kimyasallar 500 ml ddH_2O'da çözdürülür, 1 L'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

TE (Tris-EDTA) Çözeltisi (1 L)

988 ml ddH_2O'ya 1 M Tris-HCl'den 10 ml ve 0.5 M EDTA'dan 2 ml eklenir. Otoklav edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

1M Tris-HCl

121.1 g tris base 700 ml ddH_2O'da çözdürülür. Hacim 1 L'ye tamamlanır. Otoklav edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

0.5 M EDTA

186.1 g EDTA 800 ml ddH_2O'da çözdürülür. Yaklaşık 20 g NaOH eklenir ve iyice çözdürülür. Hacim 1 L'ye tamamlanır. Otoklav edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

5M NaCl

292 g NaCl 800 ml d_2H_2O'da çözdürülür. Hacim 1 L'ye tamamlanır. Otoklav edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

EK 2

Agaros Jel Elektroforez (Maniatis ve ark., 1982)

TAE 50X (100 ml)

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

Çözelti 100 ml d_2H_2O'ya tamamlanıp otoklav edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0.5X TAE	200 ml
Ethidium bromide	200 µl

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

%1,2 Agarose Jel Elektroforezi

3 gr agaroz, 250 ml 0.5X TAE içinde mikrodalga fırında çözdürülür. Yaklaşık 40˚C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenir (20-25 dakika). 0.5X TAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilir.

EK 3

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)

Kaplama Tamponu (Coating Buffer)		
pH : 9.6	Na_2CO_3	1.59 g
	$NaHCO_3$	2.93 g
	NaN_3	0.20 g
Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer)		
pH : 7.4	NaCI	8.00 g
	$KH2PO_4$	2.90 g
	Na_2HPO_4 X 12 H_2O	0.20 g
	KCL	0.20 g
	NaN_3	0.20 g
Yıkama Tamponu (PBST Buffer)		
pH :7.4	PBS Buffer	999.50 ml
	Tween 20	0.50ml
Örnek Tamponu (Extraction Buffer)		
pH : 7.4	PBST	1000,0 ml
	Polyvinypyrolidone (MV = 40000 K =40)	20,00 g
Konjuget Tamponu (Conjugate Buffer)		
pH : 7.4	PBST	1000,0 ml
	Polyvinypyrolidone (MV = 40000 K =40)	20,00 g
	Ovalbumin	2,00 g
	NaN_3	0.20 g
Substrat Tamponu (substrat buffer)		
pH : 9,8	Diethanolamin	97.00 ml
	NaN_3	0.20 g
	Destile su	1000,0 ml
		oluncaya kadar.

EK 4

Genbank'a yüklenerek kodları alınan bitki ve böcekten elde edilen fitoplazma hastalıklarına ait nükleotid dizileri

TUR_Pep_405_HC_MT993358

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTACGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Tom_431_HC_MT992754

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA

AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Tom_432_HC_MT992796

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTTTTATTTTT
AAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTCACATTAGTT
AGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGA
GGTCGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCG
CGTGAACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAA
AGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAA
CTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTG
CAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAG
AGGCAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATACGGAGGA
ACACCAGAAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC
GATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGT
ACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGG
GACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAA
ACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAG
GTTATCAGAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATT
AAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGG
ACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACA
ATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCTTCTGGCGAATCTCAAAA
AAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTTT
GTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Ses_567_HC_MT994434

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA

AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Bas_634_HC_MT994432

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Bin_917_HC_MT993422

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTTTTATTTTT
AAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTCACATTAGTT
AGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGGCTGAGA
GGTCGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCG
CGTGAACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAAA
AGATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAA
CTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAAT

TATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTG
CAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTGGATAG
AGGCAAGTGGAATTCCGTGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATACGGAGGA
ACACCAGAAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAAC
GATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGT
ACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGG
GACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAA
ACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAATACAGTGGAG
GTTATCAGAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTTAATTGCCATCATT
AAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGG
ACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACA
ATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGTTTCTGGCGAATCTCAAAA
AAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCCCGGTGAATACTTTCCCGGGGTTT
GTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Emp_924_HC_MT994430

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Exi_935_HC_MT994433

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA

GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA

TUR_Eus_936_HC_MT994431

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAACAAAAAGGCATCTTTTTGTTTTT
AAAAGACCTTCTTATGAAGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAG
TTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGA
GAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
CGCGTGAACGATGAAGTATTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATTGAAGAAGAA
AAAGTAGTGGAAAAACTATATTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTA
ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAGATAAGTCTATAATTTAATTT
CAGTGCTTAACGCTGTCTTGTTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAGATAG
AGGCAAGCGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAAATATATGGAGGA
ACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGAGTACTAAGTGTCGGGGTAAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGAC
GGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAA
AAATCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGA
GGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTCGTGTCGTGAGA
TGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAACATTGGAGGAAGGTG
AGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATA
CAATGGCTGTGACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAA
AAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGTAACTCGACTTCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGGTT
TGTACACACCGCCCGTCAAATCACGA