

Batı Anadolu Bölgesi Domates Üretim Alanlarında Görülen Stolbur Hastalığının Tohumla Taşınıp Taşınmadığı İle İlgili Bir Araştırma*

Nilay Özdemir¹, Hikmet Saygılı²

¹Ege Üniversitesi Ödemiş Meslek Yüksekokulu 35760, Ödemiş-İzmir,
²Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100, Bornova- İzmir
E-mail: nilay.kirsoy.ozdemir@ege.edu.tr

Geliş Tarihi: 25/08/2011, Kabul Tarihi: 30.06.2012

Özet: Domates (*Lycopersicum esculantum* Mill), ülkemizde üretimi yapılan sebzeler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Ülkemizde domates üretiminin en çok yapıldığı Batı Anadolu Bölgesi'nde domates stolbur hastalığı'nın yoğun olarak görüldüğü Bursa ve Çanakkale illerinin domates üretimi yapılan ilçe ve köylerinde survey çalışmaları yapılmıştır. Stolbur hastalığının görüldüğü dönemde araziden toplanan stolbur hastalığı belirtisi veren domates bitkilerinden ve sağlıklı bitkilerden alınan domates tohumları materyal olarak kullanılmıştır. PCR yöntemi ile P1/P6, P1/P7 üniversal primer setleri kullanılarak stolbur hastalığının varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Çalışmalarımız sonucunda, domates stolbur hastalığının, yoğun olarak görüldüğü bölgeler saptanmış ve domates stolbur hastalığının tohumla taşınmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Domates, Stolbur, Tohum, Fitoplazma, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).

A Study On The Transmission With The Seed Of Stolbur Disease In Western Anatolia Tomato Areas

Abstract: Tomato (*Lycopersicum esculantum* Mill), is one of the most important vegetable crops in our country. A survey was carried out in tomato production areas, especially in Western Anatolia region, Bursa and Çanakkale. Tomato seeds were collected from tomato fields with stolbur disease observed. They were used as a material. Total genomic DNA were isolated from seeds and tomato plants and then amplified by universal primer sets (P1/ P6 and P1/P7) specific for phytoplasma . The results showed that the role of the seed in spreading of stolbur disease in tomato was not confirmed.

Key Words: Tomato, Stolbur, Seed, Phytoplasma, Polymerase Chain Reaction (PCR).

* Doktora Tezinden Yazılmıştır.

Giriş

Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill), Dünya’da ve Türkiye’de geniş ekim alanlarında üretimi yapılan önemli bir sebzedir. Başta Marmara Bölgesi olmak üzere Ege ve Akdeniz bölgelerinde ve Türkiye’de birçok bölgede domates üretimi yapılmaktadır. Akdeniz bölgesinde daha çok örtü altı domates yetiştiriciliği yaygındır. Marmara ve Ege Bölgelerinde ise sanayiye yönelik domates üretimi yapılmaktadır (Vural ve ark., 2000). Domates stolbur hastalığı da fitoplazmaların (mikoplazma benzeri organizmalar) neden olduğu önemli hastalıklardan biridir. Bu hastalık nedeniyle bazı bölgelerde özellikle sanayi domatesi üretiminde zaman zaman önemli ürün kayıpları meydana gelmektedir. Domates’te fitoplazma enfeksiyonları Akdeniz havzasının birçok bölgesinde görülmektedir (Zimmermann-Gries and Kleis, 1978; Alivizatos, 1989; Vibio *et al.*, 1996; Del Serrone *et al.*, 2001; Ghandi *et al.*, 2003). Fitoplazmalar floemle sınırlı, dünya çapında çok sayıda hastalıkla tanınan prokaryotlardır. (Mc Coy *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 1999). Mollicutes sınıfında yer alan bitki patojeni bakterilerdir. Hücre çeperi olmayan gruba dahil organizmalar filogenetik yapısı ile ilgili olarak düşük G+C (Guanin + Sitozin) içeriğine sahip, gram (+) bakterilerdir (Weisburg *et al.*, 1989; Pracros *et al.*, 2006). Bağ, meyve ağaçları, süs bitkileri ve sebzeler gibi çok sayıda bitkiyi etkileyen yüzlerce hastalığa fitoplazmaların neden olduğu saptanmıştır (McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Seemüller *et al.*, 2002 ;Pracros *et al.*, 2006). Yıllardır stolbur hastalığının, konukçuları içinde domates bitkisi de bilinmektedir (Valenta *et al.*; 1961; Pracros *et al.*, 2006). Çanak kale ilinde domates stolbur hastalığının yaygınlık durumunun belirlenmesi ve hastalığın aşı yoluyla, küskütle ve tohumla taşınma oranlarının saptanması ile ilgili bir çalışma 2002–2003 yılları arasında yürütülmüştür. Yapılan survey çalışması sonucunda bölgede stolbur hastalığının 2002 yılı içinde ortalama enfeksiyon oranı % 0,38 olarak belirlenmiştir. Taşıma denemelerinde ise hastalığın aşı yoluyla % 96 oranında, küsküt ile % 85,7 oranında taşındığı; tohum yoluyla ise taşınmanın olmadığı saptanmıştır (Afat, 2004). Fitoplazmalar tarafından oluşturulan hastalıkların teşhisi ve mücadelesi oldukça zordur. Dünya’da son yıllarda bu tip hastalıkların belirlenmesinde moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır (Marcone *et al.*, 1997). Fitoplazmalar, obligat parazit oldukları için standart besiyerlerinde çoğaltılmaları mümkün değildir. Ancak bu hastalıkların semptomları genellikle virüs hastalıklarına çok benzediği için yapılan teşhisler çoğunlukla alternatif yorumlara açıktır ve bilimsel değildir. Son yıllarda ileri moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile kültüre alınamayan organizmaların (fitoplazma, virüs ve viroid gibi) tanısı ve hastalığın teşhisinde yeni bir çığır açılmıştır (Namba *et al.*, 1993). Fitoplazmaları in-vitro koşullarda kültüre almak zor olmasına rağmen fitoplazmaları saptamak ve tanılamak için alternatif metotlar vardır. Hem serolojik hem de DNA hibridizasyon metotları eskiden beri bu amaç için kullanılmıştır (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1989; Kuske *et al.*, 1991; Kirkpatrick, 1992). PCR (Polimeraz Chain Reaction) fitoplazmaya konukçuluk yapan diğer alternatif bitki türlerinin ve vektör böceklerin saptanmasında kullanılmıştır (Deng and Hiruki 1991; Ahrens and Seemüller 1992; Schaff *et al.*, 1992; Firrao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995). PCR, muhafaza edilen geni çoğaltarak çok sayıda fitoplazmanın saptanması ve tanımlanmasını sağlamıştır (Gundersen and Lee, 1996; Poggi Pollini *et al.*, 2001; Abou- Jawdah *et al.*, 2002; Castro and Romero, 2002; Harrison, 2002). Bu çalışmada spesifik PCR yöntemlerini kullanarak ve saksı denemeleri yaparak domates stolbur hastalığının tohumla taşınıp taşınmadığı saptanmaya çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Batı Anadolu bölgesinde domates üretimi yapılan yerlerde yaygınlığı belirlemek için Bursa ve Çanakkale illerinde domates ekimi yapılan tarım alanlarında, illerdeki domates ekim alanlarına bağlı olarak toplam 100 tarla seçilmiştir. Her tarladan tesadüfi 50 bitki kontrol edilmiştir. Sürvey yapılarak hastalığın bölgedeki yaygınlığı, epidemi durumu ile ilgili saptamalar yapılmıştır. Sürveyler bitkilerin fide, çiçek ve meyve dönemleri olmak üzere 3 kez yapılmıştır.

Domates stolbur hastalığının tohumla taşınıp taşınmadığını saptamak amacıyla, arazide stolbur hastalığına rastlanan domates çeşitlerinden sağlıklı ve stolburlu bitkilerden meyveler alınmıştır. Tohumla taşınma denemesinde bu bölgede en çok yetiştirilen 6 çeşit materyal olarak kullanılmıştır. Kullanılan çeşitler DR-447, Hyper-303, Shasta, Rio-Grande, Hazera, XPH-5811 çeşitleridir. Araziden toplanan meyvelerden alınan tohumlar gölgede kurutulduktan sonra buzdolabında(+4°C’de) ekim zamanına kadar saklanmıştır. Sağlıklı ve stolbur hastalığı belirtisi gösteren bitkilerden toplanan meyvelerden elde edilen tohumlar çalışmamızda materyal olarak kullanılmıştır. (Şekil 1 ve 2). Arazi çalışması domates stolbur hastalığının çok görüldüğü Bursa ve Çanakkale illerinin yoğun olarak domates üretimi yapılan ilçe ve köylerinde yapılmıştır. Domates tohumları domates meyvelerinin hafif yumuşamaya başladığı dönemlerde alınmıştır (Raymond, 1999).

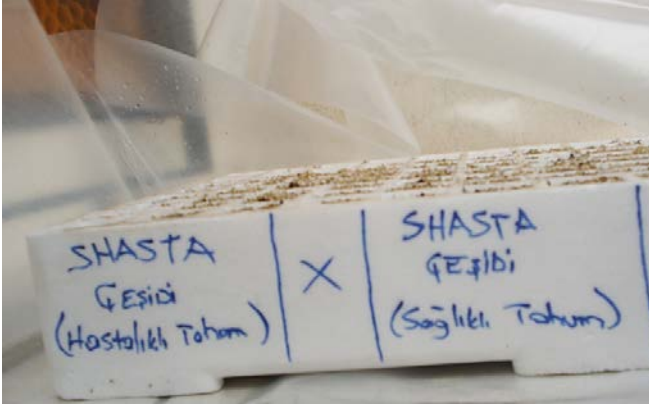


Şekil 1. Stolburlu Bitkilerden Alınan Domates Meyvesi (A) ve Sağlıklı Bitkilerden Alınan Domates Meyvesinin (B) Görünümü



Şekil 2. Domates Tohumlarının Alınma Aşaması

Araziden toplanan meyvelerden ayrılan domates tohumları, ekim zamanları geldiğinde (Şubat ayı sonu- Mart ayı başı) sağlıklı ve stolburlu meyvelerden alınan tohumlar ayrı ayrı viyollere ekilerek tohumdan çıkacak bitkinin stolbur hastalığını taşıyıp taşımadığı, sağlıklı olan bitkilerle kontrollü olarak yapılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Sağlıklı ve Stolburlu Meyvelerden Alınan Tohumların Ekildiği Viyollerin Görünümü

Her çeşitten 50'şer tohum viyollere ekilmiştir. Mart ayı başında viyollere ekilen domates tohumlarından elde edilen fideler Mayıs ayı başında büyük saksı şeklinde 8 lt.'lik polietilen torbalara şaşırtılmıştır (Şekil 5). Torbalar 1/3 oranında elenmiş bahçe toprağı, 1/3 oranında kum, 1/3 oranında yanmış ve elenmiş hayvan gübresi karışımı ile doldurulmuştur. 6 farklı çeşidin sağlıklı meyvelerinden alınmış tohum ve 6 farklı çeşidin stolbur hastalığı belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen meyvelerinden alınmış tohum olmak üzere toplam 12 çeşit, 3 tekerrürlü olarak yetiştirilmiştir. Her tekerrürde 3 bitki bulunmaktadır. Gözlemler bitkilerin gelişme döneminin sonuna kadar devam etmiştir. Stolburlu meyveden alınan tohumlardan yetiştirilen bitki kısımlarından DNA elde edilerek PCR yapılmıştır.

Laboratuvar koşullarında da stolburlu ve sağlıklı domates tohumları 1-2 dakika %70'lik etil alkolde bekletilmiştir. İçerisinde su-agar bulunan erlenlere steril kabinde her kaba 5 tohum olacak şekilde, 5 erlene sağlıklı, 5 erlene hastalıklı tohumların ekimi yapılmıştır (Şekil 6). Kotiledon yaprakları çıkınca toplanıp DNA elde edilerek PCR yapılmıştır. Çıkan sonuçlara göre, hastalığın tohumla taşınıp taşınmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 5. Viyollerden Şaşırtılan Tohumların Polietilen Torbalardaki Görünümü



Şekil 6. Su-Agarda Sağlıklı Ve Stolburlu Tohumların Görünümü

Bitki Örneklerinden DNA İzolasyonu

Domates tohumlarından elde edilen bitkilerden alınan yaprak örnekleri gölgede kurutulup DNA elde etme işleminde kullanılmıştır. Örnekler toz haline getirilmiştir.

Tohumdan yetiştirdiğimiz bitkilerin stolbur hastalığını taşıyıp taşımadıklarını PCR yöntemini kullanarak tesbit etmek, bitkiden en saf DNA elde etmek ve pratikte kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla aşağıdaki protokol takip edilmiştir (Warude *et al.*, 2003).

0,1 gr. örnek ependorf tüpe alınmıştır. Üzerine içerisinde % 0,3'lük β -Merkoptoetanol bulunan ekstraksiyon tamponundan 1000 μ l. eklenmiştir. Tüpteki karışım homojen hale gelinceye kadar vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra 65 °C'de 1 saat su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplere eşit hacimde kloroform- izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklenmiştir. Tüpler 700 rpm'de 25 °C'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu 3'lü faz oluşmuştur. Üstteki sulu faz temiz tüpe aktarılmıştır. Sulu fazın aktarıldığı tüplerin üzerine tekrar eşit hacimde kloroform- izoamilalkol (24:1) eklenmiştir. Tüpler 700 rpm'de 25 °C'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Üstteki faz tekrar temiz bir tüpe aktarılmıştır. Tüplere DNA'yı çöktürmek için 1/10 hacim Na- Asetat ve 2 hacim soğuk etil alkol ilave edilmiştir. İyice karışmaları sağlandıktan sonra 5–10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüpler 700 rpm'de 4°C'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Üstteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet % 70'lik etil alkol ile yıkanmıştır. 10.000 rpm'de 4°C'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve peletin tamamen kuruması sağlanmıştır. DNA peleti 50 μ l. TE tamponu ile çözülmüştür. Çözünen DNA'lar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Primerler ve Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR testleri için daha önceki çalışmalarda kullanılan ve fitoplazma ırk ve strainleri için universal olduğu belirlenmiş 16S rDNA genlerine spesifik P1/P6, P1/P7 (Smart *et al.*, 1996; Deng and Hiruki, 1991) primer setleri temin edilmiştir.

P1/P6 ve P1/P7 primerleri kullanılarak her bir örnek için toplam 50 μ l olacak şekilde master mix hazırlanmıştır.

1 tüp için master mix; PCR Buffer 5µl, MgSO₄ 6µl, dNTP (10mM) 1.3µl, Primer1 2µl, Primer2 2µl, Taq Pol. 0.5µl, Temp DNA 5µl, dH₂O 28.2µl, toplam hacim 50µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR için hazırlanan örnekler, 94°C'de 5 dk. denetürasyon, bunu takip eden 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1dk. denatürasyon, 56°C'de 1.15 dk. bağlanma ve 72°C'de 1.40 dk. uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 10dk uzama basamağından sonra örnekleri +4 °C'de muhafaza edecek şekilde programlanan PCR termocycler cihazına yerleştirilmiştir. Seçilen programda hedef bölgelerin amplifikasyonu yapılmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Hastalığın yoğun olduğu Bursa ili Karacabey İlçesinde; Boğaz, Kındırgı Çiftliği, Kepekler, Beyköy, Ekinli 1, Ekinli 2, Çerpeş ve Hayırlar köyleri, Yenişehir İlçesinde, Karaköy ve Kiremitlik köyleri, Çanakkale ili Biga ilçesinde Çeşmealtı, Gümüşçay köylerinde domates stolbur hastalığının görüldüğü tarlalarda yoğunluk saptama çalışmaları yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda Bursa ili Karacabey ilçesi Boğaz mevkiinde domates stolbur hastalığı ile bulaşık olan tarlalarda bulaşıklık oranının ortalama %80-%90 oranında olduğu gözlenmiştir. Bursa'nın Yenişehir ilçesinde ve köylerinde yapılan hastalığın yoğunluğunu belirleme çalışmalarında stolbur hastalığının görüldüğü bölgelerde %80 oranında olduğu saptanmıştır. Çanakkale ilinin ilçe ve köylerinde yapılan hastalığın yoğunluğunu belirleme çalışmamız sonucunda; Biga ilçesi ve köylerinde sanayi domatesi üretim alanlarında stolbur hastalığı görülen tarlalarda bulaşıklık oranının %60-%70 oranında olduğu gözlenmiştir. Çanakkale Üniversitesinde yapılan bir çalışma sonucunda, domates tarlalarında stolbur hastalığının önemli verim kayıplarına neden olduğu ve yoğun olarak görüldüğü bildirilmiştir (Afat, 2004). Çalışmamız bu literatürle paralellik göstermektedir. Sağlıklı meyveden alınan tohumlar ile stolburlu meyveden alınan tohumlar arasında çıkış açısından bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Stolbur Belirtisi Gösteren Bitkilerden ve Sağlıklı Bitkilerden Alınan Tohumlardan Yetişen Bitkilerin Viyoldeki Görünümü

Domates stolbur hastalığının tohumla taşınıp taşınmadığını saptamak amacıyla yaptığımız çalışmada gözlemlerimiz meyve bağlama dönemine kadar devam etmiştir. Şekil 7 ve Şekil 8'de görüldüğü gibi sağlıklı meyvelerden alınan tohumdan yetişen bitki ile stolburlu meyveden alınan tohumdan yetişen bitkide gelişme bakımından hiçbir fark gözlenmemiştir. Stolburlu meyveden alınan tohumlardan yetişen bitkilerde makroskobik olarak domates stolbur hastalığının belirtisine benzer belirtilere rastlanmamıştır. Bitki kısımlarından elde edilen DNA ile P1/P6, P1/P7 üniversal primer setleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda da stolbur hastalığına rastlanmamıştır. Laboratuvar koşullarında erlenler içerisinde yetiştirilen sağlıklı ve hastalıklı tohumlar çimlendikten sonra ilk çıkan kotiledon yapraklar toplanarak DNA elde edilmiş ve P1/P6, P1/P7 üniversal primer setleri kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR sonucunda tohumda stolbur hastalığı etmenine rastlanmamıştır. Afat (2004)'ın yaptığı çalışmada sadece makroskobik gözlemlere dayanılarak stolbur hastalığının taşınmadığı kanısına varılmıştır. Bizim çalışmamızda makroskobik gözlemlere ek olarak laboratuvar ve tarla koşullarında yetiştirilen stolburlu meyvelerden alınan tohumlardan yetişen bitkilerden alınan örneklerle PCR çalışması yapılmıştır. PCR çalışması sonucunda domates stolbur hastalığında tohum yoluyla taşınmanın olmadığı saptanmıştır.



Şekil 7. Sağlıklı Bitkiden Alınan Tohumdan Yetiştirilen Bitkisi



Şekil 8. Stolburlu Bitkiden Alınan Tohumdan Yetiştirilen Bitkisi

Kaynaklar

- Abou-Jawdah, Y., Karakashian, A., Sobh, H., Martini, M., and Lee, I.M., 2002. An epidemic of almond witches'-broom in Lebanon: classification and phylogenetic relationship of the associated phytoplasma. *Plant Dis.* 86: 477–484.
- Afat, F., 2004. Çanakkale İlinde Domates Stolbur Hastalığının Yaygınlık Durumunun Belirlenmesi ve Hastalığın Aşı Yoluyla, Küskülle ve Tohumla Taşınma Oranlarının Saptanması. Y. Lisans Tezi. Çanakkale Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü.
- Ahrens, U., and Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828–832.
- Alivizatos A.S., 1989. Occurrence and distribution of tomato stolbur in Greece. *Proceedings of the 7th Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Budapest, Hungary, 945–950.
- Castro, S., and Romero, J., 2002. The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *J. Phytopathol.* 150, Page : 25–29.
- Clark, M. F., Morten, A., and Buss, S. L., 1989. Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows-MLO-associated antigens. *Ann. Appl. Biol.* 114:111–124.
- Del Serrone, P., Merzachi, C., Bragaloni, M., Galeffi, P., 2001. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathol. Mediterranea* 40:137–142.
- Deng, S., and Hiruki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 53–61
- Firrao, G., Gobbi, E., and Locci, R., 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:602–607.
- Ghandi ,H.A., Amjad, B. K., and Isam, A. F., 2003. Detection and Molecular Characterization of a Phytoplasma Associated with Big Bud Disease of Tomatoes in Jordan *Journal of Phytopathology* 151 (4), 223–227.
- Gundersen, D.E., and Lee, I.M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology. Mediterrenea.* 35: 144–151.
- Harrison, N. A., 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease* 86, 676–681.
- Kirkpatrick, B. C., Stenger, D. C., Morris, T. J., and Purcell, A. H., 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238:197–200.
- Kirkpatrick, B. C., 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens, p. 4050–4067. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Kuske, C. R., Kirkpatrick, B. C., Davis, M. J., and Seemüller, E., 1991. DNA hybridization between western aster yellows mycoplasma-like organism plasmids and

- extrachromosomal DNA from other plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:75–80.
- Lee, I.M., Hammond, R. W., Davis, R. E., and Gundersen, D. E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834–842.
- Lee, I.-M., Davis, R. E. and Gundersen-Rindal, D. E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54, 221–255.
- Liu, H. W., Goodwin, P. H., and Kuske, C. R., 1994. Quantification of DNA from the aster yellows mycoplasma-like organism in aster leafhoppers (*Macrostelus fascifrons* Stål) by a competitive polymerase chain reaction. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:274–280.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771–776.
- Marcone, C., Ragozzino A., and Seemüller E., 1997. Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. *Plant Pathology* 46: 530-537.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chykowski, 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., and Seemüller, E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms, p. 545–640. In R. F. Whitcomb and J. G. Tully (ed.), *The mycoplasmas*, vol. V. Academic Press, New York.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., and Tsuchizaki, T., 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83:786–791.
- Poggi Pollini, C., Bissani, R., and Giunchedi, L., 2001. Occurrence of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in northern-central Italy. *J. Phytopathol.* 149, 725–730.
- 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. Pages 62-68.
- Raymond, A.T.G., 1999. *Vegetable seed production*, Wallingford, Oxon, UK:CABI Pub,1999.
- Schaff, D., Lee, I. M., and Davis, R. E., 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1503–1509.
- Schneider, B., Gibb, K. S., Padovan, A. C., Davis, R. I. and De La Rue, S., 1999. Comparison and characterisation of tomato big bud and sweet potato little leaf-group phytoplasmas. *J Phytopathol* 147, 31–40.
- Seemüller, E., Garnier, M., and Schneider, B., 2002. Mycoplasmas of plants and insects. Pages 91-115 in: *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. S. Razin and R. Herrmann, eds. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
- Smart, CD., Schneider, B., Morrer, R., Blomquist, DJ., Guerra, LJ., Harrison, NJ., Ahrens, U., Lorenze KH, Seemüller, E., and Kirkpatrick, BC., 1996. Phytoplasma-specific

- PCR primers based on sequences of the 16S–23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2988–93.
- Valenta, V., Musil, M., and Misiga, S., 1961. Investigations on European yellows type viruses. I. The stolbur virus. *Phytopathology*. 42:1-39.
- Vibio, M., Bertaccini, A., Lee, I.-M., Davis, R. E., ve Clark, M. F., 1996. Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. *Phytopathology Mediterranean* 35,33±42
- Vural, H., Esiyok, D., ve Duman, I., 2000. *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetistirme)*. E.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü. Bornova- İzmir.
- Warude, D., Chavan, P., Joshi, K., and Patwardhan, B., 2003. DNA isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 467–476.
- Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L. , Petzel, J. P. , Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., Van Etten, J., Maniloff, J., and Woese, C. R., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171:6455-6467.
- Zimmermann-Gries S. and M. Klein, 1978. A tomato big bud-like disease of tomatoes in Israel and its association with mycoplasma-like organisms. *Plant Disease Reporter* 62, 590–594.